**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de
marcadores microssatélites para *Paleosuchus trigonatus***

Priscilla Marqui Schmidt Villela

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ecologia Aplicada**

**Piracicaba
2008**

Priscilla Marqui Schmidt Villela
Bióloga

**Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de marcadores
microssatélites para *Paleosuchus trigonatus***

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ecologia Aplicada

Piracicaba
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Villela, Priscilla Marqui Schmidt

Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de marcadores
microsatélites para *Paleosuchus trigonatus* / Priscilla Marqui Schmidt Villela. - -
Piracicaba, 2008.

130 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Biodiversidade 2. Crocodilia - Caracterização - Brasil 3. Genética animal 4. Marcador
molecular I. Título

CDD 639.394
V735c

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedico

Aos meus pais, Claudemir e Ivone, por todo incentivo e apoio, amor e dedicação. Simplesmente as pessoas mais importantes da minha vida e responsáveis por todas as minhas conquistas e vitórias.

Ao sobrinho mais lindo e amado do mundo João Pedro, Aos meus irmãos José Antonio e Patrícia e ao meu cunhado Christian, por fazerem parte da minha vida e sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À “Gloriosa” - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), por todo conhecimento e oportunidades me oferecidos durante a pós-graduação.

*Ao prof. Dr. **Luiz Lehmann Coutinho**, pela orientação e pelo apoio e por toda a confiança depositada em mim.*

*Ao prof. Dr. **Luciano Martins Verdade**, pela colaboração na idealização e desenvolvimento deste projeto, pela grande ajuda na coleta de material, apoio e amizade.*

*À pesquisadora Dra. **Maria Imaculada Zucchi** pelas valiosas sugestões durante as análises deste trabalho.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de estudo e recursos que me possibilitaram divulgar este trabalho em diversos eventos científicos.*

*Ao **IBAMA/RAN** em especial a Yeda Bataus, Vitor Hugo Cantarelli e Sonia Mendonça*

*Ao **Tiago Andrade** pela grande ajuda na coleta de amostras no Araguaia/MT, Cabo Orange e Piratuba/AP.*

*Ao **IBAMA de Bonito/MS**, em especial ao Alexandre pelo auxílio logístico em Bonito/MS.*

*Ao **Dr. Franco L. De Souza**, pelo auxílio logístico em Bonito/MS.*

*A toda equipe do **Laboratório de Biotecnologia Animal**, do Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, em especial a Dra. Érika Cristina Jorge e Nirlei Aparecida Silva, que contribuíram para realização deste trabalho.*

*A toda equipe do **Laboratório de Ecologia Animal**, em especial ao Carlos Ignácio Piña, Tiago Timo e Bruno Ferronato.*

*À **EMBRAPA de São Carlos**, em especial a Dra. Luciana Regitano e Marcelo Cervini, pela genotipagem no aparelho ABI.*

*À **Dra. Izeni Farias** por fornecer amostras de *Paleosuchus trigonatus*.*

*Um agradecimento especial para **Daniel de Castro Rodrigues**, que me acompanhou durante todo esse período me dando força e apoio sempre que precisei, tanto nos momentos felizes quanto nas horas mais difíceis.*

*À **Ana Paula Branco do Nascimento, Naiane Sangaletti e Anderson Ferreira** meus eternos e amados amigos que sempre me apoiaram e me ajudaram a não desanimar.*

*Aos **meus amigos** Érika Cavalcante, Aline Martins Redondo, Kerli Ninov, Marina Fleury, Adrina Basile, Isabel Viegas, Leandro batista Costa, Fernando Sangaletti, Ricardo Sado, Erik Amazonas, Tatiane Oldone, Cleverson Oldone, Luiza Longo Bonfim, Álvaro e Nilza Bicudo.*

*E a **todos** que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.*

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Crocodilianos brasileiros	16
Referências	22
2 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE CROCODILIANOS BRASILEIROS A PARTIR DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAL	25
Resumo	25
Abstract	25
2.1 Introdução	26
2.2 Desenvolvimento	40
2.2.1 Material e Métodos	40
2.2.2 Resultados e Discussão	46
2.3 Conclusões	54
Referências	54
3 DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROCODILIANOS BRASILEIROS PELA ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP).	58
Resumo	58
Abstract	58
3.1 Introdução	59
3.2 Desenvolvimento	62
3.2.1 Material e Métodos	62
3.3 Resultados e Discussão	65
3.4 Conclusão	69
Referências	70
4 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM <i>Caiman latirostris</i> (JACARÉ-DE-PAPO-AMARELO), UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITE E SEQUENCIA DO GENE CITOCROMO B.	72

Resumo	72
Abstract.....	72
4.1 Introdução.....	73
4.2 Desenvolvimento	74
4.2.1 Material e Métodos.....	74
4.2.2 Resultados e Discussão.....	81
4.3 Conclusões.....	97
Referências	98
5 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>PALEOSUCHUS TRIGONATUS</i>	103
Resumo	103
Abstract.....	103
5.1 Introdução.....	103
5.2 Desenvolvimento	104
5.2.1 Material e Métodos.....	104
5.2.2 Resultados e Discussão.....	112
5.3 Conclusões.....	117
Referências	118
ANEXOS	120

RESUMO

Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Paleosuchus trigonatus*

A constante perda da diversidade biológica frente às pressões antrópicas tem concentrado atenções sobre a necessidade de se conhecer a diversidade genética das espécies que ainda restam como um primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de manejo. Técnicas de genética molecular fornecem uma estimativa do número de formas distintas numa área, bem como medidas de quão diferentes elas são. Dentre estas técnicas, o sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, aliado à análise de seqüências microssatélite, geram informações potencialmente capazes de evidenciar a variação contida entre indivíduos, sendo uma ferramenta excelente para ser utilizada em análise filogenética, diferenciação interespecífica e intraespecífica. Neste trabalho utilizamos 1670pb de uma região do DNA mitocondrial incluindo o *citocromo b* e uma parte da região controle e 630pb do gene nuclear *c-mos* Para analisar a relação filogenética entre as espécies de crocodilianos brasileiros. Marcadores produzidos por PCR-RFLP baseados em seqüência do gene *citocromo b* no DNA mitocondrial foram desenvolvidos para a identificação molecular das seis espécies brasileiras de crocodilianos. Esta técnica além de importante na identificação das espécies poderá ser utilizada como metodologia oficial de controle da comercialização e exportação de carne e couro de jacaré. O *Caiman latirostris* apresenta a mais extensa distribuição geográfica entre todos os crocodilianos. No presente trabalho utilizamos marcadores microssatélites para testar a hipótese da variação genética ser relacionada com distância geográfica, em pequena e grande escala, e se a variabilidade genética das espécies esta correlacionada com diferentes sub-biomas no litoral e interior. Não foi possível a transferência de marcadores microssatélites para a espécie *Paleosuchus trigonatus*, sendo assim novos marcadores genéticos foram caracterizados para espécie pela construção de bibliotecas enriquecidas de DNA microssatélite.

Palavras-chave: Caracterização genética; Crocodilianos brasileiros; Marcadores moleculares

ABSTRACT

Genetic characterization of Brazilian crocodilians and development of microsatellite markers for *Paleosuchus trigonatus*

Constant loss of biological diversity due to antropic pressure has concentrated attention upon the need to know the genetic diversity of remaining species as the first step in developing management strategies. Molecular techniques provide an estimate of the number of distinct forms, as well as measurements of the extent of their differences.

Among these techniques, mitochondrial and nuclear DNA sequencing along with microsatellite sequences provide information that is potentially capable of detecting any variation between individuals, which makes it an excellent tool for phylogenetic analyses, as well as inter and intraspecific differentiation. In the present work, we used a 1670bp region of mitochondrial DNA including *cytochrome b* and a 630bp portion of the nuclear gene *c-mos* to analyze the phylogenetic relationship among Brazilian crocodilian species.

PCR-RFLP markers based on cytochrome b mitochondrial DNA were developed for the molecular identification of six Brazilian crocodilian species. This technique is not only important for the identification of species, but it is also useful as an official methodology for controlling commercialization and exportation of crocodilian meat and leather.

Broad-snouted caiman's (*Caiman latirostris*) geographic distribution comprises one of the widest latitudinal ranges among all crocodilians. In the present study, we used microsatellite markers to test the hypothesis that genetic variation is related to geographic distance, on a small and large scale, and if the genetic variability of a species is correlated to coastal and inland sub-biomes. It was not possible to transfer microsatellite markers to *Paleosuchus trigonatus*, so new genetic markers were characterized for the species by constructing a microsatellite enriched DNA library.

Keywords: Characterization genetics; Brazilian crocodilian; Molecular markers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Foto <i>Melanosuchus niger</i>	17
Figura 1.2 - Foto <i>Caiman Latirostris</i>	18
Figura 1.3 - Foto <i>Caiman Crocodilus</i>	19
Figura 1.4 - Foto <i>Caiman yacare</i>	20
Figura 1.5 – Foto <i>Paleosuchus palpebrosus</i>	21
Figura 1.6 - Foto <i>Paleosuchus trigonatus</i>	22
Figura 2.1 - Esquema gráfico do DNA mitocondrial de <i>Caiman crocodilus</i> sequenciado por Janke et al., 2001, com destaque à região do gene citocromo b.	31
Figura 2.2 - Cladograma ilustrando as relações filogenéticas entre crocodilianos existentes e extintos (GATESY et al., 2003).	37
Figura 2.3 - Árvore Bayesiana ilustrando a relação filogenética entre os crocodilianos usando o modelo Kimura 2 Parâmetros com seqüências do gene nuclear C-mos.	38
Figura 2.4 - Árvore de Máxima verossimilhança ilustrando a relação filogenética entre os crocodilianos usando seqüência do gene mitocondrial Cyt b.	39
Figura 2.5 - Posição dos primers utilizados para a amplificação do DNA mitocondrial de crocodilianos brasileiros. Em azul estão os primers que não tiveram uma boa amplificação e que foram descartados.	43
Figura 2.6 - Eletroforese em gel 1%, corado com Brometo de Etídio mostrando o fragmento do gene citocromo b.	47
Figura 2.7 - Fragmento da região controle mitocondrial amplificado com os primers 15485-16180.	47
Figura 2.8 - Fragmento da região 12S	48
Figura 2.9 - Fragmento do região nuclear RAGI.	48
Figura 2.10 - Fragmento da região nuclear C-mos	49
Figura 2.11 - Gráfico de transições (I^S) e das tranversões (I^V) versus distância do gene citocromo b e Região controle nos crocodilianos estudados.	50
Figura 2.12 - Gráfico de transições (I^S) e das tranversões (I^V) versus distância do gene c-mos nos crocodilianos estudados.	50

Figura 2.13 - Cladograma ilustrando as relações filogenéticas das espécies brasileiras de crocodilianos com seqüenciadas do citocromo b e da região controle.....	51
Figura 2.14 - Cladograma ilustrando as relações filogenéticas das espécies brasileiras de crocodilianos com seqüenciadas do citocromo b e da região controle.....	53
Figura 3.1 – Fragmento do Citocromo b. Padrão de peso molecular (ØX). <i>Caiman crocodilus</i> (CC), <i>Caiman yacare</i> (CY), <i>Caiman latirostris</i> (CL), <i>Melanosuchus niger</i> (MN), <i>Paleosuchus palpebrosus</i> (PP), <i>Paleosuchus trigonatus</i> (PT) e Controle Negativo (CN).....	65
Figura 3.2 - Seqüências do fragmento do citocromo b para seis espécies de crocodilianos brasileiros.	66
Figura 3.3 - Fragmento de 357 ou 358pb do citocromo b com os sítios de clivagem por enzima de restrição nas seis espécies de crocodilianos brasileiros.....	67
Figura 3.4 - Análise de restrição do fragmento de 357pb da região parcial do gene citocromo b nas seis espécies de crocodilianos brasileiros.....	69
Figura 4.1 - Número de alelos exclusivos de <i>Caiman latirostris</i> em cada população estudada. ...	82
Figura 4.2 - Padrão de diferenciação genética obtido pela estatística R_{ST} entre as populações de <i>Caiman latirostris</i> pelo método UPGMA.	87
Figura 4.3 - Padrão de diferenciação genética obtido pela estatística F_{ST} entre as populações de <i>Caiman latirostris</i> pelo método UPGMA.	87
Figura 4.4 - Árvore obtida pelo método de distância UPGMA nas populações de <i>Caiman latirostris</i>	89
Figura 4.5 - Estimativa de melhor K para as doze populações de <i>C. latirostris</i> estudadas de acordo com parâmetros de DeltaK. Valores para cada K, calculado como $K = m L''(K) /s[L(K)]$ (EVANNO et al., 2005).	90
Figura 4.7 - Resultado do STRUCTURE para K = 10, cada cor representa um agrupamento e a probabilidade do indivíduo pertencer a este agrupamento. Mapa: As 11 localidades onde as populações foram amostradas e as cores representam o grupo genético que elas foram atribuídas.....	93
Figura 4.8 - Representaçãodo Q:coeficiente de participação do indivíduo a cada grupo, representados de cores diferentes. Cada linha vertical corresponde a um indivíduo.	94

Figura 4.9 - Correlação entre a distância geográfica em linha reta e a diferenciação genética entre pares de população (R_{ST} e F_{ST}). Os círculos representam as distâncias geográficas e a diferenciação genética das nove populações com a Ilha do Cardoso e Cubatão. Os triângulos representam as comparações entre Rio Grande do Sul e as populações do Nordeste do Brasil [Alagoas (AL), Paraíba (PB), e Rio Grande do Norte (RN)]	96
Figura 5.1 - Ligação entre o DNA inserto e os adaptadores pré-hibridizados	105
Figura 5.2 – Digestão do DNA genômico	112
Figura 5.3 – Gel da pré-amplificação	113
Figura 5.4 – Gel das sucessivas lavagens	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – <i>Primers</i> utilizados para amplificar seqüências mitocôndrias.	43
Tabela 2.2 - <i>Primers</i> utilizados para amplificar seqüências de DNA nuclear (Cmos).....	43
Tabela 3.1 – <i>Primers</i> utilizados para amplificar seqüências do citocromo b.	64
Tabela 3.2 - Tamanho predito do Fragmento de aproximadamente 357pb da região parcial do gene citocromo b nas seis espécies de crocodilianos brasileiros após análise pelas respectivas enzimas de restrição.	68
Tabela 4.1- Sitos de estudos	74
Tabela 4.2 - <i>Primers</i> e condições de amplificação. T = Temperatura de anelamento ótima (°C). C = Numero de ciclos para o PCR.	76
Tabela 4.3 - <i>Primers</i> e condições de amplificação. T = Temperatura de anelamento ótima (°C). C=Número de ciclos para o PCR.....	77
Tabela 4.4 - Número de alelos por marcador encontrado nas populações. AL.Alagoas, RS.Rio Grande do Sul, IC. Ilha do Cardoso/SP, RN. Rio Grande do Norte, Pb. Paraíba, Poá. Porto de Areia/SP, PT. Pantanal/São Pedro/SP, CHA. Charqueada. DuF. Dura Flora/SP, MS. Mato Grosso do Sul. CuB. Cubatão e CaT. População de cativeiro da ESALQ.	81
Tabela 4.5 - Estimativa da diversidade gênica (h), heterozigosidade observada (H_o) e Índice de fixação (f).	83
Tabela 4.6 - Valores de R_{ST} e F_{ST} (diagonal inferior) e distância geográfica em km (diagonal superior). Números em azul e vermelho representam a maior e menor diferenciação encontrada (respectivamente).	85
Tabela 4.7 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre haplótipos de populações de <i>Caiman latirostris</i> divididas em dois grupos (litoral e continente) utilizando seqüência do citocromo b.	89
Tabela 4.8 - Resultado do STRUCTURE para K=10 (probabilidade média para cada população). Em negrito refere-se ao número de indivíduos atribuídos para um dos 10 clusters com probabilidade >0,90. O número total de indivíduos de cada população esta entre parêntese.	91

Tabela 5.1 - Seqüências dos <i>primers</i> desenvolvs, temperatura de hibridização dos <i>primers</i> (T_h) e tamanho esperado dos produtos de PCR (Tam_e), baseado no tamanho do alelo clonado e sequenciado.	115
Tabela 5.2 - Caracterização genética dos oito locos microssatélites polimórficos isolados em <i>Paleosuchus trigonatus</i>	116
Tabela 5.3 - Teste de amplificação em outras espécies de crocodilianos brasileiros utilizando <i>primers</i> desenvolvs para <i>P. trigonatus</i> . Seis diferentes temperaturas de hibridização dos <i>primers</i> foram testadas (50, 52, 54, 56, 58 e 59 °C); a melhor temperatura está indicada para cada espécie/loco.	117

1 INTRODUÇÃO

Uma boa parte da diversidade biológica do planeta está sendo dizimada como consequência de ações humanas. Apesar da extinção ser parte natural do processo evolutivo, as taxas atuais são muito elevadas. Assim, a genética aplicada à conservação tem por objetivo auxiliar a reduzir as taxas de extinção e a preservar a biodiversidade. Técnicas de genética molecular fornecem uma estimativa do número de formas distintas numa área, bem como medidas de quão diferentes elas são. Entre essas técnicas, as mais amplamente utilizadas têm sido as de medidas de diversidade genética e filogenia. Geralmente, a diversidade genética tem sido estudada dentro de espécies, medindo tanto as diferenças entre indivíduos, quanto as diferenças entre populações naturais, que hoje muitas vezes estão separadas entre si pela perda e fragmentação dos habitats naturais. O conhecimento da diversidade genética é essencial para a manutenção das populações e das espécies em períodos ecológicos e evolutivos. Além de fornecer uma medida pela qual se pode estimar o valor das regiões para conservação.

O Laboratório de Ecologia Animal e o Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP (Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil) vêm, de forma interdisciplinar coordenando esforços para contribuir com o estudo da biologia, manejo e conservação de crocodilianos brasileiros. Em nossos estudos temos utilizado marcadores microssatélites desenvolvidos para *Alligator mississippiensis* (GLENN; DESSAUER; BRAUN, 1998) e marcadores microssatélites específicos para *Caiman latirostris* que foram desenvolvidos e testados com sucesso em outras espécies de crocodilianos brasileiros (ZUCOLOTO, 2003; ZUCOLOTO, 2005). Nossas atividades resultaram na implantação do teste de maternidade na colônia em cativeiro de *Caiman latirostris* (ZUCOLOTO, 1998), em estudos de genética de populações selvagens na região de São Paulo (VERDADE; ZUCOLOTO; COUTINHO, 2002) e caracterização genética de *Caiman latirostris* em pontos extremos de sua distribuição latitudinal no Brasil (VILLELA, 2004; VILLELA et al., 2008).

No entanto, ainda existe uma carência de estudos de caracterização genética e evolutiva das espécies de crocodilianos que habitam o nosso território e a utilização de polimorfismo genético em populações naturais como base para compreensão de fenômenos evolutivos e ecológicos, devem ser considerados para a conservação deste grupo.

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas em estudos evolutivos. Dentre estas técnicas o sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, aliado à análise de seqüências microsatélite, geram informações potencialmente capazes de evidenciar a variação contida entre indivíduos. Sendo uma ferramenta excelente para ser utilizada em análise filogenética, diferenciação interespecífica e intraespecífica (AVISE, 1994).

Esta variabilidade genética, além de importante para a evolução, pode ser usada como instrumento de investigação em diversos ramos como verificar afinidades e os limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de restos animais e produtos industrializados (principalmente peles e carne).

Com o estudo genético das populações de crocodilianos teremos importantes informações ecológicas que podem ser utilizados na preservação das espécies e até para identificar couros e carnes de animais capturados de forma ilegal, sendo que saber a origem destes produtos é uma forma mais rápida para se coibir essa prática.

1.1 Crocodilianos brasileiros

Os crocodilianos (ordem Crocodilia) são representantes vivos da subclasse Archosauria. São répteis diápsidos (duas janelas temporais), andam sobre quatro patas e apesar de terem alguns hábitos anfíbios, põem seus ovos em terra (ROMER; PARSONS, 1985). Os crocodilianos atuais representam apenas uma pequena fração das espécies que existiram durante o período Triássico, há 220 milhões de anos. Os crocodilianos modernos consistem de 8 gêneros e 23 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical, às vezes se estendendo até as regiões temperadas do planeta. As espécies existentes pertencem à classe Reptilia, subclasse Diapsida, superordem Archosauria e ordem Crocodylia, que são divididas em três famílias: Alligatorinae, Crocodylinae e Gavialinae (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001). Os crocodilianos brasileiros chamados de jacarés, pertencem à subfamília Alligatorinae (KING; BURKE, 1989).

Há quatro gêneros vivos representando os Alligatorinae: *Alligator*, *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus*. O primeiro ocorre somente na América do Norte e China, o segundo é encontrado do sul do México à América do Sul, os dois gêneros seguintes são encontrados somente na América do Sul (SILL, 1968).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2005), na ordem Crocodylia, família Alligatoridae, constam no Brasil seis espécies: *Caiman crocodilus* (LINNAEUS, 1758); *Caiman latirostris* (DAUDIN, 1802); *Caiman yacare* (DAUDIN, 1802); *Melanosuchus niger* (SPIX, 1825); *Paleosuchus palpebrosus* (CUVIER, 1807) e *Paleosuchus trigonatus* (SCHNEIDER, 1801).

Alguns autores não consideram o nível específico para *Caiman yacare* como proposto por Daudin (1802), rebaixando a espécie para subespécie *Caiman crocodilus yacare* (KING; BURKE, 1989).

***Melanosuchus niger* (Jacaré-açu)**

O Jacaré-açu pode alcançar seis metros de comprimento. A espécie é caracterizada por sua coloração escura, que a distingue de outros jacarés, mais claros na idade adulta. É encontrado em países amazônicos, como Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia, Guiana e Guiana Francesa (BRAZAITIS et al., 1996; THORBJARNARSON, 2007).

Figura 1.1 - Foto *Melanosuchus niger*

A espécie ocorre basicamente em toda a bacia amazônica, mas é realmente abundante somente nas áreas de várzeas. Recentemente o jacaré-açu foi excluído da Nova Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Por outro lado, a nível internacional, as populações naturais dessa espécie, no território brasileiro, ainda estão incluídas no Apêndice I da CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Lista Vermelha da IUCN: Baixo risco de extinção, dependente de conservação. A população estimada é de 25.000 a 50.000. Estudos realizados nos últimos dez anos na Amazônia brasileira e

nos países amazônicos vizinhos indicam que as populações desta espécie estão em ótimo estado de conservação na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa e Peru.

Atualmente, o jacaré-açu está sujeito à intensa exploração ilegal para a obtenção de carne nas calhas dos rios Solimões, Japurá, Purus e Amazonas. As peles são desprezadas e a carne é comercializada salgada com os mercados colombiano e paraense. A pele do jacaré-açu tem valor comercial próximo ao das espécies clássicas, pela pequena presença de osteodermos e padrão de escamas semelhantes ao do aligátor americano, com razoável mercado internacional em potencial. A produção de carne poderá destinar-se ao mercado interno em grandes centros urbanos do centro-sul e nordeste do Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DE RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2008).

***Caiman latirostris* (jacaré-de-papo-amarelo)**

O *Caiman latirostris*, é um crocodiliano sul americano de porte médio, o comprimento total máximo alcançado é de 3,5 m, mas na natureza são raros os animais maiores que 2,0 m (VERDADE, 1998). O focinho é mais largo que em outros crocodilianos. O corpo é de cor verde escura, com manchas mais escuras na cabeça e pescoço.

Figura 1.2 - Foto *Caiman Latirostris*

O *Caiman latirostris* é uma espécie altamente aquática habitante das várzeas associadas a rios. Sua distribuição geográfica é restringida para a América do Sul que inclui: norte da

Argentina; Brasil (estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, e Rio Grande do Norte, inclui as bacias hidrográficas dos Rios Paraná e São Francisco); nordeste do Uruguai, sudeste da Bolívia e sul do Paraguai (VERDADE; PIÑA, 2006). Atualmente o táxon não se enquadra na categoria ameaçada de extinção biológica pelo IBAMA, mas ainda está listado no Apêndice I da CITES (exceção feita a população Argentina que mudou para Apêndice II em 1997). As principais causas do declínio de suas populações são a destruição sistemática de seu habitat e a caça ilegal. A pele do *Caiman latirostris* é entre as do gênero *Caiman*, a mais valorizada, por apresentar produtos manufaturados de melhor qualidade (KING; BRAZAITIS, 1971; BRAZAITIS; WATANABE; AMATO, 1987), apesar de não ser considerada como pele clássica (VERDADE, 1997).

***Caiman crocodilus* (jacaré-tinga)**

O tamanho médio dos adultos é de 2,50 metros de comprimento. Corpo esverdeado, com manchas amarelas e cinzas. O jacaré-tinga é oportunista, favorecendo hábitos e dietas variados. Suas populações saudáveis na maior parte de sua área de ocorrência, refletem sua alta capacidade de adaptação aliada ao seu potencial reprodutivo e a diminuição das populações de outros crocodilianos competidores (BRAZAITIS, 1998).

Figura 1.3 - Foto *Caiman Crocodilus*

A espécie encontra-se distribuída no Sul do México, América Central e norte da América do Sul, nos rios Solimões, Amazonas, Araguaia, Araguari, Itapicuru, Parnaíba, Negro, Tapajós, Tocantins e Xingu. A pele legal da espécie normalmente vem da Venezuela, enquanto a ilegal é proveniente do Brasil. O status do *Caiman crocodilus* ainda não é bem conhecido pela ampla

distribuição da espécie na América do Sul. É o mais comum dentre todos os crocodilianos brasileiros, apesar de algumas populações estarem localmente reduzidas. A espécie consta no Apêndice II do CITES, sendo sua comercialização nacional e internacional permitida. É considerada de “baixo risco” de extinção biológica pela IUCN. Sua população é estimada em mais de 1.000.000 de indivíduos (IBAMA, 2008).

Caiman yacare (jacaré-do-pantanal)

É uma espécie amplamente distribuída, ocorre no Brasil central e meridional, nos rios: Mamore, guaporé, Paraguai e Paraná. Ocorre em altas densidades na região do Pantanal nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (BRAZAITIS, 1998). Podem chegar até 2,5~3 metros. Corpo esverdeado, com manchas amarelas e cinzas em geral é semelhante ao *Caiman crocodilus*.

Figura 1.4 - Foto *Caiman yacare*

Na sua área de distribuição, o *C. yacare* vem sendo submetido à caça ilegal, há muito tempo. Apesar disso, as populações apresentam-se ainda com densidades altas em algumas sub-regiões, aparentemente graças a sua capacidade de resistir à pressão da caça. No entanto, o desmatamento para a implantação de pastagem no Pantanal pode afetar as populações desta espécie no futuro. O *C. yacare* está listado no Apêndice II da CITES, que permite a possibilidade de comércio internacional. Contudo, até pouco tempo atrás, a espécie estava listada como ameaçada de extinção nos Estados Unidos e assim, o comércio com esse país estava proibido por força da lei Norte-Americana. Recentemente, a referida lei foi aprimorada e hoje é possível exportar produtos e subprodutos de *Caiman* para os Estados Unidos. Sua população é estimada em 100.000 a 200.000; diminuiu em comparação ao histórico populacional, mas ainda encontra-

se amplamente distribuída, podendo ser notada alta densidade durante a estação seca (IBAMA, 2008).

***Paleosuchus palpebrosus* (jacaré-paguá)**

É considerado entre as 23 espécies de crocodilianos a menor em tamanho, atingindo no máximo 1,6 m de comprimento (MEDEM, 1981). Dentre as seis espécies que ocorrem no Brasil, tem a sua distribuição marcante ao longo dos rios Amazonas, Paraguai e Paraná e de suas áreas inundadas, excluindo a área central do Pantanal (MAGNUSSON, 1985).

Figura 1.5 – Foto *Paleosuchus palpebrosus*

Relatos dos anos de 1979 a 1980 acusam que peles da espécie foram confiscadas na região Amazônica, todavia o valor comercial de suas peles é de baixa importância no mercado. Isso se deve a alta ossificação da sua pele e as baixas densidades naturais da espécie em toda a área de distribuição. A espécie consta do Apêndice II da CITES. A falta de informação da ecologia da espécie, apesar da extensa distribuição geográfica, é um fator que pode eventualmente afetar a sua conservação (THORBJARNARSON, 1992).

***Paleosuchus trigonatus* (jacaré-coroa)**

Ambas as espécies do gênero *Paleosuchus* são pequenas, comparadas a outros crocodilianos, mas esta não é tão pequena quanto a *P. palpebrosus*. Os machos atingem 1,7 a 2,3 m de comprimento e as fêmeas, 1,5 m. Sua pele não possui alto valor por ser repleta de osteodermos (placas ósseas). Isso, somado ao pequeno porte, faz com que não sejam muito caçados. No Brasil essa espécie foi a menos estudada até o presente momento. Encontra-se distribuídas na Bacia do Amazonas e do Orinoco.

Figura 1.6 - Foto *Paleosuchus trigonatus*

Esta espécie não se encontra ameaçada de extinção biológica no futuro próximo, mas tem sido afetada a nível local por destruição de habitat, poluição e/ou caça. O desmatamento da floresta amazônica torna a área imprópria para o *P. trigonatus*. A espécie consta do Apêndice II da CITES, o que permite a comercialização de seus subprodutos aos níveis nacionais e internacionais. Lista Vermelha da IUCN: Baixo risco de extinção (IBAMA, 2008).

Referências

- AVISE, J.C. Natural history and evolution. **Molecular markers**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.
- BRAZAITIS, P.; WATANABE, M.E.; AMATO, G. The caiman trade. **Scientific American**, New York, v. 278, p. 275-284, 1998.
- BRAZAITIS, P.; REBÊLO, G.H.; YAMASHITA, C.; ODIERNA, E.O.; WATANABE, M. Threats to Brazilian crocodilian populations. **Oryx**, Cambridge, v. 30, p. 275-284, 1996.
- DAIDIN, F.M. **Histoire naturelle et particuliere des reptiles**. Paris: Mook and Mook, 1940.
- GLENN, T. C.; DESSAUER, H. C.; BRAUN, M. J. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. **Copeia**, Washington, v. 3, p. 591-601, 1998.
- KING, FW; BRAZAITIS, P. Species identification of commercial crocodilian skins. **Zoológica**, New York ,v. 56, n. 2, p. 15-70, 1971.
- KING, F.W; BURKE, R.L. **Crocodilian, tuatara, and turtle species of the word**. Washington: Association of Systematics Collection, 1989. 216 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS.
Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/ran/>> Acesso em: 10 jan. 2008.

MAGNUSSON, W.E. Habitat selection, parasites and injuries in Amazonian crocodiles.
Amazonis, Manaus, v. 9, p.193-204, 1985.

MEDEM, F. **Los Crocodylia de Sur America**: los Crocodylia de Colombia. Bogota: Editor Carrera, 1981.v.1 270 p.

MOOK, C.C.; MOOK, G.E. Some problems in Crocodilian nomenclature. **American Museum Novitates**, New York, v. 1098, p. 1-10, 1940.

ROMER, A.; PARSONS, T.S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985. 481 p.

SILL, W.D. The zoogeography of the Crocodilia. **Copeia**, Washington, v. 1968, p. 76–88, 1968.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista de espécies de répteis do Brasil**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>, 2005. Acesso em: 10 mar. 2008.

THORBJARNARSON, J. "**Melanosuchus niger**" 1998. Disponível em: <<http://www.flmnh.ufl.edu/natsci/herpetology/act-plan/mnige.htm#TOP>>. Acesso em: 19 nov. 2007.

THORBIARNARSON, J. **Crocodiles**: an action plan for their conservation. Gland: IUCN, 1992.132 p.

VERDADE, L.M. Manejo e conservação do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: VALLADARES-PÁDUA, C.B.; BODMER, R.E.; CULLEN, L.J.R. (Ed.). **Manejo de vida silvestre para a conservação**. Mamirauá: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. p. 222-232.

_____. *Caiman latirostris*. In : ROSS, J.P. (Ed.). **Crocodile status survey and conservation action plan**. Gland: IUCN; The World conservation Union, 1998.

VERDADE; L.M; PIÑA C.I. *Caiman latirostris*. **Catalog of the American Society of Amphibians and Reptiles**, Salt Lake, v. 833,p. 1-21, 2006.

VILLELA, P.M.S. **Caracterização genética de populações de Jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman Latirostris*), utilizando marcadores microssatélites**. 2004. 114 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VILLELA, P.M.S.; COUTINHO, L.L.; PINA C.I.; VERDADE, L.M. Macrogeographic genetic variation in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Journal Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 309A, p. 628- 636, 2008.

ZUCOLOTO, R.B. **Avaliação da diversidade genética e teste de maternidade em jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) através do uso de seqüências de DNA microsatélite**. 1998. 114 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

_____. **Desenvolvimento de seqüências microsatélite para estudo de populações remanescentes de Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*), da região central do estado de São Paulo**. 2003. 118 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ZUCOLOTO, R.B.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. **Journal Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, Philadelphia, v. 294, p. 346-351, 2002.

ZUCOLOTO, R.B.; VILLELA, P.M.S.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Interspecific transference of microsatellite markers in South American Caimans (*Caiman spp* and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 75-78, 2005.

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. 2nd ed. New York: Academic Press, 2001. 630 p.

2 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE CROCODILIANOS BRASILEIROS A PARTIR DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAL

Resumo

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas em estudos evolutivos. Dentre estas técnicas, o sequenciamento do DNA mitocondrial e nuclear geram informações potencialmente capazes de evidenciar a variação contida entre espécies. Sendo uma excelente ferramenta para ser utilizada em análise filogenética. Para analisar a relação filogenética das espécies de crocodilianos brasileiros sequenciamos 1673pb de uma região do DNA mitocondrial incluindo o *citocromo b*, genes tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro} e tRNA^{Phe}, uma sequência parcial da região D-loop (região controle) e 630pb do gene nuclear *c-mos*. As análises filogenéticas utilizando os métodos de máxima verossimilhança e análise bayesiana evidenciaram o agrupamento das espécies *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*, confirmando relatos anteriores, nos quais vários autores classificam estas duas taxa como subespécies (*C. crocodilus crocodilus* e *C. crocodilus yacare*). Ambos, no entanto, demonstram mais similaridade com *Caiman latirostris* pela análise do DNA mitocondrial, o que faz sentido, pois são espécies pertencentes ao mesmo gênero. Outro agrupamento, mas com menor similaridade, foi o do gênero *Caiman* com a espécie *Melanosuchus niger*, fato interessante, pois há debates para uma possível mudança da espécie *Melanosuchus niger* para *Caiman niger*. As espécies *Paleosuchus palpebrosus* e *Paleosuchus trigonatus* estão agrupadas, e juntamente com a espécie *Alligator mississippiensis* estão fora do agrupamento com as demais espécies. Este fato já foi descrito em literatura, que cita o gênero *Paleosuchus* como o mais distante dos demais gêneros brasileiros. Sendo assim, a árvore filogenética construída com dados de sequências DNA mitocondrial e nuclear esta evidenciando bem a filogenia das espécies estudadas.

Palavras-chave: Relações filogenéticas; DNA mitocondrial; DNA nuclear, Crocodilianos brasileiros

Abstract

Several molecular techniques have been used in evolutionary studies. Among these techniques, mitochondrial and nuclear DNA sequencing generate an enormous amount of information that is potentially capable of detecting variations among individuals, and is therefore an excellent tool for phylogenetic analysis. In the present work, we used a 1673bp mitochondrial DNA including *cytochrome b*, genes tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro} and tRNA^{Phe}, and control region (D-loop) and a 630bp portion of the nuclear gene *c-mos* to analyze the phylogenetic relationship among Brazilian crocodilian species. Phylogenetic analyses using maximum likelihood and Bayesian methods resulted in grouping *Caiman crocodilus* and *Caiman yacare* species together, confirming previous reports, in which several authors classify these two taxa as subspecies (*C. crocodilus crocodilus* and *C. crocodilus yacare*). Both, however, demonstrate more similarity with *Caiman latirostris*, which makes perfect sense, since they are species of the same genus. Another grouping, although with smaller similarity, was the genus *Caiman* with the *Melanosuchus niger* species. This is interesting, because there are debates surrounding a possible change of the *Melanosuchus niger* species for *Caiman niger*. The species *Paleosuchus palpebrosus* and *Paleosuchus trigonatus* were grouped. This genus and the *Alligator*

mississippiensis species are not part of the grouping with the other species, a fact already described in the literature, which mentions *Paleosuchus* as the most distant from the other Brazilian genus. The phylogenetic tree built from sequence data of *cytochrome b* gene and the controlling region of the mitochondrial DNA is in agreement with previous studies that suggest changing the assignment of *Melanosuchus niger* to the *Caiman* genus.

Keywords: Phylogenetic relationships; Mitochondrial DNA; Nuclear DNA; Brazilian crocodilian

2.1 Introdução

Os avanços das técnicas moleculares, particularmente o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase-PCR (“polymerase chain reaction”) (MULLIS et al., 1986), têm permitido grandes progressos nas análises dos genomas eucariontes. O sequenciamento de ácidos nucleicos tem se desenvolvido rapidamente nas últimas décadas. O sequenciamento de DNA tem se tornado uma das estratégias moleculares mais utilizadas para estabelecer e testar hipóteses sobre a história evolutiva dos organismos. As seqüências de DNA são usadas para estimar árvores de genes e a partir destas fazer inferências a respeito das relações de parentesco entre populações, espécies, gêneros, bem como categorias hierárquicas superiores. O seu amplo uso está relacionado à quantidade de dados extraídos das seqüências de nucleotídeos quando comparada a outros tipos de caracteres como os morfológicos, por exemplo. Somado a esta vantagem, está o fato de ser relativamente fácil extrair e incorporar informação a respeito dos processos moleculares evolutivos nas análises. Além disso, a evolução das seqüências é relativamente mais simples de modelar e há de se considerar o grande potencial informativo desse conjunto de dados (HILLIS; MORITZ; MABLE, 1996). O sequenciamento de DNA pode ser utilizado como ferramenta na obtenção de dados que auxiliam na elucidação dos processos que geram a variabilidade observada nessas moléculas, em estudos da origem de novos alelos e novos locos, na investigação de convergência e seleção. Uma aplicação importante diz respeito aos estudos populacionais ou intraespecíficos, incluindo o traçado de genealogias alélicas e de organismos dentro de espécies e estudos de variação geográfica, fluxo gênico, hibridação e genética de conservação (AVISE, 1994).

Os estudos interespecíficos, tais como a construção de filogenias de espécies para avaliar padrões e processos evolutivos são outros exemplos nos quais as seqüências moleculares podem ser empregadas (AVISE, 1994; MINDELL, 1997). Dentro dessas categorias está incluído um grande número e diversidade de aplicações específicas, tais como: análises comportamentais e

ecológicas, estudos de desenvolvimento, genética de populações, aplicações sistemáticas e taxonômicas, estudos epidemiológicos, entre outros (AVISE, 1994).

Análise das seqüências gênicas

Em princípio, o uso de seqüências de DNA para as análises filogenéticas se processa a partir de um conjunto de dados, no qual os caracteres são representados pelos sítios ao longo das seqüências e os estados de caráter são os nucleotídeos observados nessas posições. Os dados de seqüências de nucleotídeos são geralmente tratados como caracteres multiestado não ordenados, portanto qualquer estado (A, T, C ou G) pode transformar-se diretamente em outro.

Os dados a serem comparados entre as seqüências são as bases presentes nos sítios homólogos, que podem ser as mesmas ou podem estar substituídas por outras. As substituições de bases podem ser de dois tipos: (1) transições, quando envolve ou bases púricas ou pirimídicas ($A \leftrightarrow G$ ou $C \leftrightarrow T$); (2) transversões, quando envolve uma base púrica e outra pirimídica ($A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$ e $G \leftrightarrow C$). Geralmente as transições são mais comuns que as transversões, devido ao fato de que estas últimas geram distorções de largura na molécula de DNA e a probabilidade do sistema de reparo celular “consertar” esse tipo de mutação é muito maior do que no caso de uma transição. Por esse motivo, as transições podem se acumular e ocasionar saturação em vários sítios, que passam a ser não informativos em alguns tipos de análises, como por exemplo, na máxima parcimônia. Outro aspecto interessante a ser levado em conta é a heterogeneidade das taxas de evolução ao longo da molécula de DNA, como, por exemplo, a que ocorre entre a 3^a base do códon com relação às 1^a e 2^a bases que sofrem pressão seletiva mais acentuada. Portanto espera-se que a 3^a base seja a mais saturada de substituições. Existem testes que verificam a ocorrência de saturação nas seqüências que se deseja comparar, como por exemplo, o desenvolvido no programa DAMBE criado por Xia e Xie (2001) que gera um gráfico plotando o número de transições e transversões versus a divergência entre as seqüências. Se a distribuição das transições e transversões gerarem retas paralelas, considera-se que não há saturação. Entretanto, se a reta das transições se cruzar com a das transversões, a partir desse ponto se considera haver saturação.

Quando as substituições ocorrem em regiões codificadoras do genoma, elas podem ser classificadas como sinônimas (não há alteração do aminoácido na proteína resultante) ou não-sinônimas (o aminoácido muda). Também existem aquelas substituições que geram códons de parada, chamadas de mutações sem sentido. Além da substituição de bases, também denominadas

“mutações pontuais”, existem mutações do tipo inserção/deleção (indels), que envolvem a adição ou remoção de nucleotídeos em uma determinada sequência de DNA. As inserções ou deleções que não envolvem múltiplos de três nucleotídeos provocam alteração no quadro de leitura do gene, levando a produção de proteínas com baixa ou nenhuma atividade.

Para se trabalhar com reconstrução filogenética baseada em dados moleculares é preciso conhecer algumas propriedades das sequências a serem comparadas. Primeiramente, elas têm de ser homólogas, ou seja, apresentar ancestralidade em comum. Há três tipos de homologia: ortologia, quando as sequências têm um único e mesmo ancestral comum; paralogia, quando se originam de uma duplicação gênica; e xenologia, quando se originam por incursão lateral (ou horizontal). Apenas sequências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas na história de organismos (MATIOLI, 2001).

O uso incorreto pode resultar em estimativas corretas da filogenia das moléculas, mas incorretas quanto à filogenia dos organismos dos quais elas foram amostradas. É muito importante que o segmento amplificado seja de um locus ortólogo. Esta dificuldade é menos encontrada no DNA mitocondrial porque este não tem múltiplos loci. Entretanto cuidado deve existir para a possibilidade da ocorrência de pseudogenes, isto é, genes mitocondriais que foram transferidos para o genoma nuclear. O uso de extrações enriquecidas de mitocôndrias é uma maneira também de minimizar essas interferências, além de outros pontos que marcam diferenças entre o DNA mitocondrial e o genômico com relação aos pseudogenes como, por exemplo, a razão transição/transversão e a presença de indels ou códons de parada. Eventos de inserção/deleção devem ser levados em conta uma vez que podem atrapalhar no estabelecimento da homologia posicional dos nucleotídeos. Nesse sentido, muita atenção deve ser dada ao alinhamento das sequências. O alinhamento de sequências pode ser obtido pela inserção de lacunas (“gaps”), que correspondem a inserções ou deleções (eventos indel) em uma ou mais sequências, de modo a alcançar uma similaridade maior entre as mesmas. Este procedimento procura, desta forma, posicionar os sítios homólogos numa mesma coluna da matriz de dados. Com exceção de sequências relativamente conservadas, eventos de inserção e/ou deleção devem ser sempre postulados de forma a se supor que nucleotídeos em posições correspondentes nas várias sequências são de fato homólogos (HILLIS; MORITZ; MABLE 1996; LI, 1997).

O objetivo do alinhamento é justamente fazer com que o sítio de cada base que esteja sendo comparado entre as sequências seja homólogo. O alinhamento de sequências de genes que

codificam proteínas entre táxons relativamente próximos geralmente não mostra dificuldade. Contrariamente, o alinhamento de seqüências pertencentes a táxons distantemente relacionados ou referentes a regiões não codificantes de proteínas geralmente é uma tarefa difícil, sendo necessária a inserção de lacunas (gaps). Existem na literatura alguns trabalhos que discutem a respeito de como as lacunas devem ser tratadas na análise filogenética, se devem ser consideradas como um 5° estado ou como dado perdido -missing data- (GIRIBET; WHEELER, 1999).

Embora as lacunas sejam muitas vezes tratadas como 5° estado, os processos responsáveis por uma substituição, uma deleção ou uma inserção são bem distintos entre si. Muitos autores defendem que regiões de alinhamento que contenham um número elevado de lacunas devem ser retiradas da análise uma vez que o estabelecimento da homologia não é confiável nessas regiões. Diversos programas de alinhamento estão disponíveis, em função da complexidade e da importância de um bom alinhamento, é recomendável o uso de um bom editor de seqüências. Um dos mais eficientes é o BIOEDIT, desenvolvido por Hall (1999) que incorpora o CLUSTAL W, certamente um dos mais poderosos programas para alinhamento automático de seqüências (SCHNEIDER, 2003)

Escolha dos genes

Outro aspecto muito importante em estudos envolvendo a análise de seqüências é a escolha da região do genoma a ser comparada. As taxas de mutação variam entre as regiões codificadoras e não-codificadoras, entre os genes e nas diferentes regiões de um mesmo gene. Quanto maiores forem as restrições funcionais, menores serão as taxas evolutivas devido ao efeito deletério. A estrutura terciária das proteínas é outro fator que pode influenciar nas taxas de substituição. Nas regiões não-codificadoras, as taxas evolutivas são, em geral, mais elevadas, pois não existe restrição funcional. A escolha da região nucleotídica dependerá do grau de divergência entre os táxons que se deseja estudar. A variabilidade evolutiva de qualquer molécula é o resultado das mutações em contrapartida das restrições impostas pela estrutura e função. Essa taxa de evolução é relativamente constante para algumas seqüências em diferentes grupos taxonômicos o que possibilita prever a evolução destas seqüências dentro de limites de intervalos. Com isso, é possível escolher seqüências específicas que apresentarão grau de variabilidade informativa para o problema em questão.

Deve-se ter cuidado com o mau uso do grau de divergência entre seqüências homólogas na inferência das relações filogenéticas. Se uma parte da molécula é composta de sítios altamente

variáveis e saturados e outra parte com sítios invariáveis, a combinação destes será não informativa, apesar da porcentagem de divergência entre as moléculas parecer apropriada.

Os genes podem ser do DNA mitocondrial ou do DNA nuclear. Com relação a estudos de diversidade interespecífica, os genes mais utilizados também são os mitocôndriais. Algumas seqüências nucleares têm sido utilizadas em alguns grupos, embora a duplicação gênica e a presença de pseudogenes muitas vezes dificultem o seu uso. Além disso, a amplificação de genes nucleares de cópia única é difícil devido a pouca quantidade de DNA alvo e pela presença de introns. Os genes nucleares apresentam, geralmente, taxas mais lentas de evolução.

DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é uma molécula circular pequena, com aproximadamente 16Kb de tamanho. Apresenta constituição altamente conservada, possuindo cerca de 37 genes sendo; 2 genes ribossomais (rRNAs 12S e 16S), 22 genes que codificam RNAs transportadores e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP da cadeia respiratória. As fitas da molécula de mtDNA são denominadas leve (L) e pesada (H), baseada na composição de bases. O mtDNA possui ainda uma região controle (“D-loop”- displacement loop”) envolvida no início da replicação e transcrição (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Com o advento das técnicas de sequenciamento de DNA, o conhecimento da organização do genoma mitocondrial de vertebrados mostrou variação entre níveis taxonômico superiores. A organização conservada é encontrada em mamíferos placentários, tartarugas, peixes, alguns lagartos e no anfíbio *Xenopus*. As aves, outras espécies de lagartos, crocodilianos, mamíferos marsupiais, cobras, tuataras, lampreia, uma espécie de peixe e alguns outros anfíbios apresentam ordens que diferem do que foi inicialmente considerado a “ordem gênica conservada”. Alguns novos rearranjos parecem ser típicos de grupos monofiléticos e o uso destes dados pode ser útil em questão de filogenia envolvendo níveis taxonômicos superiores. Outros aspectos como a estrutura secundária de tRNA e códons de início e de parada de transcrição de genes codificantes para proteínas podem ser úteis para comparação entre genomas mitocondriais de vertebrados (PEREIRA, 2000). Quinn e Mindell (1996) realizaram o sequenciamento de uma parte da região controle mitocondrial de crocodilianos, tartarugas e tuataras para analisar se todos compartilhavam a mesma seqüência no gene mitocondrial que é encontrada em aves, mas não em

trigonatus e um grande número de seqüências parciais, principalmente do citocromo b, estão disponíveis em banco de dados como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A partir dos dados depositados no GenBank, foi possível determinar, mais precisamente, as taxas de substituição de nucleotídeos nessas organelas. A taxa de substituições sinônimas no genoma mitocondrial de vertebrados foi estimada em $5,7 \times 10^{-8}$ / sítio / ano (BROWN et al., 1982). Esse valor é quase 10 vezes maior que o encontrado no genoma nuclear. No caso das substituições não-sinônimas, há uma grande variação entre os 13 genes que codificam proteínas, dependendo das restrições funcionais, assim como nos genes nucleares. As altas taxas de substituição de nucleotídeos nas mitocôndrias podem ser ocasionadas por altas taxas de mutação que, por sua vez, seriam causadas pelo excesso de resíduos metabólicos, pela baixa fidelidade na replicação e pela ausência de mecanismos de reparo (LI, 1997). Os genes ribossomais 12S e 16S são mais adequados para divergências de cerca de 150 milhões de anos atrás (MINDELL; HONEYCUTT, 1990), enquanto o gene do citocromo b parece ser mais apropriado para divergências acima de 80 milhões de anos atrás (IRWIN; KOCHER; WILSON, 1991). Os genes para citocromo b, as subunidades da NADH desidrogenase, os RNA transportadores e os ribossomais 12S e 16S são os mais utilizados em estudos filogenéticos em crocodilianos. O citocromo b (cyt b) é uma proteína monomérica transmembrana que participa da cadeia de transporte de elétrons. Ela é a única proteína produzida como um monômero funcional, as demais são subunidades de complexos enzimáticos. O citocromo b tem domínios conservados e variáveis. Essa enzima é codificada pela cadeia pesada do DNAm (DESJARDINS; MORAIS, 1990).

DNA Nuclear

As seqüências nucleares funcionam como marcadores independentes das seqüências mitocondriais. Existem relatos na literatura da importância do uso de marcadores independentes em estudos filogeográficos e filogenéticos uma vez que interpretações errôneas podem ser feitas com base em apenas marcadores mitocondriais. O *C-mos* é um proto-oncogene que codifica uma proteína envolvida no processo de maturação dos oócitos durante a metáfase II, possui mais de 1000pb e não contem introns (SAINT et al., 1998; YEW et al., 1993). Por ser relativamente conservado, tem sido usado para inferir relação entre vários grupos de crocodilianos (MCALILEY, 2006).

Métodos de Reconstrução Filogenética

Os métodos atuais para a construção de uma árvore filogenética podem ser baseados em matrizes de distância (a matriz de caracteres é transformada em uma matriz de distâncias) ou em análise de estado de caráter (os caracteres são analisados diretamente). No primeiro grupo, estão os métodos UPGMA (agrupamento de pares não ponderados baseado na média aritmética), Quadrados Mínimos (LS, *least squares*), Evolução Mínima (ME, *minimum evolution*) e Agrupamento de Vizinhos (NJ, *neighbor-joining*). Para o método de distância duas etapas são necessárias. A primeira é o cálculo da distância que é feito a partir de diferentes tipos de distância. Para a escolha de qual distância utilizar é necessário considerar a distância média entre as seqüências, razão entre transição e transversão e a heterogeneidade da taxa de substituição entre os sítios. Após a construção da matriz de distância, um algoritmo deve ser escolhido para a reconstrução da topologia. Os mais utilizados são UPGMA, este método considera a árvore filogenética como aditiva e que todos os táxons estão igualmente distantes da raiz (SCHNEIDER, 2003) e o agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*) que foi desenvolvido por Saitou e Nei (1987) e é baseado no princípio da evolução mínima (ME). O método não examina todas as topologias possíveis, mas procura encontrar sequencialmente vizinhos que minimizem o comprimento total da árvore (SCHNEIDER, 2003). Eles são computacionalmente rápidos uma vez que procedem diretamente para a obtenção da árvore, isto é, o algoritmo define o critério de escolha da árvore. No segundo grupo, estão os métodos da Máxima Parcimônia (MP, *maximum likelihood*), da Máxima Verossimilhança (ML, *maximum likelihood*) e inferência Bayesiana (IB, *Bayesian Inference*). Estes métodos de reconstrução utilizam uma suposição evolutiva, para comparar às árvores obtidas e, de acordo com o critério, escolher a(s) melhor(es), exigindo mais tempo computacional. O método de máxima parcimônia (MP) escolhe as árvores que apresentam menor comprimento, isto é, menor número de passos para explicar um conjunto de dados. Na verdade, existem vários métodos distintos que utilizam o critério de parcimônia, porém com diferentes suposições evolutivas. O método de máxima verossimilhança (ML) desenvolvido por Felsenstein(1981) avalia a probabilidade que o modelo evolutivo escolhido tenha gerado as seqüências observadas e, dessa forma, as filogenias são inferidas através da busca de árvores que tenham as probabilidades mais altas. Para calcular a probabilidade da árvore toda é necessário considerar as probabilidades da ocorrência de cada estado em cada nó da árvore como uma função da topologia da árvore e do comprimento dos braços. Para calcular essas probabilidades são utilizados

modelos evolutivos. Para a escolha do modelo mais adequado aos dados pode-se utilizar o programa MODELTEST 3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998) que realiza o teste hierárquico de razão de verossimilhança (hLRT) conjuntamente com o PAUP. O cálculo de verossimilhança é feito para 56 modelos evolutivos. Os valores de LRTs dos modelos são comparados, dois a dois, do mais simples ao mais complexo. Quando um modelo mais complexo não for significativamente melhor do que um mais simples, o modelo mais simples que melhor se ajusta aos dados observados é o escolhido.

Enquanto o método de parcimônia ignora o comprimento dos ramos quando avalia uma árvore, a verossimilhança considera que mudanças são mais prováveis ocorrerem em braços longos do que em curtos e, conseqüentemente, a estimativa do comprimento dos ramos é um aspecto importante do método. Os defensores argumentam que esta diferença na análise das informações contidas na árvore explica a consistência da máxima verossimilhança em muitas situações frente à parcimônia. O uso do método de análise Bayesiana é semelhante ao da máxima verossimilhança, mas difere na noção do uso de probabilidade: as probabilidades não são estimadas baseadas em modelos *a priori*, mas após se aprender alguma coisa sobre os dados (HALL, 2001). A inferência filogenética é baseada nas probabilidades *a posteriori* das árvores filogenéticas. É possível analisar diferentes conjuntos de dados, com distintos modelos para cada um, isto é, permite a análise concatenada. O programa que realiza a análise bayesiana é o MRBAYES v.3.0b4 desenvolvido por Ronquist e Huelsenbeck (2003). Este programa usa as cadeias Markovianas para se aproximar das probabilidades *a posteriori* das árvores filogenéticas. O programa gera dois arquivos importantes. Aquele com extensão .p contém os parâmetros que foram usados ao longo da execução do programa e é usado para determinar quando as cadeias atingem a estabilidade, através da construção de um gráfico de curva. As gerações anteriores ao ponto de estabilidade da cadeia são descartadas do outro arquivo (extensão .t) usado para a leitura das árvores e estimativa do consenso pela regra da maioria dos 50%. Dessa forma, é obtida a árvore com os valores de credibilidade. Outro aspecto importante a ser considerado nas reconstruções filogenéticas diz respeito aos grupos externos. Eles devem, sempre que possível, ser escolhidos com base em dados anteriores que indiquem que são táxons próximos, mas que necessariamente divergiram antes do processo de diferenciação dos táxons do grupo interno. Deve-se utilizar mais que um grupo externo. Várias observações indicam que o uso de grupos

externos distantemente relacionados pode ocasionar erros de enraizamento e, conseqüentemente, reconstruções filogenéticas equivocadas (LEE et. al., 1997).

Não existe na literatura consenso a respeito do melhor método de reconstrução filogenética. Alguns autores afirmam que a etapa de escolha dos genes e o alinhamento das seqüências são muito mais crucial para chegar na melhor árvore que os métodos de reconstrução utilizados. Cada método se baseia em diferentes suposições a respeito dos processos evolutivos, cada um tendo diferentes princípios, particularidades e limitações.

Medidas da confiabilidade dos ramos reconstruídos

Um dos testes mais freqüentes usados para testar o grau de confiabilidade de árvores filogenéticas é o teste de bootstrap (FELSENTEIN, 1985).

Os valores são obtidos usando-se o programa PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2003) através da amostragem aleatória de sítios, com reposição dos dados. Em cada reamostragem, o número total de dados mantém-se constante. Além disso, cada posição de nucleotídeo tem a mesma chance de ser amostrada, o que leva a algumas serem contadas mais de uma vez, enquanto outras não são amostradas. A cada reamostragem uma árvore-réplica é construída. Ao final de todas as réplicas, a árvore final é estimada. Os valores de bootstrap não indicam a chance da topologia estar correta, mas sim o intervalo de confiança dentro do qual está contida a filogenia que seria estimada em repetidas amostragens de muitos caracteres. Valores acima de 70% são considerados bons por alguns autores (HILLIS; BULL, 1993). Outros autores, como Li (1997), consideram bem apoiados valores iguais ou superiores a 95%. Schneider (2003), diz que talvez a melhor alternativa seja uma interpretação conjunta incorporando a sugestão de Li(1997) e o limite de Hillis e Bull (1993), considerando como bootstrap significativo (robusto) valores acima de 95%, independentemente da repetibilidade. Já valores moderados (70-94%) ou fracos (51 a 69%).

O índice de Decaimento de Bremer (BREMER, 1994) também dá uma idéia do grau de apoio do clado. Ele indica o número de mutação que é necessário para quebrar um determinado arranjo. Avalia o número de passos necessários que devem ser inseridos em um ramo para que esse sofra colapso (perca a resolução, gerando uma politomia). Dessa maneira, quanto maior o valor do índice de Bremer para um dado ramo, tanto mais esse se encontra sustentado (ou estável) na topologia proposta. Schneider (2003) compara valores de bootstrap com índice de decaimento e indica certa correlação. Os grupos (clados) que são apoiados moderadamente apoiados

apresentam valores de bootstraps de 77 a 83% e apresentam valores de índice de decaimento inferior a cinco e grupos fortemente apoiados com bootstrap igual 95% apresentam valores de índice de decaimento em geral muito superior a seis.

Estudos moleculares em crocodilianos

Poe (1996) utilizou dados moleculares e morfológicos publicados em crocodilianos para elucidar questões de sistemática, isto porque dados gerados por pesquisas com parasitos, morfologia e osteologia, geraram incongruência na filogenia de crocodilianos. De acordo com a análise de Poe (1996), a distinção do gênero *Melanosuchus* é questionada, pois parece ser taxa irmão dos Caimans, e a nomenclatura de espécie e subespécie dentro de *Caiman* não foi bem resolvida.

Glenn e colaboradores (2002) analisaram 1317-1823 pares de bases de sequência do DNA mitocondrial em 25 *Alligator mississippiensis*, começando na região do citocromo b e terminando na região controle. A diferença entre estes animais foi muito baixa, apenas um alligator do Mississippi diferiu dos demais por uma única substituição silenciosa na região do citocromo b analisada. Na região controle a diferenciação foi um pouco maior, entre os 25 aligátors foram encontrado duas posições variáveis (624 pb examinados). As seqüências analisadas foram comparadas com seqüências homólogas de alligator chinês (*A. sinensis*). Ambas as espécies apresentaram um espaço não-codificado entre o citocromo b e tRNA^{Thr}. O autor da ênfase na necessidade de inclusão de um maior número de espécies de crocodilianos nesta análise para saber se é uma característica conservada entre crocodilianos. O Alligator chinês diferiu do *A. mississippiensis* em 17,5% em nível de nucleotídeos e 13,8% em nível de aminoácidos.

Sabe-se, por meio de estudos recentes (FARIAS et al., 2004), que *M. niger* e *C. crocodilus* apresentam diferenças quanto à distribuição dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo b. Dentre quatro populações de *M. niger* e três de *C. crocodilus*, houve significativa estrutura genética entre as da Guiana Francesa e as da bacia Amazônica. Os resultados apresentados em Faria et al.(2004) também indicam, que as populações estão em expansão populacional e sugerem diferentes unidades de manejo para populações de *M. niger* de acordo com o tipo de água (preta ou branca). Vasconcelos (2005) utilizou 1.080pb da região do gene Citocromo b para 125 indivíduos de *C. crocodilus* e 132 indivíduos de *M. niger* provenientes de 9 e 11 localidades, respectivamente, em diferentes regiões da Amazônia Brasileira, Peru, Equador e Guiana Francesa. Neste trabalho foi possível identificar padrões genéticos biogeográficos. Em

Caiman crocodilus foi encontrado 38 haplótipos e *M. niger* 41 haplótipos. Ambas as espécies apresentaram elevada diversidade gênica e baixa diversidade nucleotídica. As análises de clados agrupados indicaram expansão, colonização a longa distância e fragmentação no passado.

Gatesy et al. (2003), utilizaram uma abordagem combinada de dados morfológicos e moleculares com o objetivo de elucidar incongruências na filogenia de crocodilianos. Neste trabalho os autores utilizaram 240pb do gene mitocondrial da citocromo b. DNA mitocondrial, DNA nuclear e morfologia foram analisadas em conjunto e a filogenia resultante consta na Figura 2.2. Como pode ser observado no Cladograma a filogenia dos crocodilianos brasileiros não está bem definida, com um baixo índice de decaimento.

Figura 2.2 - Cladograma ilustrando as relações filogenéticas entre crocodilianos existentes e extintos (GATESY et al., 2003). Os valores dentro dos círculos correspondem ao suporte do índice de decaimento

Brochu (2003) fez uma revisão da filogenia de crocodilianos, com os dados moleculares e dados de fósseis de museu, seus dados corroboraram com Poe (1996), encontrando uma forte relação entre *Caiman latirostris* e *melanosuchus niger*.

McAliley et al. (2006) realizaram outro estudo de filogenia de crocodilianos utilizando dados morfológicos e moleculares. Neste trabalho foi sequenciado 302pb da região do gene nuclear *C-mos*. Os resultados podem ser observados na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Árvore Bayesiana ilustrando a relação filogenética entre os crocodilianos usando o modelo Kimura 2 Parâmetros com seqüências do gene nuclear *C-mos*

Neste trabalho o autor relata que a árvore Bayesiana construídas com estas seqüências de DNA nuclear possui baixos valores de suporte de cada nó entre as espécies muito próximas, só apresenta valores altos de suporte para nós maiores (normalmente para agrupamento de gêneros). Outras regiões do DNA mitocondrial também foram utilizadas (região controle e citocromo b) neste trabalho, mas não foram incluídas todas as espécies brasileiras.

Recentemente HRHEK (2008) utilizou o gene citocromo b, o gene nuclear RAG1 e o oncogene MYC para inferir a relação filogenética dos crocodilianos sul americanos no Rio Madeira. A relação filogenética encontrada no DNA mitocondrial pode ser observada na árvore de máxima verossimilhança (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Árvore de Máxima verossimilhança ilustrando a relação filogenética entre os crocodilianos usando seqüência do gene mitocondrial Cyt b

No gene nuclear encontraram pouca diferença e não foi possível a utilização de uma árvore que melhor representasse os dados, sendo assim os resultados foram expostos em redes de haplótipos. Neste trabalho o autor concluiu que a relação entre *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare* não esta bem clara.

Para analisar os questionamentos de Poe(1998) e outros pesquisadores, quanto a distinção do gênero *Caiman* e *Melanosuchus* e a relação entre *Caimam crocodilus* e *Caiman yacare* que como percebemos ainda permanece obscura. O presente trabalho teve como objetivo analisar a relação filogenética das espécies brasileiras de crocodilianos utilizando um fragmento maior de mtDNA (1673pb) consistindo da sequência parcial do gene citocromo b, as sequências dos genes tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro} e tRNA^{Phe}, uma sequência parcial da região D-loop (Região Controle) e 625pb do gene nuclear *c-mos* em indivíduos de populações distribuídas em diferente regiões no Brasil.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Amostragem

Utilizamos cinco amostras de *Caiman latirostris* localizadas: na da Ilha do Cardoso em São Paulo, Banhado do Taim no Rio Grande do Sul, Charqueada em São Paulo, Bonito no Mato Grosso do Sul e Natal no Rio Grande do Norte; Quatro amostras de *Caiman crocodilus* localizadas: No Rio Araguaia no Mato Grosso, Reserva Cuniã em Rondônia, duas amostras coletadas na colônia em cativeiro da UNESP de Rio Claro; Quatro amostras de *Caiman yacare* localizadas: duas amostras do Mato Grosso do Sul e duas amostras coletadas na colônia em cativeiro da UNESP de Rio Claro; Quatro amostras de *M. niger* localizadas: Cabo Orange no Amapá, Reserva de Piratuba no Amapá, No Rio Araguaia no Mato Grosso e uma amostra coletada na colônia em cativeiro da UNESP de Rio Claro; quatro amostras de *Paleosuchus palpebrosus* localizadas: Cabo Orange no Amapá, Pantanal no Mato grosso, Rio Amazonas e uma amostras coletadas na colônia em cativeiro da UNESP de Rio Claro; quatro amostras de *Paleosuchus trigonatus* localizadas: duas próximas de Manaus e duas no Rio Madeira no Amazonas.

Método de captura e imobilização de jacaré

As capturas dos animais foram feitas à noite, manualmente ou com o auxílio de laço de cabo de aço, após visualização com facho de luz intensa do tipo *sealed beam* e aproximação em barco, conforme descrito por Hutton *et. al.* (1987) e Walsh (1987). Sua imobilização foi mecânica, dispensando-se o uso de anestésicos ou relaxantes musculares, conforme realizado por Verdade (1997b). As coletas foram respaldadas pela licença 007/03 IBAMA/RAN.

Coleta e armazenagem das amostras

O sangue foi coletado através de punção do ramo dorsal da veia cava superior, que corre no interior da coluna vertebral, conforme descrito por Olson (1975) para grandes répteis. Após a coleta, o sangue foi conservado em tampão de lise (Hoelzel, 1992), cuja composição é: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM NaCl; 0.5 % SDS (p/v). Os animais do estado do Mato Grosso foram capturados com auxílio do IBAMA/RAN onde foram coletadas as escamas em procedimento padrão muito utilizados em estudos de captura e recaptura. Estes procedimentos incluem laçar o animal, imobilizá-lo, medir comprimento corporal, determinar o sexo e retirar a escama para análise de DNA. As escamas foram armazenadas em Etanol 94%.

Extração do DNA

O DNA foi extraído do sangue segundo o método CTAB, que consiste em adicionar 50 μ l de NaCl 5M e 40 μ l do produto CTAB 10% em 200 μ l da mistura (2ml de sangue em 8 ml de solução tampão). Aquecimento da solução por 10 min. à 65°C para que as proteínas sejam precipitadas enquanto o DNA fica adsorvido ao CTAB. Adiciona-se 300 μ l de clorofórmio e centrifuga-se à 12000 rpm por 10 min., o sobrenadante é retirado para um tubo eppendorf limpo sem tocar na fase orgânica. O DNA é precipitado dessa solução com 300 μ l isopropanol absoluto, centrifugando-se à 12000 rpm por 10 min., descartando o sobrenadante. Faz-se duas lavagens com 250 μ l Etanol 70%, com centrifugações de 5 min. a 12000 rpm em cada lavagem. O pellet é seco em estufa a 37°C por 30 min. e suspenso em 50 μ l de H₂O milliQ e armazenado em *freezer* à -20°C.

O DNA da escama foi isolado por digestão com Proteinase K, que é uma enzima proteolítica não específica, e solução SDS, um detergente iônico que dissolve membranas

celulares, pois solubiliza lipídeos e desagrega complexos macromoleculares. Foram cortados pedaços (de 2 a 3mm) da escama caudal de cada indivíduo, e posteriormente foram acrescentados: 500µl de tampão de lise celular (10mM Tris, 100mM EDTA, 2% SDS; PH 8.0), 15µl Proteinase K (20mg/ml) e incubado *overnight* à 55 °C. A proteína é precipitada dessa solução com 200µl de Acetato de Amônio (7,5M) incubando-se no gelo por 20-30, centrifugando-se à 14000 rpm por 5 min., descartando o sobrenadante. O DNA é precipitado dessa solução com 500 µl isopropanol absoluto, centrifugando-se à 12000 rpm por 10 min., descartando o sobrenadante. Faz-se duas lavagens com 500 µl Etanol 70%, com centrifugações de 5 min. à 12000 rpm em cada lavagem. O pellet é seco em estufa a 37°C por 30 min. e suspenso em 50 µl de H₂O MilliQ e armazenado em *freezer* à -20°C. Após as extrações as amostras foram lidas em espectrofotômetro para determinar a quantidade de DNA extraída e assim proceder às devidas diluições para proceder em seguida a PCR. O espectrofotômetro (HITACHI U-2000) foi utilizado segundo instruções do aparelho. As amostras extraídas obtiveram uma média de 100 ng/ µl, sendo então padronizado para a diluição de 20 ng/ µl, sendo utilizado em seguida a quantidade de 5 µl em cada reação de PCR.

Desenho dos primers

Para o sequenciamento da região do DNA mitocondrial foram sintetizados os *primers* utilizados por Glenn (2002). Como nem todas as amplificações funcionaram foram desenhados novos *primers* de acordo com a região de DNA mitocondrial com seqüências disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) para *Alligator mississippiensis* (AF318548-AF318557) e *Caiman crocodilus* (NC002744). Estas duas seqüências foram alinhadas no programa Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e os *primers* foram desenhados em regiões conservadas observadas nas duas espécies com a utilização do programa *Primer3* (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>).

A qualidade dos *primers* foi verificada com o auxílio do programa *Net Primer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>). A região de anelamento dos *primers* pode ser observada na Figura 2.5 e as seqüências dos *primers* desenhados e o tamanho da região flanqueada podem ser observados na Tabela 2.1.

Figura 2.5 - Posição dos primers utilizados para a amplificação do DNA mitocondrial de crocodilianos brasileiros.

Tabela 2.1 – Primers utilizados para amplificar seqüências mitocôndrias. Em azul e vermelho estão os novos primers desenhados

Posição	Seqüência 5'→ 3'	Temperatura de anelamento °C
14254	ATGACCCACCAACTACGAAAAT (22)	58
14650	CTTTCTCATCCGTCGCCTAC (20)	57
14731	TGTCGTGCCATGAATTTGAG (20)	58
15485	AACCAGTAACTCCCCATA (19)	56
15715	GCCTTGTAAGACAGAGAC (18)	52
16180b	CTCAACCCGCACCGTCTT (18)	56
14779	GGAATGGAAGGAGGAAGTGT (20)	57
14985	GGGCAGTAAAGCGTGTGAGT (20)	57
15798	TTAGAAYGTCGGCTTTGG (18)	57
16056	GGGCTTGAAACTAGTAAC (18)	52
16180a	AAGACGGTGC GGGTTGAG (18)	-
103	GGTTGATGTGCCTGATGCC (19)	-

Além destes *primer* descritos para DNA mitocondrial utilizamos *primers* desenvolvidos para o DNA nuclear na região do gene *C-mos* (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Primers utilizados para amplificar seqüências de DNA nuclear (*C-mos*)

Primers	Seqüência 5'→ 3'	Temperatura de anelamento °C
Cmos.D1	ACTGGGATCAAGTGTGCC	56
Cmos.R1	AGATGTCTGCTTTGGGGGTG	56
Cmos.D2	GCTGTGAAGCAGGTGAAGAA	55
Cmos.R2	CTGGGGCACGGTGTGTAT	55

Amplificação

As condições para uma reação de amplificação da região mitocondrial com um volume final de 25 μ L, foram: 1x tampão de PCR (20mM Tris HCl, pH 8.4; 50mM KCl), 1.5 mM de Cloreto de Magnésio, 0.2 mM de dNTP, 0.4 μ M de cada *primer* do par, 0.02 U/ μ L de Taq DNA polimerase e 5 μ L da amostra de DNA (20ng/ μ L).

O programa de amplificação foi: (1) 94°C por 3 min.; (2) 94°C por 45 seg.; (3) Temperatura de anelamento do par de “*primers*” por 1 min. (58 °C); (4) 73°C por 1 min. e 15 seg.; (5) Repetir n ciclos contendo os passos 2, 3 e 4; (6) 4°C indefinidamente.

Purificação dos produtos de PCR

Após a amplificação foi feita a purificação dos produtos da PCR, que consiste na retirada dos *primers* e dos resíduos de dNTP para obtenção de seqüências de melhor qualidade. Para esta finalidade procedeu-se o seguinte protocolo recomendado no *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Health Care).

A coluna (*Kit*) foi encaixada no tubo coletor (*Kit*), sendo adicionados 500 μ L de *Capture buffer* e 20 μ L do produto de PCR. Após centrifugação por 1 minuto a 14400g o tubo coletor foi descartado e um novo tubo foi encaixado à coluna. Foram adicionados à coluna 500 μ L de *Wash buffer* (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) seguindo-se de centrifugação por 1 minuto a 14400g. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e a esse foram adicionados 30 μ L de água *Milli-Q* seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugação por 1 minuto a 14400g. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% juntamente com o padrão de concentração pGEM4Z (40ng/ μ L) para a verificação da concentração.

Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada segundo o protocolo DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham BioSciences).

Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados: 3 μ L de Tampão *Save Money* (200mM de Tris pH 9, 0,5 mM MgCl₂), 1 μ L de *primer* (2,5 pmoles/ μ L), 2 μ L de *Kit ET*

Terminator e 50 ng de DNA. O programa utilizado para a reação de seqüenciamento compreendeu as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60 °C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto, totalizando 25 ciclos. Foram realizadas pelo menos duas reações de seqüenciamento para cada indivíduo.

Purificação da Reação de Seqüenciamento

Para a purificação da reação de seqüenciamento foram adicionados 80 µL de isopropanol 65% a reação, seguindo-se de homogeneização (*vórtex*) e incubação no escuro por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação por 45 minutos a 3200g, o sobrenadante foi removido por inversão e foram adicionados 150 µL de etanol 60% seguindo-se de centrifugação por 15 minutos, a 3200g a temperatura ambiente. O *pellet* foi desidratado por 1 hora a temperatura ambiente e ressuspendido em 10 µL de formamida. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos, resfriadas em gelo e aplicadas em seqüenciador automático *ABI 3100* (*Applied Biosystems*).

Alinhamento das seqüências nucleotídicas

Foram utilizados dois indivíduos de cada espécie para o seqüenciamento, o alinhamento e qualidade das seqüências foram feitos utilizando os programas *Phred/Phrap/Consed* (EWING et al., 1998; GREEN et al., 1998; GORDON et al., 1998) e *BioEdit* (HALL, 1999), quando a qualidade ou o alinhamento não estavam bons o indivíduo era seqüenciado pela terceira vez. Posteriormente, as seqüências foram comparadas entre si e com as seqüências já depositadas no *Genbank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análise dos dados

O alinhamento das seqüências foram feitos pelo método *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) e lido posteriormente pelo *BIOEDIT* para inspeção visual do alinhamento e refinado manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo programa *PAUP* (*Phylogenetic Analysis Parsimony and Other Methods*), trata-se de um excelente aplicativo o qual disponibiliza diversos métodos para análises filogenéticas. Estão disponíveis no sistema métodos baseados em distância, parcimônia e verossimilhança (*Maximum Likelihood*). Foi desenvolvido por David Swofford

(Faculty of Florida State University (FSU) - School of Computational Sciences and Information Technology - [CSIT](http://csit.fsu.edu/)). O site onde o programa pode ser encontrado é <http://paup.csit.fsu.edu/>.

A qualidade da informação filogenética disponível deve ser verificada antes de iniciar a análise dos dados (SCHNEIDER, 2003). Normalmente a taxa de transição é maior que a taxa de transversão. Entretanto, à medida que aumenta a divergência entre duas seqüências, o número de transições observadas em relação ao das transversões decresce em função da saturação. A plotagem do número de transições e transversões versus a divergência fornecem uma imagem visual do nível de saturação das substituições. O programa DAMBE (XIA; XIE, 2001) foi utilizado para gerar um gráfico que mostra se há ou não saturação nos dados. Para a determinação da qualidade dos dados é importante antes de qualquer análise filogenética a verificação do sinal filogenético. Esta verificação foi realizada pelo teste de Permutação (PTP- *Permutation Test Probability*) e pelo teste G1, estes dois testes fazem parte do programa PAUP. Os testes de permutações (PTP) usam os escores das árvores mais parcimoniosas como uma medida da correlação hierárquica. Eles comparam o escore da árvore mais parcimoniosa obtida a partir dos dados originais com escores de árvores obtidas através de permutação ao acaso. A hipótese nula (ausência de sinal filogenético) é que o escore da árvore mais parcimoniosa, obtido dos dados reais, estaria dentro da curva da distribuição dos valores obtidos através permutações ao acaso da matriz de dados.

Após o alinhamento das seqüências e os testes para verificação da qualidade dos dados o PAUP foi utilizado para a construção da filogenia pelo método baseado em caracteres (Máxima Parcimônia – MP e Máxima verossimilhança –ML) e pelo método baseado em distância (Evolução Mínima - ME), O programa M. O programa MRBAYES v.3.0b4 desenvolvido por Ronquist e Huelsenbeck (2003) foi utilizado para análise bayesiana. Para análise de métodos baseados em distância e máxima verossimilhança foi utilizado o programa MODELTEST (POSADA; CRANDAL,1998) para escolha do modelo de evolução do DNA que melhor se ajusta aos nossos dados.

2.2.2 Resultados e Discussão

Conseguimos a amplificação de 1674 pares de bases (pb) correspondentes a uma parte do gene citocromo b (Figura 2.6) e região controle mitocondrial (Figura 2.7) para todas as espécies

de crocodilianos brasileiros: *Melanosuchus niger*, *Caiman crocodilus*, *Caiman yacare*, *Caiman latirostris*, *Paleosuchus palpebrosus* e *Paleosuchus trigonatus*.

Figura 2.6 - Eletroforese em gel 1%, corado com Brometo de Etídio mostrando o fragmento do gene citocromo b. *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus trigonatus* (PT) e *Caiman latirostris* coletado em: João Pessoa (JP); Alagoas (AL); Ilha do Cardoso-SP (IC); Rio Grande do Sul (RS); Rio Grande do Norte (RN) Dura Flora na região de Piracicaba (DF), Porto de areia na região de Piracicaba (PoA); Charqueada na região de Piracicaba (CH); Mini Pantanal na região de Piracicaba (PaT), Controle negativo (CN) e Padrão de peso molecular (Pgen)

Figura 2.7 - Fragmento da região controle mitocondrial amplificado com os primers 15485-16180. *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus trigonatus* (PT) e *Caiman latirostris* coletado em: João Pessoa (JP); Alagoas (AL); Ilha do Cardoso-SP (IC); Rio Grande do Sul (RS); Rio Grande do Norte (RN) Dura Flora na região de Piracicaba (DF), Porto de areia na região de Piracicaba (PoA); Charqueada na região de Piracicaba (CH); Mini Pantanal na região de Piracicaba (PaT), Controle negativo (B) e Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes (PM)

A otimização da amplificação da região mitocondrial 12S com os *primers* 16180 e 103 não foi possível para nenhuma das espécies nesta região. Há a ocorrência de muitas bandas inespecíficas como pode ser visualizadas na Figura 2.8.

Figura 2.8 - Fragmento da região 12S. *Paleosuchus trigonatus* (PT), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Caiman latirostris* (CL), *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY) e Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes (PM)

Esta região 12S é muito variável e de difícil amplificação, Steven Poe (1996) descreve a tentativa de alguns autores em utilizarem esta região para análise filogenética, mas os resultados mostram incongruência significativa entre o conjunto de dados e muita homoplasia.

Figura 2.9 - Fragmento da região nuclear RAG1. *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY), *Caiman latirostris* (CL), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Paleosuchus trigonatus* (PT) e Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes (PM)

Depois de várias tentativas de amplificação de uma região nuclear RAGI sem sucesso (Figura 2.9), optamos pelo gene nuclear *C-mos* e conseguimos a amplificação de uma região de 625 pb com os primers *C-mos.D1* e *C-mos.R1* descrito acima (Tabela 2.2).

Figura 2.10 - Fragmento da região nuclear *C-mos*. Marcador de peso molecular: Low DNA Mass Ladder (M), *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY), *Caiman latirostris* (CL), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Paleosuchus trigonatus* (PT), controle negativo (CN)

Para as análises posteriores do DNA mitocondrial, alinhamos as duas seqüências (cyt b e região controle) correspondendo a um segmento de 1.673pb do DNA mitocondrial. O conjunto de dados gerou 1339 sítios monomórficos e 424 sítios polimórficos (ANEXO A), foi realizado a conversão da seqüência em aminoácidos para checar a ausência de stop códons nas seqüências e ao mesmo tempo se confirmar a presença de um códon de parada incompleto no final do gene citocromo b, anteriormente relatado em literatura (GLENN et al., 2002). Foram incluídas nas análises as seqüências de *Alligator mississippiensis* e *Alligator sinensis* disponível no banco de dados do GenBank. O conjunto de dados *C-mos* gerou 610 sítios monomórficos e apenas 15 sítios polimórficos, dos dezoito indivíduos analisados encontramos nove haplótipos diferentes. (ANEXO C).

A presença de saturação foi verificada, como podemos observar no gráfico onde temos as transições e as transversões em função da distância (Figura 2.11 e 2.12). A distribuição das transições (I^S) e das transversões (I^V) segue praticamente uma reta mesmo quando a divergência é maior. Este padrão sugere que não há saturação neste segmento de genes utilizados, sendo assim, temos consistência em nossa análise filogenética e podemos continuar com as análises. Para nossos dados de DNA nuclear e mitocondrial, o MODELTEST sugeriu o modelo **TIM+ G**. A

Figura 2.13 e 2.14 mostram o resultado das árvores filogenéticas baseadas Máximas Verossimilhança, ilustrando as relações filogenéticas com os respectivos bootstrap para cada nó para as seis espécies de crocodilianos brasileiros. Como os resultados foram semelhantes para Análise bayesiana o bootstrap para cada nó desta análise também foram representado.

Figura 2.11 - Gráfico de transições (I^S) e das tranversões (I^V) versus distância do gene citocromo b e Região controle nos crocodilianos estudados

Figura 2.12 - Gráfico de transições (I^S) e das tranversões (I^V) versus distância do gene *c-mos* nos crocodilianos estudados

Figura 2.13 - Cladograma ilustrando as relações filogenéticas das espécies brasileiras de crocodilianos com seqüenciadas do citocromo b e da região controle, com os respectivos bootstrap para cada clado NA= Análise bayesiana; MV= Máxima verossimilhança

Os resultados com DNA mitocondrial estão de acordo com os dados publicados por Poe (1996) e Brochu (2003), onde combina caracteres morfológicos e moleculares. As espécies *Alligator mississippiensis* e *Alligator sinensis* são os grupos mais distantes de acordo com os cladogramas, *Paleosuchus palpebrosus* e *Paleosuchus trigonatus* estão agrupados e mais distantes do agrupamento com as demais espécies brasileiras, fato já descrito na literatura, que cita o gênero *Paleosuchus* como o mais distante dos demais gêneros brasileiros (Poe, 1996; BROCHU, 2003; GATESY, 2003; HRBEK, 2008).

As espécies mais próximas foram *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*, confirmando relatos anteriores, onde vários autores classificam estas duas taxa como subespécies (*C. crocodilus crocodilus* e *C. crocodilus yacare*). A espécie *Caiman latirostris* se agrupou com *Melanosuchus niger*, estes dois grupos estão mais relacionados entre si, do que com *C. crocodilus* e *C. yacare*, corroborando com os resultados de Poe (1996) e Brochu (2003), que sugerem que *caiman* e *melanosuchus* são taxa irmãos altamente correlacionados e que não tem a necessidade de serem considerados gêneros diferentes, propondo a mudança de *Melanosuchus niger* para *Caiman niger*. O indivíduo um de *Melanosuchus niger* coletado em Piratuba no estado do Amapá, se encontra mais distante dos demais indivíduos da espécie (Figura 2.13), corroborando com o seu fenótipo bem diferenciado dos demais (Andrade, comunicação pessoal).

Para o gene nuclear (Figura 2.14) encontramos uma distância bem menor entre as espécies, o que era esperado, pois genes nucleares são geralmente mais conservados que genes mitocôndrias (ANEXO B e ANEXO D). A espécie *Alligator sinensis* foi a mais distante. A relação dentro do gênero *Paleosuchus* e entre este gênero e as demais espécies brasileiras estão bem definida nos dois cladogramas com dados de DNA mitocondrial e nuclear.

Os resultados para *C-mos* foi um pouco diferente como podemos visualizar na Figura 2.14, onde percebemos que a espécie *Caiman latirostris* está mais relacionada com *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*, mas ainda percebemos uma forte relação dos *Caimans* com *Melanosuchus* (ANEXO D). Percebemos também que *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare* estão intimamente relacionados, sendo que o indivíduo dois de *C. crocodilus* está agrupado com os demais indivíduos de *C. yacare*. Este fato é interessante, pois este indivíduo foi coletado na Reserva Cuniã, em Rondônia, e alguns biólogos relataram a semelhança deste indivíduo com *Caiman yacare* (Mendonça, comunicação pessoal). Pode se tratar de um híbrido, mas este padrão não foi observado para o fragmento de DNA mitocôndria, como pode ser observado na Figura 2.14 o mesmo indivíduo está agrupado com os demais indivíduos de *Caiman Crocodilus*. Sendo assim a relação entre o *status* específico dos táxons *Caiman Crocodilus* e *Caiman yacare* ainda permanece obscuro. Brochu (2003) relata que a revisão taxonômica para estas táxons é prematura, pois temos falta de apoio nas análises combinadas de dados morfológicos e dados moleculares, assim como nestes dados separadamente.

Figura 2.14 - Cladograma ilustrando as relações filogenéticas das espécies brasileiras de crocodilianos, com seqüências do DNA nuclear *C-mos*, com os respectivos bootstrap para cada clado. NA= Análise bayesiana; MV= Máxima verossimilhança

Para verificação do Sinal filogenético utilizamos o Teste de Permutação (Permutation Test Probability - PTP). O escore de máxima parcimônia obtido dos dados reais encontra-se bem fora dentro da curva da distribuição dos valores obtidos através permutações ao acaso da matriz de dados, atestando forte sinal filogenético. Sendo assim a árvore filogenética construída com as seqüências do DNA mitocondrial (gene citocromo b e região controle) e nuclear foi estabelecida, evidenciando bem a filogenia das espécies estudadas.

2.3 Conclusões

A árvore filogenética construída com dados de seqüências DNA mitocondrial e nuclear foram semelhantes aos estudos filogenéticos encontrada por outros autores, apoiando a mudança do gênero *Melanosuchus* para *Caiman*. A relação *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare* ainda permanece mal resolvida, com os nossos dados não podemos inferir que se trata de uma espécie ou subespécies, podemos apenas afirmar que são taxa irmãos fortemente relacionados.

Referências

- ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. O emprego de enzima de restrição para detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 14, p.143- 161.
- AVISE, J.C. **Natural history and evolution: molecular markers**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.
- BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics : the international journal of the Willi Hennig Society**, Westport ,v. 10,n. 3, p. 295-304, 1994.
- BROCHU, C.A. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, Palo Alto, v. 31, p. 357–397, 2003.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 18, p. 225-239, 1982
- DESJARDINS, P.; MORAIS, R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome-a novel gene order in higher vertebrates. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 212, p. 599-634, 1990.
- FARIAS,I.P.; HRBEK,T.; DA SILVEIRA,R.; MONJELÓ, L.A.S.; THORBJARNARSON, J; THOISY,B. Population genetic structure of Amazonian Crocodilians. **Animal Conservation**, Cambridge, v. 7, p. 265-272, 2004.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.- **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 17, p. 368-376, 1981.
- _____. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

GATESY, J.; AMATO, G.; NORELL, M.; DESALLE, R.; HAYASHI, C. Combined support for wholesale taxic atavism in Gavialine crocodilians. **Systematic Biology**, Washington , v. 52, n. 3, p. 403-422, 2003.

GIRIBET, G.; WHEELER, W.C. On gaps. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 13, n. 1, p. 132-143, 1999.

GLENN, T.C.; STATON, J.L.; VU, A.T.; DAVIS, L.M.; BREMER, J.R.A.; RHODES, W.E.; BRISBIN, I.L.; SAWYER, R.H. Low mitochondrial DNA Variation Among American Alligators and a Novel non-coding region in crocodilians. **Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution**, New York, v.294, p.312-324, 2002.

HALL, B.G. **Phylogenetic trees made easy: a how to manual for molecular biologist**. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. 179 p

HILLIS, D.; BULL, J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, Washington, v. 42, p. 182-192, 1993.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular systematics**. 2nd ed. Local: Sinauer, 1996. 656p.

HOEZEL, A.R. **Molecular genetic analysis of populations**. Oxford IRL Press, 1992. 315 p.

HRBEK, T.; VASCONCELOS, W.R.; REBELO, G; FARIAS, I.P. Phylogenetic relationships of South American Alligatorids and the Caiman of Madeira River. **Journal Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 309A, p. 588–599, 2008.

IRWIN, D.M.; KOCHER, T.D., WILSON, A.C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991.

JANKE, A.; ERPENBECK, D.; NILSSON, M.; ARNASON, U. The mitochondrial genomes of the iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodylus*): implications for amniote phylogeny. **Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences, London**, v. 268, p. 623-631, 2001.

LEE, K.; FEINSTEIN, J.E ; CRACRAFT, J. The phylogeny of ratite birds: resolving conflicts between molecular and morphological data sets. In: MINDELL, D.P. (Ed.). **Avian molecular evolution and systematics**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 173-211.

LI, W.H. **Molecular evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 487 p.

MCALILEY, L.R.; WILLIS, R.E.; RAY, D.A.; WHITE, P.S.; DENSMORE, L.D. Are crocodiles really monophyletic? Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 39, p. 16–32, 2006.

MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

MINDELL, D.P. **Avian molecular evolution and systematics**. New York: Academic Press, 1997. 382p.

MINDELL, D.P.; HONEYCUTT, R.L. Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic applications. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 21, p. 541-566, 1990.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Symposia on Quantitative Biology**, Cold Spring Harbor, v. 51, p. 263-273, 1986.

OLSON, G.A.; HESSLER, J.R.; FAITH, R.E. Techniques for blood collection and intravascular infusion of reptiles. **Laboratory Animal Science**, Joliet, v. 25, p. 783-786, 1975.

PEREIRA, S.L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, p. 745-752, 2000.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, Oxford, v.14, p.817-818, 1998.

POE, S. Data set incongruence and the phylogeny of crocodilians. **Systematic Biology**, Washington, v.45, p.393-414, 1996.

QUINN, T.W.; MINDELL, D.P. Mitochondrial gene order adjacent to control region crocodile, turtle, and tuatara. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.5, p.344-351, 1996.

RAY, D.A.; DENSMORE, L. The crocodilian mitochondrial control region: general structure, conserved sequences, and evolutionary implications **Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution**, New York, v. 294, p. 334-345, 2002.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p.1572-1574, 2003.

SAINT, K.M.; AUSTIN, C.C.; DONNELLAN, S.C.; HUTCHINSON, M.N. Cmos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 10, p. 259-263, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética**: um guia prático. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 114 p.

VASCONCELOS, W.R. **Diversidade Genética e Estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) da Amazônia**. 2004.

79 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, New York, v.92, p.371-373, 2001.

YEW, N.; STROBEL, M.; VANDE WOUDE, G.F. Mos and the cell cycle: the molecular basis of the transformed phenotype. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 3, p. 19–25, 1993.

3 DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE CROCODILIANOS BRASILEIROS PELA ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Resumo

Um aspecto importante da conservação da biodiversidade é a formulação de leis de controle do uso, comércio e exportação de produto de animais. A identificação correta das espécies é de fundamental importância para a escolha de métodos de controle mais adequados. Neste trabalho, marcadores espécie-específicos produzidos por PCR-RFLP baseados em sequência do gene *citocromo b* no DNA mitocondrial foram desenvolvidos para a identificação molecular das seis espécies brasileiras de crocodilianos. Esta técnica além de importante na identificação das espécies poderá ser utilizada como metodologia oficial de controle da comercialização e exportação de carne e couro de jacaré.

Palavras-chave: PCR-RFLP; Citocromo b; Crocodilianos brasileiros

Abstract

An important aspect of biodiversity conservation is the formulation of laws for the control of use, trade and exportation of animal products. The correct identification of the species is of fundamental importance for choosing the most appropriate control methods.

In the present work, species-specific PCR-RFLP markers, based on mitochondrial cytochrome b gene sequences, were developed for the molecular identification of six Brazilian crocodilian species. This technique is not only important for the identification of the species but can also be used as an official methodology for controlling exportation and commercialization of leather and meat.

Keywords: PCR-RFLP; Cytochrome b; Brazilian crocodilian

3.1 Introdução

Um aspecto importante da conservação da biodiversidade é a formulação de leis de controle do uso, comércio e exportação de produto de animais e plantas. No caso específico de jacarés, o problema é ainda maior. Existe uma cultura de consumo de produtos destes animais e até que esta desapareça, o aumento da escassez causado pelo controle do produto faz com que o preço aumente, estimulando os comerciantes a burlar a lei (BAKER et al., 1996; PALUMBI e CIPRIANO, 1998). A quantidade de dinheiro envolvida neste comercio pode ser alta. Por exemplo, a pele de crocodilo pode custar de U\$ 300-500 por pele (BRAZAITIS et al., 1998), em 2008 a pele do Jacaré-açu esta custando U\$ 3,00 o cm linear (ANDRADE, comunicação pessoal). O problema é ainda mais complicado quando existem espécies próximas cujo comércio é legalizado ou quando a espécie protegida pode ser comercializada se proveniente de cultivo. Nesses casos, as fazendas de cultivo podem ser usadas para a legalização fraudulenta das espécies protegidas. Já se observou que a comercialização mundial de peles de jacaré (gênero *Caiman*) é superior a um milhão de peles por ano, das quais apenas a metade vem de fontes legalizadas (BRAZAITIS et al., 1998).

A espécie brasileira do gênero *Caiman yacare* tem sua importação proibida para os EUA. Em uma tentativa de remover esse bloqueio de importação, foi argumentado que essa espécie teria três subespécies, uma das quais poderia ser explorada (BRAZAITIS et al., 1996). No entanto, estudos de padrões de manchas e relevo da pele demonstraram que esta subdivisão não era justificada (BRAZAITIS et al., 1998) e a importação de pele de *Caiman yacare* pelos EUA continuou sendo proibida. Às vezes, a identificação das peles pode ser feita pelo padrão de manchas e pelo seu relevo. No entanto, em outras situações, como na comercialização da carne, essa identificação não é tão simples. Nesses casos, marcadores moleculares podem ser de extrema valia, pois permitem a identificação não ambígua mesmo de produtos industrializados, como carne salgadas, cozidas, defumadas ou enlatadas (RAM et al., 1996; QUINTERO et al, 1998).

Métodos moleculares foram utilizados para demonstrar que um carregamento de carne de caranguejo (*Paralithodes camtchatica*) havia sido obtido em uma área de sua distribuição onde era ilegal a pesca (SEEB et al., 1990). Em outro caso, esses métodos foram usados para provar na justiça que a carne de haliote (do gênero *Haliotis*) vendida na África do Sul como “haliote australiano” na verdade pertencia a *haliote midae*, uma espécie local cuja pesca estava proibida (SWEIJID et al., 1998). A demonstração mais dramática e elegante do uso de marcadores

moleculares foi o trabalho feito pelo grupo de Stephen Palumbi com o comércio ilegal de carne de baleia no Japão. Estima-se que de 1920 até 1986, quando uma moratória na pesca indiscriminada das baleias foi imposta, mais de um milhão de baleias tenham sido mortas pelos baleeiros (BAKER; PALUMBI, 1996). A moratória teve um efeito importante na proteção das baleias. No entanto, havia um buraco na lei, permitindo que as baleias pescadas “para fins científicos” fossem consumidas nos países onde elas tivessem sido pescadas, ou seja, proibindo a exportação, mas permitindo o consumo (BAKER et al., 2000). Com isto o Japão passou a ser o país com o maior número de pesquisa sobre baleias e o comércio de carne de baleia “legalizada” nos mercados japoneses continuou. O trabalho feito por Palumbi e seu grupo consistiu na construção inicial de uma “biblioteca de seqüências”, um banco de dados com as seqüências de DNA da região controle mitocondrial de todas as baleias conhecidas, incluindo amostras intraespecíficas de várias partes do globo, coletadas através de dados de biópsia. A região controle mitocondrial é altamente variável em mamíferos, permitindo a distinção fácil de todas as espécies inclusive, em muitos casos, possibilitando a determinação da origem geográfica de cada baleia (BAKER; PALUMBI, 1996). Tendo construído essa biblioteca, amostras de carnes rotuladas como “carne de baleia” foram compradas em feiras e mercados do Japão por agentes da ONG ambientalista Earthrust e enviadas para os laboratórios de Palumbi nos EUA, para um estudo preliminar. Nesse estudo, foi descoberto que, das 17 amostras comparadas, apenas 9 pertenciam à baleia minke, as quais o governo japonês tinha concedido permissão de pesca (para fins científicos). As outras oito amostras eram provenientes de baleias de pesca proibida, como a jubarte, cuja pesca é proibida desde 1966, ou botos e golfinhos, ou seja, enganando também o consumidor japonês.

Esse estudo preliminar estimulou um novo estudo, dessa vez com uma preocupação forense, a fim de processar as companhias responsáveis pela comercialização ilegal da carne de baleia. Nesse segundo estudo, também foram usados *primers* de genes nucleares, para evitar o possível argumento, pela defesa, de que as espécies estavam identificadas incorretamente, porque teriam vindo de hibridações na natureza (assim seriam identificadas erroneamente como se pertencessem à espécie da mãe). O resultado desse estudo foi que, num total de 237 amostras analisadas, 149 pertenciam a baleias minke (sendo 107 do hemisfério sul), 49 eram golfinhos e botos, e as demais amostras eram de outras espécies de baleias. Ou seja, cerca de 37% das amostras não pertenciam a baleias legalmente pescadas (PALUMBI; CIPRIANO, 1998). Devido

ao sucesso dessas pesquisas, a Comissão Internacional da Pesca da Baleia (IWC) decidiu, em 1999, empregar a técnica desenvolvida por Palumbi e seu grupo como metodologia oficial de controle da comercialização da carne de cetáceo.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados com grande eficiência para identificar e inibir a comercialização ilegal de produtos animais. A sua utilização já está disponível, por exemplo, na identificação do camarão. Para isto foi desenvolvido um kit de identificação das diferentes espécies baseado na análise de polimorfismo em fragmento de restrição (RFLP) de genes mitocôndriais e nucleares. Com este kit é possível identificar, com sucesso, camarão descascado e congelado, salgado e seco ao sol (como o do acarajé) e camarão em lata (GUSMÃO et al, 2002; GALETTI et al, 2008). Esse é um instrumento importante para que os órgãos de fiscalização ambiental identifiquem facilmente e sem ambigüidade o material apreendido. Kites semelhantes estão sendo desenvolvidos para identificação e controle da pesca ilegal de peixes brasileiros como, por exemplo, do mero (*Epinephelus itajara*), cuja carne, em filés ou posta, é frequentemente vendida como se fosse garoupa (*Epinephelus marginatus*), com a qual é muito parecida (GALETTI et al, 2008).

O Brasil é habitat natural de seis espécies de crocodilianos: *Melanosuchus niger*, *Paleosuchus palpebrosus*, *Paleosuchus trigonatus*, *Caiman crocodilus*, *Caiman yacare*, *Caiman latirostris* (CARVALHO, 1951). O Amazonas é o maior produtor mundial de carne ilegal de jacaré. Somente de Mamirauá saem 115 toneladas por ano, das quais uma grande parte é transportada para a Colômbia como peixe, sem osso. O problema é ainda mais complicado quando existem espécies próximas cujo comércio é legalizado ou quando a espécie protegida pode ser comercializada se proveniente de cultivo, como ocorre no Brasil. Nesses casos, as fazendas de cultivo podem ser usadas para a legalização fraudulenta das espécies protegidas.

No presente trabalho com as diferenciações encontradas no DNA mitocondrial, teremos um banco de dados com as seis espécies brasileiras de jacarés, e amostra de carne rotulada como “carne de jacaré” poderá ter a sua origem verificada. Esta técnica poderá ser utilizada como metodologia na diferenciação das espécies de jacarés brasileiros, podendo servir para o controle da comercialização de carne e couro.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Amostragem

Foram utilizadas amostras de: Vinte *Caiman latirostris* (três amostras do Banhado do Taim/ RS, três amostra de João Pessoa/PB, duas lagoa Vermelha/AL, duas Natal/ RN, quatro Ilha do Cardoso, duas Charqueada/SP, quatro de Bonito/MS); Doze *Caiman crocodilus* (três amostras do Araguaí/MT, três do Cabo Orange/AP, três da Reserva Cuniã/Rondônia e três de Piratuba/AP); Oito *Caiman yacare* (quatro amostra do Pantanal/MS; quatro da UNESP/Rio claro), Doze *Melanosuchus niger* (três amostras do Araguaí/MT, três do Cabo Orange/AP, três da reserva Cuniã, Rondônia e três de Piratuba/AP); Oito *Paleosuchus trigonatus* (quatro amostras da região de Manaus e quatro do Rio madeira/AM); Nove *Paleosuchus palpebrosus* (três da UNESP/Rio Claro, três de Cabo Orange e três de João Pessoa/PB).

Método de captura e imobilização de jacaré

As capturas dos animais foram feitas à noite, manualmente ou com o auxílio de laço de cabo de aço, após visualização com facho de luz intensa do tipo *sealed beam* e aproximação em barco, conforme descrito por Hutton *et. al.* (1987) e Walsh (1987). A imobilização foi mecânica, dispensando-se o uso de anestésicos ou relaxantes musculares, conforme realizado por Verdade (1997).

Coleta e armazenagem das amostras

O sangue foi coletado através de punção do ramo dorsal da veia cava superior, que corre no interior da coluna vertebral, conforme descrito por Olson (1975) para grandes répteis. Após a coleta, o sangue foi conservado em tampão de lise (Hoelzel, 1992), cuja composição é: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM NaCl; 0.5 % SDS (p/v). Os animais do estado do Mato Grosso foram capturados com auxílio do IBAMA/RAN onde foram coletadas as escamas em procedimento padrão muito utilizados em estudos de captura e recaptura. Estes procedimentos incluem laçar o animal, imobilizá-lo, medir comprimento corporal, determinar o sexo e retirar a escama para análise de DNA. As escamas foram armazenadas em Etanol 94%.

Extração do DNA

O DNA foi extraído do sangue segundo o método CTAB, que consiste em adicionar 50 μ l de NaCl 5M e 40 μ l do produto CTAB 10% em 200 μ l da mistura (2ml de sangue em 8 ml de solução tampão). Aquecimento da solução por 10 min. à 65°C para que as proteínas sejam precipitadas enquanto o DNA fica adsorvido ao CTAB. Adiciona-se 300 μ l de clorofórmio e centrifuga-se à 12000 rpm por 10 min., o sobrenadante é retirado para um tubo eppendorf limpo sem tocar na fase orgânica. O DNA é precipitado dessa solução com 300 μ l isopropanol absoluto, centrifugando-se à 12000 rpm por 10 min., descartando o sobrenadante. Faz-se duas lavagens com 250 μ l Etanol 70%, com centrifugações de 5 min. a 12000 rpm em cada lavagem. O pellet é seco em estufa a 37°C por 30 min. e suspenso em 50 μ l de H₂O milliQ e armazenado em *freezer* à -20°C. O DNA da escama foi isolado por digestão com Proteinase K, que é uma enzima proteolítica não específica, e solução SDS, um detergente iônico que dissolve membranas celulares, pois solubiliza lipídeos e desagrega complexos macromoleculares. Foram cortados pedaços (de 2 a 3mm) da escama caudal de cada indivíduo, e posteriormente foram acrescentados: 500 μ l de tampão de lise celular (10mM Tris, 100mM EDTA, 2% SDS; PH 8.0), 15 μ l Proteinase K (20mg/ml) e incubado *overnight* à 55 °C. A proteína é precipitada dessa solução com 200 μ l de Acetato de Amônio (7,5M) incubado-se no gelo por 20-30 minutos, centrifugando-se à 14000 rpm por 5 min., descartando o sobrenadante. O DNA é precipitado dessa solução com 500 μ l isopropanol absoluto, centrifugando-se à 12000 rpm por 10 min., descartando o sobrenadante. Faz-se duas lavagens com 500 μ l Etanol 70%, com centrifugações de 5 min. à 12000 rpm em cada lavagem. O pellet é seco em estufa a 37°C por 30 min. e suspenso em 50 μ l de H₂O MilliQ e armazenado em *freezer* à -20°C. Após as extrações as amostras foram lidas em espectrofotômetro para determinar a quantidade de DNA extraída e assim proceder às devidas diluições para proceder em seguida a PCR. O espectrofotômetro (HITACHI U-2000) foi utilizado segundo instruções do aparelho. As amostras extraídas tinham em média de 100 ng/ μ L, sendo então padronizado para a diluição de 20 ng/ μ L, sendo utilizados em seguida a quantidade de 5 μ L em cada reação de PCR.

Desenho dos *Primers* e Amplificação

Para análise de enzimas de restrição foram desenvolvidos pares de primers (Tabela 3.1) que amplificassem uma região menor do citocromo b (~350pb), pois regiões muito grandes dificultam a interpretação no gel de agarose, já que possui maior probabilidade de encontrarmos mais de um sítio de enzima de restrição.

Tabela 3.1 – Primers utilizados para amplificar seqüências do *Citocromo b*

Posição	Seqüência	5' → 3'	Temperatura de anelamento °C
14650	CTTTCTCATCCGTCGCCTAC		57
14985	GGGCAGTAAAGCGTGTGAGT		57

Para as reações de PCR foram usados 50 ng de DNA molde, 1,5 unidades de TaqDNA polimerase, 200µM de cada dinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM de cada *primer* em 25 µl de tampão de PCR 1x. As amplificações foram conduzidas empregando-se um passo inicial de 3 minutos a 96 °C, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão a 72 °C durante 20 minutos.

Sequenciamento do fragmento do Citocromo b e Análise por RFLP

A purificação dos produtos amplificados foi feita usando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as especificações do fabricante. O sequenciamento direto de ambas as fitas da molécula de DNA amplificada foi feito utilizando o *Kit Big Dye terminators* (PE Applied Biosystems), contendo tampão *Save money* (4mM de tris-HCl, e 0,1mM de MgCl₂) para um volume final de 10µL. A reação foi feita com 25 ciclos de 95°C por 20s, 50°C por 15s, e 60°C por 1min. Após a reação foi feita a purificação adicionando 2µL de acetato de sódio/EDTA (1,5M NaAc e 259mM EDTA) por amostra, seguida da adição de 60µL de etanol absoluto. Após agitação em vortex, centrifugou por 45min a 4°C, 4000 rpm. O material precipitado foi lavado em etanol 70%, e centrifugado por mais 15min. Após secagem em temperatura ambiente por 1h, as amostras foram aplicadas em sequenciador automático *ABI prism 3100*.

As seqüências do citocromo b das seis espécies foram analisadas com o programa Pdraw 32, para procura de sítios de restrição enzimática que produzissem padrão que diferenciasses as espécies. Quatro enzimas foram selecionadas (*AluI*, *HaeIII* e *TaqI* e *Acil*). Com o objetivo de

verificar a existência de polimorfismo intra-específicos, cinco indivíduos de cada espécie foram seqüenciados e posteriormente, pelo menos, oito indivíduos de cada espécie foram analisados quanto ao corte pelas enzimas de restrição.

As análises de RFLP foram feitas usando os produtos não purificados das reações de PCR (10µl da reação de PCR por 20µl da reação de restrição). As reações de restrição enzimática foram conduzidas segundo recomendação dos fabricantes, por quatro horas a 37°C, com exceção da enzima *TaqI* que ficou duas horas a 65°C. Os produtos de digestão foram separados por três horas através de eletroforese em géis de agarose a 3%. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV em um tansluminador, usando sistema digitam Kodak DC 290.

3.3 Resultados e Discussão

Utilizamos para esta análise de RFLP-PCR um fragmento de aproximadamente 350pb, que resultou em uma ótima amplificação (Figura 3.1) e sequenciamento (Figura 3.2).

Figura 3.1 - Fragmento Citocromo b. Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes (ØX). *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY), *Caiman latirostris* (CL), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Paleosuchus trigonatus* (PT) e Controle Negativo (CN)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
										
C.crocodilus	-CTTTCTCATCCGTCGCCTACACCTCGCGGAGGTCTGATTTGGATGACTTATCCGAAGCTTCCACACAAACGGAGCCGCATCTTCTTCATATTTATCT									
C.yacare	-CTTTCTCATCCGTCGCCTACACCTCTCGCGAAGTCTGATTCGGCTGGCTTATCCGAAGCTTCCACACAAACGGAGCCCTCATCTTCTTCATATTTATCT									
C.latirostris	-CTTTCTCATCCGTCGCCTACACCTCTCGCGAAGTCTGATTCGGCTGACTTATCCGAAGCTTCCACACAAACGGAGCCCTCCTTCTTTCATGTTTATCT									
M.niger	-CTTTCTCATCCGTCGCCTACACCTCCCGGAAATCTGATTTGGATGACTCATTTCGAAACCTACACACAAACGGAGCCCTCTTATTTCTCATATTTATCT									
P.palpebrosus	CTTTCTTCATCCGTCGCCTACACCTCCCGGCGAAGTCTGATTCGGATGACTTATCCGAAACCTCCACACAAACGGAGCCCTCCTTCTTTCATGTTTATTT									
P.trigonatus	CTTTCTTCATCCGTCGCCTACACCTCCCGGCGAAGTCTGATTCGGATGACTTATCCGAAGCCTCCACACAAACGGAGCCCTCCTTCTTTCATATTTATTT									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
										
C.crocodilus	TCCTACACATCGGACGAGGCCATATACGCGCTCCTACTTACAGAAAAACATGAAACGTTGGAGTAATCATACTATTCTGCTAATAGCCACAGCATT									
C.yacare	TCCTACACATCGGACGAGGCCATATTACGCGCTCCTACTTACAGAAAAACATGAAATATCGGAGTAATCATACTATTCTTACTAATAGCCACAGCATT									
C.latirostris	TCCTACACATCGGACGAGGCCATATTACGCTCCTACCTACAGAAAAACATGAAACATCGGAGTAGTCATACTATTCTTACTAATAGCTACAGCATT									
M.niger	TCCTACACATTCGGACGAGGCCATATACGCGCTCCTACCTGCAGAAAAACATGAAACATTCGGAGTAGTCATACTCTTCTTACTAATAGCCACAGCATT									
P.palpebrosus	TCCTCCACATCGGACGGGGCCTGTACTACGCGCTCCTACCCACGAAAAAGACATGGGCTGTGGGAGTTGTTATCTCTTCTTACTAATGGCTACAGCATT									
P.trigonatus	TCCTCCACATCGGACGAGGCCATATACGCGCTCTTACGCCCACGAAAAACATGAAATGTAGGAGTCATAATGCTCTTCTTACTAATAGCTACGGCATT									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
										
C.crocodilus	CATAGGCTATGTCTCTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATCACCAACCTACTATCCCCACCCCATACATTGGAGACACCATCGTA									
C.yacare	CATAGGCTATGTCTCTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATCACCAACCTACTATCCACCATCCCATACATTGGAGACACCATCGTA									
C.latirostris	CATAGGCTATGTCTCTCCATGAGGGCAAAATATCATTCTGAGGAGCAACTGTAACTACTAACCCTACTATCCCCATCCCATACATTGGAGACACCATTGTA									
M.niger	CATGGGCTATGTCTCTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCAACCGTAATCACAAATCTACTATCAGCCATCCCTTATATCGGAGACACCATCGTA									
P.palpebrosus	CATGGGTTATGTCTCTCCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCAACCGTAATTACAAACCTGCTGTCTGCCACCCCATACATCGGAGACACCATCGTG									
P.trigonatus	CATGGGCTATGTCTCTCCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACCGTAATCACCAACCTGCTGTCTGCTATCCCATACATCGGAGACACCATGTTG									
	310	320	330	340	350					
										
C.crocodilus	CCATGGAATCTGAGGTGGACCCCTCAGTAAACAACGCAACACTCACACGCTTTACTGCCC									
C.yacare	CCATGAATCTGAGCCGCACCCCTCAGTAAACAATGCAACACTCACACGCTTTACTGCCC									
C.latirostris	CCATGAATCTGAGCCGCACCCCTCAGTAAACAATGCAACACTCACACGCTTTACTGCCC									
M.niger	CCATGAATCTGAGGGGGCCCCCTCAGTAAACAACGCAACACTCACACGCTTTACTGCCC									
P.palpebrosus	CCATGAATTTGGGGGGGGCCCTCCGTAGACAACGCAACACTCACACGCTTTACTGCCC									
P.trigonatus	CCGTGAATCTGGGGGGGGCCCTCCGTAGACAACGCAACACTCACACGCTTTACTGCCC									

Figura 3.2 – Sequências do fragmento do citocromo b para seis espécies de crocodilianos brasileiros

As enzimas de restrição, sugeridas pelo programa Pdraw 32 (Figuras 3.3), que detectaram os sítios polimórficos presentes em determinada espécie e ausente nas demais foram utilizadas para análises posteriores com todos os indivíduos das espécies selecionadas. Este método foi utilizado para identificar polimorfismos associados à alteração na sequência de bases de sítios de restrição nos genes amplificados por PCR.

Figura 3.3 - Fragmento de 357 ou 358pb do citocromo b com os sítios de clivagem por enzima de restrição nas seis espécies de crocodilianos brasileiros

Foram realizados testes com a Enzima de restrição *AluI*, *HaeIII*, *TaqI* e *AciI*. Os fragmentos esperados estão na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Tamanho predito do Fragmento de aproximadamente 357pb da região parcial do gene citocromo b, nas seis espécies de crocodilianos brasileiros após análise pelas respectivas enzimas de restrição

Espécie	Tamanho do fragmento de DNA(pb) após digestão com a enzima de restrição indicada			
	<i>AluI</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>	<i>Aci I</i>
<i>Caiman crocodilus</i>	58, 299	118, 239	357	76, 281
<i>Caiman yacare</i>	58, 299	118, 239	357	41, 272, 44
<i>Caiman latirostris</i>	189, 168	118, 239	357	41, 272, 44
<i>Melanosuchus niger</i>	357	118, 198, 41	53, 304	26, 287, 44
<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	357	76, 43, 239	357	27, 331
<i>Paleosuchus trigonatus</i>	190, 168	119, 198, 41	357	27, 331

Os padrões de bandas foram analisados e permitiram uma diferenciação visual clara dos fragmentos em gel de agarose 3% (Figura 3.4). Os padrões esperados para as diferentes espécies foram confirmados para todas as amostras testadas.

Assim, obtivemos neste trabalho um sistema diagnóstico usando PCR-RFLP para a identificação molecular de espécimes das seis espécies brasileiras de crocodilianos. Esta análise genética tem sido largamente utilizada em estudos de conservação e auxílio do manejo de uma variedade de espécies. A identificação correta de espécies diferentes é fundamental para o controle da comercialização e exportação de produtos frescos e industrializados. O sistema de diagnose de espécies desenvolvido neste trabalho pode ser extremamente útil na identificação forense de comércio ilegal, assim como para caracterização de produtos industrializados (congelado), para os quais a identificação das espécies envolvidas seria de outra maneira impossível. Coletamos duas amostras em um restaurante em Bonito/MS onde o responsável pelo estabelecimento disse tratar-se de amostras de jacaré do pantanal (*Caiman yacare*), o que foi confirmado pelos testes com estas enzimas de restrição.

Figura 3.4 - Análise de restrição do fragmento de 357pb da região parcial do gene citocromo b nas seis espécies de crocodilianos brasileiros. *Caiman crocodilus* (CC), *Caiman yacare* (CY), *Paleosuchus palpebrosus* (PP), *Melanosuchus niger* (MN), *Paleosuchus trigonatus* (PT), *Caiman latirostris* (CL) e Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes (Øx)

Assim obtivemos uma metodologia mais acessível para identificação da espécie e controle de comercialização da carne de jacaré, não sendo necessário o sequenciamento do DNA dos indivíduos.

3.4 Conclusão

Neste trabalho, marcadores espécies-específicos produzidos por PCR-RFLP foram desenvolvidos para a identificação molecular das seis espécies brasileiras de jacarés. Esta técnica além de importante na identificação das espécies poderá ser utilizada como metodologia oficial de controle da comercialização e exportação de carne e couro de jacaré.

Referências

- BAKER, C.S.; PALUMBI, S.R. Population structure molecular systematics, and forensis identification of whales and dolphins. In: AVISE J.C.; HAMRICK J.L. (Ed.). **Conservation genetics**. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 10-49.
- BAKER, C.S.; LENTO, G.M.; CIPRIANO, F.; DALEBOUT, M.L.; PALUMBI, S.R. Scientific whaling: source of illegal products for market? **Science**, Washington, v. 290, p. 1695-1695, 2000.
- BRAZAITIS, P. WATANABE, M.E.; AMATO, G. The caiman trade. **Scientific American**, New York, v. 278, p. 275-284, 1998.
- BRAZAITIS, P.; REBÊLO, G.H.; YAMASHITA, C.; ODIERNA, E.O.; WATANABE, M. Threats to Brazilian crocodilian populations. **Oryx**, Cambridge, v. 30, p. 275-284, 1996.
- CARVALHO, A.L. Os Jacarés do Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v, 42, n. 1, p. 125-139, 1951.
- GALETTI, J.R.; RODRIGUES, F.P.; SOLÉ-CAVA, A.M.; MIYAKI, C.Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E.A.; SANTOS, F.R.; FARIAS, I.P.; VIANNA, J.A.; OLIVEIRA, L.R.; WEBER, L.I.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FRANCISCO, M.R.; REDONDO, R.A.F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S.N.; FREITAS, T.R.O.; HRBEK, T.; MOLINA, W. F. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. (Ed.). **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. cap. 10, p. 199-229.
- GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A.M. Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. In: DE BLAS, I. (Org.). **CIVA 2002: comunicaciones y foros de discusión**. I. Blas, Zaragoza, 2002. v. 1, p. 754-764.
- HOEZEL, A.R. **Molecular genetic analysis of populations**. Oxford: IRL Press, 1992. 315 p
- HUTTON, J.M.; LOVERIDGE, J.P.; BLAKE, D.K. Capture methods for the Nile crocodile in Zimbabwe. In: WEBB, G.J.W.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife Managment: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 211-216.
- MEDEM, F. **Los Crocodylia de Sur America: los Crocodylia de Colombia**. Bogota: Editor Carrera., 1981.v. 1, 270 p.
- OLSON GA, HESSLER JR, FAITH RE. Techniques for blood collection and intravascular infusion of reptiles. **Laboratory Animal Science**, Joliet, v. 25, p. 783-786, 1975.
- PALUMBI, S.R.; CIPRIANO, F. Species identification using genetic tools : The value consevation. **The Journal of Heredity**, New York, v. 89, p. 459-464, 1998.

QUINTERO, J., SOTELO, C.G., REHBEIN, H., PRYDE, S.E., MEDINA, I., PERÉZ-MARTIN, R.I., REY-MÉNDEZ, M. E MACKIE, I.M. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington ,v. 46, p. 1662-1669, 1998.

RAM, J.L.; RAM, M.L.; BAIDOUN, E.F. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 2460-2467, 1996.

SEEB, J.E.; KRUSE, G.H.; SEEB, L.W.; WECK, R.G. Genetic structure of red king crab population in alaska facilitates enforcement of fishing regulation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON KING AND TANNER CRABS, 1990, Fairbanks. **Proceedings...** Fairbanks: University of Alaska, 1990. p. 491–502. (Alaska Sea Grant Report, 90–04).

SWEIJ, N.A.; BOWIE, R.C.K.; LOPATA, A.L.; MARINAK, A.M. ; COOK, P.A. A PCR technique for forensic species level identification of abalone tissue. **Journal of Shellfish Research**, Rockville, v.17,p. 889-896, 1998.

VERDADE LM. Manejo e conservação do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: VALLADARES-PÁDUA, C.B.; BODMER, R.E.; CULLEN, L.J.R. (Ed.). **Manejo de vida silvestre para a conservação**. Mamirauá: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. p. 222-232.

WALSH, B. Crocodile capture methods used in the Northern territory of Australia. In: WEBB, G.J.W.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty , 1987. p. 249-252.

4 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM *CAIMAN LATIROSTRIS* (JACARÉ-DE-PAPO-AMARELO), UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITE E SEQUENCIA DO GENE CITOCROMO B

Resumo

O *Caiman latirostris* apresenta a mais extensa distribuição geográfica entre todos os crocodilianos. Neste estudo nós analisamos a relação entre distância geográfica (ao longo do eixo latitudinal e longitudinal da distribuição da espécie) e a diferenciação genética utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos para *Alligator mississippiensis* (GLENN; DESSAUER; BRAUN, 1998) e *Caiman latirostris* (ZUCOLOTO, 2003). Em uma escala global, a variação alélica interpopulacional indica uma forte diferenciação ($R_{ST} = 0,407$; $F_{ST} = 0,271$; $P < 0,001$). Os resultados sugerem que há uma relação entre distância geográfica e diferenciação genética, porém outros fatores de biogeografia parecem ser pertinentes. A Serra do Mar parece ser uma barreira geográfica efetiva, restringindo o fluxo genético entre populações do litoral e continente. As populações litorâneas parecem ter estado conectadas em recente tempo geológico (Pleistoceno 16.000 anos atrás). A análise de variância molecular (AMOVA) de uma região do citocromo b do DNA mitocondrial mostrou que 71,84% ($P < 0,001$) da variabilidade total está entre as populações do litoral e do interior. O programa Structure atribuiu as doze populações em dez grupos, indicando a existência de uma grande diferenciação genética e pouco fluxo entre a maioria das populações. Os resultados contribuem para o conhecimento da estrutura genética desta espécie e estes dados poderão ser utilizados para conservação. Estudos futuros devem focar a bacia do São Francisco que ainda foi pouco estudada nesta espécie.

Palavras-chave: *Caiman latirostris*; Estrutura genética; Marcadores microssatélite; Citocromo b

Abstract

Broad-snouted caiman's (*Caiman latirostris*) geographic distribution comprises one of the widest latitudinal ranges among all crocodilians. In the present study, we analyzed the relationship between geographic distance (along the species' latitudinal and longitudinal range) and genetic differentiation using DNA microsatellite loci developed for *Caiman latirostris* (ZUCOLOTO, 2003) and *Alligator mississippiensis* (GLENN; DESSAUER; BRAUN, 1998). On a global scale, the inter-population variation of alleles indicated strong differentiation ($F_{ST} = 0.137$ and $R_{ST} = 0.407$, $P < 0.001$). Results suggest that there is a consistent relationship between geographic distance and genetic differentiation, although other biogeographical factors seem to be relevant. The Atlantic chain (Serra do Mar) seems to be an effective geographic barrier, restricting the genetic flow between populations of the coast and continent. In addition, coastal populations seem to have been well connected in recent geological time (Pleistocene 16,000 years ago) all along the eastern Brazilian coast. By AMOVA, 71.84% ($p < 0.001$) of the total variability occurs between coastal and continent populations. Analyses from the Structure software assigned the twelve populations to ten clusters showing little exchange among some populations. Results contribute to knowledge of the of this species, and in the future, these data will be useful for conservation purposes. Further studies should focus on the São Francisco River drainage, which is still poorly known for this species.

Keywords: *Caiman latirostris*; Structure Genetics; Microsatellite markers; Cytochrome b

4.1 Introdução

O *Caiman latirostris* (jacaré-de-papo-amarelo), é um crocodiliano sul americano de porte médio. O comprimento total máximo alcançado é de 3,5 m, mas na natureza são raros os animais maiores que 2,0 m. A espécie se caracteriza por ter o focinho mais largo dos crocodilianos. O corpo é de cor verde escura, com manchas mais escuras na cabeça e pescoço (VERDADE, 1998; VERDADE; PIÑA, 2006). A espécie apresenta uma extensa distribuição latitudinal, de 5° S para 34° S e abrange um grande número de pequenas bacias costeiras a partir de Natal, no nordeste do Brasil, até o nordeste do Uruguai (VERDADE, 1998; VERDADE; PIÑA, 2006). No Brasil tem populações afastadas por mais de 3.500 km (em linha reta; Rio Grande Norte até Rio Grande do Sul). Esta grande variação latitudinal afeta o clima no qual as populações evoluem (de uma situação sem inverno no Norte, até um inverno bem marcado nas populações do Sul). A presença destas diferenças climáticas afetam a taxa de crescimento dos animais, e pode influenciar na mortalidade dos filhotes, assim gerando pressões evolutivas diversas neste amplo gradiente latitudinal e espacial.

Embora crocodilianos possam mover distância considerável por terra firme (CAMPOS et al, 2006), cursos d'água são sua rota principal de dispersão. Sendo assim, bacias hidrográficas determinam normalmente o padrão de distribuição dos crocodilianos (SILL, 1968). A distribuição do *Caiman latirostris* cobre as duas maiores bacias da América do Sul, Paraná e São Francisco, como também abrange um grande número de pequenas bacias costeiras (VERDADE; PIÑA, 2006). O rio Paraná corre para o sul, considerando que o rio São Francisco corre em direção ao norte e os rios pequenos do litoral correm principalmente para o leste. Estes padrões geográficos possivelmente podem afetar o fluxo genético entre populações de drenagens de rio diferentes, afetando a dispersão individual (CAUGHLEY; SINCLAIR, 1994).

Além disto, devido recente pressão antropogênica ou eventos históricos, pode haver isolamento genético entre populações como encontrado em escala microgeográfica (VERDADE et al., 2002). No presente trabalho foi testada a hipótese da variação genética ser relacionada com distância geográfica, em pequena e grande escala e se a variabilidade genética da espécie esta correlacionada com diferentes sub-biomas no litoral e interior.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Sítios de coleta e amostragem

Um total de 167 indivíduos de onze populações naturais foram amostrados nos sítios descritos na Tabela 4.1. Utilizamos também em algumas análises seis indivíduos não aparentados da população em cativeiro da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, para saber se a colônia esta representando bem a diversidade da espécie no Brasil.

Tabela 4.1- Sítios de estudos das populações de *Caiman latirostris*

Sítios	Coordenadas	n	Tipo de Habitat	Fonte
Natal/RN	5° 43' S, 35° 12' W	5	Alagado	Villela (2004)
João Pessoa/PB	7° 06' S, 34° 52' W	12	Alagado	Villela (2004)
Lagoa Vermelha/Al	10° 04' S, 36° 21' W	25	lagoa	Verdade (2001) Villela (2004)
Bonito/MS	21° 07' S, 56° 30' W	10	açude	Villela et al, (2008)
Charqueada/SP	22° 30' S, 47° 48' W	12	açude	Verdade(1997) Verdade et al (2002) Zucoloto et al. (2002)
S. Pedro(Pantanal)/SP	22° 35' S, 47° 51' W	20	Alagado	Verdade (1997) Verdade et al. (2002) Villela (2004) Zucoloto et al. (2002)
Duraflora/SP	22° 26' S, 48° 52' W	23	Lago artificial em plantação de eucaliptos	Verdade (1997) Verdade et al. (2002) Zucoloto et al. (2002)
Porto de Areia/SP	22° 39' S, 47° 58' W	9	Lagoa	
Ilha do Cardoso/SP	25° 04' S, 47° 55' W	9	Riacho	Villela (2004)
Cubatão/SP		25	Lagoa	Neste estudo
Banhado do Taim/RS	32° 32' S, 52° 23' W	17	Álagado	Villela (2004)

Captura e imobilização de jacarés e conservação de sangue

A captura desses animais provenientes da natureza foi feita à noite, manualmente ou com o auxílio de laço de cabo de aço, após visualização com facho de luz intensa do tipo *sealed beam* e aproximação em barco, conforme descrito por Hutton et al. (1987) e Walsh (1987). A imobilização foi mecânica, dispensando-se o uso de anestésicos ou relaxantes musculares, conforme realizado por Verdade (1997). A marcação é realizada por anilhamento, entre os dois primeiros dedos do membro posterior direito, na membrana interdigital. O sangue foi coletado através de punção do ramo dorsal da veia cava superior, que corre no interior da coluna vertebral, conforme descrito por Olson (1975), para grandes répteis. Após a coleta, o sangue

foi conservado em tampão de lise (Hoelzel, 1992), cuja composição é: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM NaCl; 0.5 % SDS (p/v).

Extração do DNA

As amostras de sangue coletadas, tiveram seu DNA extraído segundo o método CTAB, que consiste em adicionar 50 μ l de NaCl 5M e 40 μ l do produto CTAB 10% em 200 μ l da mistura (2ml de sangue em 8 ml de solução tampão). Aquecimento da solução por 10 min. à 65°C para que as proteínas sejam precipitadas enquanto o DNA fica adsorvido ao CTAB. Adiciona-se 300 μ l de clorofórmio e centrifuga-se à 12000 rpm por 10 min., o sobrenadante é retirado para um tubo eppendorf limpo sem tocar na fase orgânica. O DNA é precipitado dessa solução com 300 μ l isopropanol absoluto, centrifugando-se à 12000 rpm por 10 min., descartando o sobrenadante. Faz-se duas lavagens com 250 μ l Etanol 70%, com centrifugações de 5 min. à 12000 rpm em cada lavagem. O pellet é seco em estufa a 37°C por 30 min. e suspenso em 50 μ l de H₂O MilliQ e guardado em *freezer* à -20°C. Após a extração as amostras foram lidas em espectrofotômetro para sabermos a quantidade de DNA extraída e assim proceder as devidas diluições para proceder em seguida o PCR. O espectrofotômetro (HITACHI U-2000) foi utilizado segundo instruções do aparelho. As amostras extraídas para a genotipagem, com o protocolo de CTAB obtiveram uma média de 100 ng/ μ L, sendo então padronizado para a diluição de 20 ng/ μ L, sendo utilizados em seguida a quantidade de 5 μ L em cada reação de PCR.

Primers microssatélites utilizados e amplificação

Foram utilizados onze pares de *primers*, sendo que quatro foram desenvolvidos por Glenn et al.(1998), a saber, *Ami* 8, *Ami* 11, *Ami* 13 e *Ami* 20, e sete marcadores foram desenvolvidos para *Caiman latirostris* (ZUCOLOTO, 2003), *Cla* 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. A condição de amplificação para cada par de *primer* esta descrita na Tabela 5.2. Devido a falta de especificidade encontradas em alguma amplificação foi utilizado o *PCR optimizer Kit* (Invitrogen). O kit é constituído por tampões com concentrações de magnésio e pH diferentes, sendo que todos os tampões têm em comum 300 mM de Tris-HCl e 75 mM de Sulfato de amônio. Todos os marcadores foram testados com os tampões A, B, C, D, F, J e N, referentes ao estágio um do Kit.

O Tampão A (1,5 mM MgCl₂, pH 8.5) foi padronizado para os marcadores *Ami* 8, *Ami* 11, *Ami* 13, *Cla* 2, *Cla* 9 e *Cla* 10. O tampão F (2,0 mM MgCl₂, pH 9.0) para os marcadores *Ami* 20, *Cla* 5, *Cla* 7, *Cla* 8 e *Cla* 6.

As condições da PCR por reação de 25 μ l foram padronizadas para todos os marcadores como sendo: 1 X o tampão específico ; 0,1 mM de dNTP mix; 0,4 M de cada *primer*; 1U de *Taq DNA polimerase*; 100 ng de DNA e 12,77 μ l de H₂O deionizada. O termociclador foi programado segundo os passos: (1) 94°C por 3 min.; (2) 94°C por 1 min.; (3) Temperatura de anelamento do par de *primers* por 1 min. (Tabela 2); (4) 72°C por 1 min.; (5) Repetir 30 a 35 ciclos conforme o *primer* utilizado, contendo os passos 2, 3 e 4, segundo a Tabela 1; (6) 72°C por 7 min. e (7) 4°C indefinidamente. Os *primers* da fita sense de cada microsatélite foram marcados com as fluorescências indicadas na Tabela 4.2. Os marcadores foram analisados no sistema do seqüenciador de DNA MegaBace 1000.

Tabela 4.2 - *Primers* e condições de amplificação. T = Temperatura de anelamento (°C). C = Numero de ciclos para o PCR

<i>Primers</i>	Seqüência 5'-3'	T	°C
<i>Ami</i> 8a	CCTGGCCTAGATGTAACCTTC	55	30
<i>Ami</i> 8b	AGGAGGAGTGTGTTATTTCTG		
<i>Ami</i> 11a	AAGAGATGTGGGTGCTGCTG	64	35
<i>Ami</i> 11b	TCTCTGGGTCTGTAAAGTGT		
<i>Ami</i> 13a	CCATCCCCACCATGCCAAAGTC	64	35
<i>Ami</i> 13b	GTCCTGCTGCTGCCTGTCACT		
<i>Ami</i> 20a	TTTTTCTTCTTTCTCCATTCTA	58	30
<i>Ami</i> 20b	GATCCAGGAAGCTTAAATACAT		
<i>Clau</i> 2a	CCTTCAGGACCCACTTTCTT	58	30
<i>Clau</i> 2b	CGAATCCCTCTTCCCAAAC		
<i>Clau</i> 5a	GCGTAGACAGATGCATGGAA	55	30
<i>Clau</i> 5b	CAGTCTGAAGCTAGGGCAAA		
<i>Clau</i> 6a	GAAATATGGGACAGGGAGGA	58	30
<i>Clau</i> 6b	GGTTGGCTGCATGTGTATGT		
<i>Clau</i> 7a	CGGGGTCTTGGTGTGACTA	58	30
<i>Clau</i> 7b	CGGGACCAGGAGCTGTATAA		
<i>Clau</i> 8a	CAGCCACTGAAGGAATTGAC	55	30
<i>Clau</i> 8b	CACATACCTGACCCAGCTTATC		
<i>Clau</i> 9a	ACAGGGGAAAAGAAGAGCTG	60	35
<i>Clau</i> 9b	AAAATCCCCCACTCTTACCC		
<i>Clau</i> 10a	TGGTCTTCTCTTCGTGTCCT	60	35
<i>Clau</i> 10b	ATGAGCCCCTCTATGTTCTT		

Primers da região do citocromo b e amplificação

Os primers utilizados para o sequenciamento de uma região do citocromo b estão descritos na Tabela 4.3. As condições para uma reação de amplificação da região mitocondrial com um volume final de 25 μ l, foram: 1x tampão de PCR (20mM Tris HCl, pH 8.4; 50mM KCl), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 0,2 mM de dNTP, 0,4 μ M de cada *primer* do par, 0,2 U/ μ l de Taq DNA polimerase e 5 μ l da amostra de DNA (10ng/ μ l). O programa de amplificação foi: (1) 94°C por 3 min.; (2) 94°C por 45 seg.; (3) Temperatura de anelamento do par de “*primers*” por 1 min. (58 °C); (4) 73°C por 1 min. e 15 seg.; (5) Repetir n ciclos contendo os passos 2, 3 e 4; (6) 4°C indefinidamente.

Tabela 4.3 - Primers e condições de amplificação. T = Temperatura de anelamento ótima (°C).
C=Número de ciclos para o PCR

<i>Primers</i>	Seqüência 5' $\rightarrow$ 3'	T	°C
14254a	ATGACCCACCAACTACGAAAAT	58	35
14985b	GGGCAGTAAAGCGTGTGAGT		

Purificação dos produtos de PCR

Após a amplificação foi feita a purificação dos produtos da PCR, que consiste na retirada dos *primers* e dos resíduos de dNTP para obtenção de seqüências de melhor qualidade. Para esta finalidade procedeu-se o seguinte protocolo recomendado no *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Health Care).

A coluna (*Kit*) foi encaixada no tubo coletor (*Kit*), sendo adicionados 500 μ L de *Capture buffer* e 20 μ L do produto de PCR. Após centrifugação por 1 minuto a 14400g o tubo coletor foi descartado e um novo tubo foi encaixado à coluna. Foram adicionados à coluna 500 μ L de *Wash buffer* (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) seguindo-se de centrifugação por 1 minuto a 14400g. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e a esse foram adicionados 30 μ L de água *Milli-Q* seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugação por 1 minuto a 14400g. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% juntamente com o padrão de concentração pGEM4Z (40ng/ μ L) para a verificação da concentração.

Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o protocolo DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham BioSciences). Para cada reação de sequenciamento foram utilizados: 3 μ L de Tampão *Save Money* (200mM de Tris pH 9, 0,5 mM $MgCl_2$), 1 μ L de *primer* (2,5 pmoles/ μ L), 2 μ L de *Kit ET Terminator* e 50 ng de DNA. O programa utilizado para a reação de sequenciamento compreendeu as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60 °C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto, totalizando 25 ciclos. Foram realizadas pelo menos duas reações de sequenciamento para cada indivíduo.

Purificação da Reação de Sequenciamento

Para a purificação da reação de sequenciamento foram adicionados 80 μ L de isopropanol 65% a reação, seguindo-se de homogeneização (*vórtex*) e incubação no escuro por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação por 45 minutos a 3200g, o sobrenadante foi removido por inversão e foram adicionados 150 μ L de etanol 60% seguindo-se de centrifugação por 15 minutos, a 3200g a temperatura ambiente. O *pellet* foi desidratado por 1 hora a temperatura ambiente e ressuspensionado em 10 μ L de formamida. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos, resfriadas em gelo e aplicadas em sequenciador automático *ABI 3100* (*Applied Biosystems*).

Alinhamento das seqüências nucleotídicas

Foram utilizados dois indivíduos de cada espécie para o sequenciamento, o alinhamento e qualidade das seqüências foram feitos utilizando os programas *Phred/Phrap/Consed* (EWING; GREEN, 1998; GREEN et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) e *BioEdit* (HALL, 1999), quando a qualidade ou o alinhamento não estavam bons o indivíduo era sequenciado pela terceira vez. Posteriormente, as seqüências foram comparadas entre si e com as seqüências já depositadas no *Genbank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análise dos dados

DNA Microssatélite

O programa estatístico Genepop version 3.1d (RAYMOND; ROUSSET, 1995) foi utilizado para calcular a frequência alélica, frequência de heterozigotos observados e de heterozigotos esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, teste exato para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, teste de diferenciação gênica e genotípica entre pares de populações. O cálculo das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{ST}), foram estimadas utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2007). Segundo critério de WRIGHT (1931), índices entre 0 a 0,05 indicam pouca diferenciação genética; entre 0,05 a 0,15 diferenciações genéticas moderada; entre 0,15 a 0,25 diferenciações genética grande, e maior que 0,25 diferenciações muito altas. Em locos microssatélites, o processo mutacional não está de acordo com o que se admite no modelo de alelos infinitos com baixas taxas de mutação. Por este motivo, além da estimativa do F_{ST} , foi utilizada uma análoga a ela, denominada R_{ST} (SLATKIN, 1995), desenvolvida especificamente para dados de microssatélites. O R_{ST} foi estimado usando o programa R_{ST} Calc version 2.2 (GOODMAN, 1997) com 10000 permutações e 1000 randomizações para as populações. O padrão de diferenciação genética entre as onze populações naturais de *Caiman latirostris* foram definidos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) no programa NTSys-pc 1.70 (ROHLF, 1992). Para avaliar a consistência dos agrupamentos sugeridos foi feito uma correlação com a matriz cofenética. O teste de Mantel foi aplicado para testar a significância da correlação matricial entre a diferenciação genética (R_{ST} e F_{ST}) e a distância geográfica entre pares de população utilizando o programa NTSys-pc 1.70 (ROHLF, 1992). Este teste foi realizado com intuito de verificar se existe correlação entre diferenciação genética e distância física, nos sugerindo o modelo de fluxo gênico.

Os 173 animais amostrados de diferentes regiões foram designados probabilisticamente por meio de inferência Bayesiana, a uma ou mais populações por meio do programa Structure 2.1 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) utilizando o teste de atribuição. No modelo de Pritchard et al., 2000 são assumidas K populações (sendo que o valor de K é desconhecido), cada uma delas caracterizada por um conjunto de frequências alélicas em cada loco. O método busca determinar a população a qual pertence cada indivíduo, e, simultaneamente, estima as frequências alélicas de cada população. Em outras palavras, o programa procura, a partir do conjunto de dados, criar K populações que estejam o mais próximo possível do Equilíbrio de Hardy-

Weinberg, sem nenhuma informação *a priori* a respeito dos locais de coleta (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Para estimar os cálculos de estruturação foram estimadas as probabilidades para valores de K que variaram de dois até doze. O Q= coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo é calculado, onde temos a probabilidade em porcentagem de cada indivíduo pertencer a cada grupo. Para testar a regularidade dos resultados, cada valor de K foi estimado dez vezes independentemente a partir de 200.000 interações para o *burn-in period* e 300.000 repetições MCMC (Métodos de Cadeia de Markov e Monte Carlo), de maneira que foi calculada, para cada indivíduo, a probabilidade de um dado genótipo X fazer parte de uma dada população K: $\ln \Pr(X/K)$.

Para inferir o melhor K foi utilizada uma estatística *ad hoc*, DeltaK, baseada na taxa de mudança do logaritmo da probabilidade dos resultados entre sucessivos valores de K (EVANO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

Primeiramente a estatística DeltaK utiliza a média dos valores de $\ln P(D)$, denominado $L(K)$, gerados no Structure para fazer a primeira inferência. Em seguida, esses valores são corrigidos para a diferença entre K e K-1, chamado de $L'(K)$. Posteriormente é tomado o modulo da diferença entre de $L'(K)$ para K=1 e K, chamado de $L''(K)$. Dividindo $L''(K)$ pelo produto do desvio padrão das médias de $L(K)$ e o número de repetições realizadas obtém o DeltaK (EVANO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

DNA mitocondrial

O alinhamento das seqüências do citocromo b foi feito pelo método ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e lido posteriormente pelo BIOEDIT para inspeção visual do alinhamento e refinado manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Parsimony and Other Methods*). Após o alinhamento das seqüências e os testes para verificação da qualidade dos dados o PAUP foi utilizado para a construção da filogenia pelo método baseado em caracteres (Máxima Parcimônia – MP e Máxima verossimilhança –ML) e pelo método baseado em distância (Evolução Mínima - ME). Para análise de métodos baseados em distância e máxima verossimilhança é necessário a utilização do programa MODELTEST (POSADA; CRANDAL, 1998) para escolha do modelo de evolução do DNA que melhor se ajusta aos nossos dados. Assim, o PAUP usará estes parâmetros para estimativas. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para medir o quanto da

variação observada foi devido à variação inter e intra-populacional, utilizando o programa Arlequin (EXCOFFIER et al., 2005). Com o mesmo programa, a variabilidade entre os grupos genéticos também foi quantificada por meio dos valores de F_{ST} e testada a partir de 100.000 iterações de Cadeias de Markov e 1000 permutações.

4.2.2 Resultados e Discussão

Variação Genética

O número de alelos encontrados foi de 194, com uma média de 17,6 alelos por locos, do ponto de vista da diversidade alélica as onze populações de *Caiman latirostris* estudadas mostram variabilidade genética alta. Os totais de alelos por marcador e por população estão descritos na Tabela 4.4. A frequência dos alelos em todas as populações é apresentada no ANEXO E.

Tabela 4.4 - Número de alelos por marcador encontrado nas populações. AL. Alagoas, RS. Rio Grande do Sul, IC. Ilha do Cardoso/SP, RN. Rio Grande do Norte, Pb. Paraíba, Poá. Porto de Areia/SP, PT. Pantanal/São Pedro/SP, CHA. Charqueada, DuF. Dura Flora/SP, MS. Mato Grosso do Sul, CuB. Cubatão e CaT. População de cativeiro da ESALQ

Loco	AL	RS	IC	RN	Pb	PoA	PT	CHA	DuF	MS	CuB	Total
<i>Ami</i> 08	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	4
<i>Ami</i> 11	6	2	4	5	4	3	4	4	5	6	7	11
<i>Ami</i> 13	6	6	7	7	8	2	6	8	6	9	9	18
<i>Ami</i> 20	6	4	2	4	4	6	8	8	8	7	5	19
<i>Cla</i> 02	8	2	4	5	7	3	4	4	4	4	9	25
<i>Cla</i> 05	7	4	6	4	6	4	6	5	3	8	11	27
<i>Cla</i> 06	7	3	2	2	2	3	4	5	4	7	2	14
<i>Cla</i> 07	3	3	2	2	2	7	4	5	6	2	2	14
<i>Cla</i> 08	5	5	4	3	4	3	7	7	5	7	4	16
<i>Cla</i> 09	12	11	7	6	6	2	4	3	4	6	9	22
<i>Cla</i> 10	5	5	7	3	4	5	8	5	8	8	10	24
Total	67	46	47	43	49	40	57	56	55	65	70	194

Foram detectado 63 alelos exclusivos dentro das populações, e 57% dos alelos exclusivos encontrados apresentaram frequências gênicas maiores que 5%. O alelo exclusivo de menor representação foram 211 e 243 no locus *Clau02* e 127 e 131 no locus *Clau06*, na população de alagoas (AL) com 2%, o mais representado foi o 111 no locus *Ami08* com 100% na população do Mato Grosso do Sul. As populações de CuB (11 alelos), AL (9 alelos) e

PaT (8 alelos) apresentaram a maioria dos alelos exclusivos correspondendo a 46% do total (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Número de alelos exclusivos de *Caiman latirostris* em cada população estudada

Alelos exclusivos em populações naturais são originados do isolamento natural ou reprodutivo e são decorrentes de mutação, adaptação e seleção a condições ambientais muito específicas de cada população (FUTUYMA, 1998). A população de Matogrosso do Sul parece estar isolada, já que apresentou só alelos exclusivos no loco *Ami* 8. A presença de alelos exclusivos é muito interessante para a identificação forense (indicar populações ou regiões da qual indivíduos, carne e couro são provenientes), fato já comentado por RYBERG et al. (2002). Além disto, a presença de alelos exclusivos a determinadas populações evidencia a importância da manutenção de populações naturais para que não haja perda de alelos e conseqüente redução do nível de variabilidade genética.

Heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica (H_e) e teste exato para verificar aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para os 11 locos analisados, as populações apresentaram níveis elevados de diversidade gênica ou heterozigosidade esperada (H_e), variando entre 0,544 (Cubatão) e 0,677 (MS). A heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,415 (IC) e 0,687 (PoA). Estes resultados foram similares a outros trabalhos com microsatélite em crocodilianos. Em RYBERG et al.(2002) a heterozigosidade observada em populações de *A. mississippiensis* do

Texas variou de 0,50 a 0,061. Em Davis et al.(2002) a heterozigosidade observada em populações de *A. mississippiensis* do Sudeste dos Estados Unidos variou de 0,50 a 0,76 e em Thoisy et al.(2006) a heterozigosidade observada em populações de *Melanosuchus niger* amostrados no Brasil, Guiana Francesa e Equador variou entre 0,47 a 0,70.

Em razão da heterozigosidade média observada ter sido inferior a heterozigosidade esperada em quase todas as populações (Tabela 4.5), ficou caracterizado a presença de excesso de homozigotos. O aumento de homozigotos indicou a possível existência de um processo endogâmico, decorrente de desvio de panmixia intrapopulacional, e/ou deriva genética, em razão da fragmentação da população original, ou efeito do fundador.

O índice de fixação médio de todas as onze populações ($f = 0,127$) revelou pouca endogamia dentro da maior parte destas populações. As populações com nível de endogamia alto foram Alagoas, Mato Grosso do Sul e Cubatão ($f > 0,2$), indicando desvio de panmixia devido ao sistema de reprodução, ou seja, cruzamento entre indivíduos aparentados. A população de Cubatão apresentou a menor diversidade gênica encontrada em todas as populações, isto pode ser devido ao isolamento genético desta população e alta taxa de endogamia.

Tabela 4.5 - Estimativa da diversidade gênica (h), heterozigosidade observada (H_o) e Índice de fixação (f)

População	h	H_o	f
Alagoas	0,613	0,487	0,208
Rio Grande do Sul	0,561	0,508	0,098
Iha do Cardoso	0,580	0,485	0,172
Paraíba	0,584	0,492	0,162
Rio Grande Norte	0,673	0,582	0,150
Porto de Areia/SP	0,627	0,687	-0,102
Charqueada/SP	0,673	0,612	0,096
Dura Flora/SP	0,580	0,553	0,046
Pantanal/SP	0,646	0,580	0,105
Mato grosso do Sul	0,677	0,536	0,216
Cubatão/SP	0,544	0,415	0,241
Média	0,614	0,540	0,127

A maioria das populações não apresentaram desvio ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg ao nível de 1 % para nenhum marcador. Na maioria das vezes que houve o desvio do equilíbrio, a heterozigosidade esperada foi maior que a observada mostrando assim uma

deficiência de heterozigotos nas populações. Em populações naturais o desvio do EHW pode ser esperado, principalmente em espécies que foram muito reduzidas (como *Caiman latirostris*) e podem ser explicados por diversos fatores: subdivisões dentro das populações, antepassados comuns, seleção natural (FUTUYMA, 1998).

Estrutura Genética

As 11 populações estudadas encontram-se estruturadas ($R_{ST} = 0.407$; $F_{ST} = 0.271$; $p < 0,001$), de acordo com Slatkin (1995) a estimativa R_{ST} é mais apropriado para análise de locos com taxas de mutação elevada, como é o caso dos microsatélites, em nossas análises comparamos as estimativas R_{ST} e F_{ST} . As duas estimativas foram altas na maioria dos locos utilizados indicando que existe uma alta variabilidade entre populações (Tabela 4.6). Estes índices de diferenciação encontrados em nosso trabalho foram bem maiores do que os encontrados para populações de: *M. niger* ($F_{ST}=0.13$) (THOISY et al., 2006); *A. mississippiensis* do sudeste dos Estados Unidos ($R_{ST} = 0.131$; $F_{ST} = 0.181$) (DAVIS et al., 2002) e do Texas ($F_{ST} = 0.102$) (RYBERG et al., 2002); *Crocodylus moreletti* ($R_{ST} = 0.100$; $F_{ST} = 0.062$) (DEVER et al., 2002).

As populações de *Caiman latirostris* estudadas, já passaram ou encontram-se em forte processo de diferenciação, já que 59.3% da variação encontrada esta dentro das populações e 40.7% entre elas ($R_{ST} = 0,407$). Geralmente espécies com ampla distribuição geográfica desenvolvem populações adaptadas localmente que, na maioria das vezes, são geneticamente distintas (FUTUYMA, 1998). A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos para a conservação de uma espécie, já que é ela que fornece o potencial adaptativo. Por este motivo, o conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela esta estruturada em suas populações é fundamental para as ações de manejo e conservação. Um fator importante é entender se a estruturação genética encontrada é uma característica natural da espécie estudada ou resultados da presença de barreiras físicas causadas pelo homem (como a fragmentação do habitat) (GALLETTI et al, 2008).

Tabela 4.6 - Valores de R_{ST} e F_{ST} (diagonal inferior) e distância geográfica em km (diagonal superior). Números em azul e vermelho representam a maior e menor diferenciação encontrada (respectivamente)

		AL	RS	RN	PB	POA	PT	CHA	DUF	MS	IC	CUB
AL		-	2986	467	365	1866	1851	1840	1912	2474	2062	1858
RS	R_{ST}	0,294	-	3466	3352	1175	1187	1199	1170	1310	935	1117
	F_{ST}	0,265										
RN	R_{ST}	0,246	0,213	-	157	2325	2311	2299	2363	2869	2535	2237
	F_{ST}	0,217	0,203									
PB	R_{ST}	0,246	0,187	0,004	-	2223	2209	2197	2266	2812	2425	2335
	F_{ST}	0,245	0,261	0,055								
POA	R_{ST}	0,526	0,478	0,465	0,542	-	15	26	95	913	247	216
	F_{ST}	0,284	0,316	0,253	0,331							
PT	R_{ST}	0,416	0,345	0,336	0,405	0,103	-	12	105	920	273	217
	F_{ST}	0,313	0,331	0,232	0,298	0,167						
CHA	R_{ST}	0,401	0,444	0,429	0,495	0,162	0,170	-	110	922	284	212
	F_{ST}	0,276	0,296	0,192	0,246	0,173	0,126					
DUF	R_{ST}	0,490	0,491	0,473	0,519	0,100	0,198	0,039	-	816	307	306
	F_{ST}	0,255	0,304	0,293	0,327	0,209	0,291	0,215				
MS	R_{ST}	0,251	0,372	0,221	0,340	0,196	0,133	0,123	0,219	-	998	1089
	F_{ST}	0,317	0,321	0,261	0,327	0,211	0,244	0,215	0,274			
IC	R_{ST}	0,488	0,619	0,625	0,661	0,66	0,472	0,561	0,609	0,436	-	195
	F_{ST}	0,243	0,284	0,253	0,271	0,327	0,343	0,304	0,315	0,338		
CUB	R_{ST}	0,525	0,661	0,687	0,688	0,779	0,584	0,699	0,703	0,589	0,279	-
	F_{ST}	0,311	0,280	0,277	0,304	0,373	0,372	0,355	0,369	0,363	0,076	

As estimativas de R_{ST} e F_{ST} foram estatisticamente diferente de zero para todas as comparações par a par entre as populações estudadas, indicando assim uma subdivisão entre estas populações, exceção feita a comparação entre a população de Natal (RN) e a população de João Pessoa (PB), mostrando que não há ou existe pouca diferenciação genética entre estas duas populações. Pelo índice F_{ST} as populações de Cubatão (CUB) e Ilha do Cardoso (IC) apresentam pouca diferenciação genética, ou seja, não estão estruturadas, indicando haver fluxo gênico entre elas, o que seria natural devido à pequena escala geográfica (195 Km) possivelmente percorrida pela espécie na ausência de barreiras físicas.

As populações mais isoladas geneticamente foram Cubatão e Porto de Areia/SP ($R_{ST}=0$, 779 e $F_{ST}=0,373$) com distância geográfica de 216 km, o que sugere que as diferenças entre estas populações não seguem o modelo de isolamento por distância. O par mais próximo geneticamente foi a população de João Pessoa (PB) e Natal (RN), onde observamos o valor de $R_{ST}=0,004$ e $F_{ST}=0,055$, com distância geográfica de 157 km, indicando um alto fluxo gênico entre estas populações. As diferenciações encontradas em populações próximas geograficamente

no interior do estado de São Paulo (DuF, PoA, CH e PT) eram esperadas (VERDADE; ZUCOLOTO; COUTINHO, 2002; ZUCOLOTO, 2003). A melhor explicação da variação microgeográfica encontrada neste trabalho, é a de metapopulações pequenas com pouco fluxo de indivíduos entre elas, dificultando o fluxo gênico, e fazendo com que as frequências de alelos e de genótipos se diferenciem entre as populações ao longo do tempo por estarem mais susceptíveis aos efeitos da deriva genética devido à alta fragmentação presente no estado de São Paulo. Esta estruturação populacional de crocodilianos em pequena escala geográfica já havia sido encontrada para *Melanosuchus niger* (THOISY et al., 2006), *Caiman yacare* (GODSHALK, 2002) e *Alligator mississippiensis* (RYBERG et al., 2002). De acordo com Thoisy et al. (2006) para populações de *M. niger* da Guiana Francesa a explicação para esta diferenciação genética em pequena escala geográfica (eqüidistantes aproximadamente 30 km) foi correlacionada com a diferença do tipo de habitats (pântano e estuário), já a maior divergência encontrada em *M. niger* nas populações brasileiras da Amazônia (população do Arquipélago das Anavilhanas no Rio Negro e populações do Lago de Janauacá, eqüidistantes aproximadamente 150 km), foi correlacionada com diferenças ecológicas e limnológicas entre populações habitantes de águas pretas e águas claras.

O padrão de diferenciação genética entre as onze populações naturais de *Caiman latirostris* foram definidos pelo método UPGMA, resultando em um dendograma apresentado na Figura 4.2 para estimativa R_{ST} e na figura 4.3 para estimativa F_{ST} . A correlação cofenética do agrupamento UPGMA destas matrizes foram elevadas R_{ST} ($r=0,931$, $p<0,0002$) e F_{ST} ($r=0,895$, $p<0,001$).

A população da Ilha de Cardoso (IC) e de Cubatão (CUB), mesmo não estando muito distante geograficamente das populações paulistas, apresentaram os maiores índices de diferenciação de todas as populações estudadas, indicando que não foi a distância o fator que impediu o fluxo entre elas e as populações do continente. Neste caso parece que a “Serra do Mar” é uma barreira geográfica efetiva entre populações do litoral e interior, funcionando como obstáculo à migração, o que proporciona a diminuição ou interrupção do fluxo gênico ao longo do tempo, levando a um isolamento maior do que seria resultado apenas da distância geográfica (Figura 5.2 e 5.3). Pelo menos dentro do Estado de São Paulo, onde Planalto Atlântico pode alcançar mais que 1.000m de altitude. As espécies normalmente não são encontradas em altitudes superiores a 800m (YANOSKY, 1994), o que parece corroborar com esta hipótese.

Figura 4.2 - Padrão de diferenciação genética obtido pela estatística R_{ST} entre as populações de *Caiman latirostris* pelo método UPGMA

Figura 4.3 - Padrão de diferenciação genética obtido pela estatística F_{ST} entre as populações de *Caiman latirostris* pelo método UPGMA

As populações de Cubatão e Ilha do Cardoso apresentam diferenciações genéticas maiores no índice R_{ST} do que no F_{ST} , mas encontram-se agrupadas, mostrando uma maior semelhança genética entre elas, indicando que embora *Caiman latirostris* seja uma espécie palustre que

parece evitar canais de água grande e abertos (MEDEM, 1983; VERDADE, 1998), a presença do Canal (aproximadamente 1,5Km de água salgada) entre a ilha e o continente não atrapalhou o fluxo entre as populações, confirmando relatos anteriores que as espécies de crocodilianos podem percorrer distâncias relativamente grandes de água salgada (GRIGG et al., 1998).

A população do Rio Grande do Sul (RS), mesmo estando fisicamente mais próxima das populações de São Paulo, apresentou uma menor divergência com as Populações do Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB) e Alagoas (AL), fato que merece um estudo mais detalhado da relação entre estas populações.

Com os dados de sequenciamento de 545pb do citocromo b do DNA mitocondrial foi gerado uma árvore segundo o método de distância UPGMA, a análise do *Model test* mostrou que o melhor Modelo evolutivo seria TIM+G. Os resultados obtidos pelo dendograma com dados microssatélites foram similares pela análise do DNA mitocondrial (Figura 4.4), mas nesta análise percebemos que a população do Rio Grande do Sul não apresenta maior semelhança com as populações do nordeste, apenas encontra-se agrupada com as demais populações do litoral, indicando assim que a maior semelhança genética encontrada anteriormente pode ser ao acaso, devido a deriva genética, já que percebemos que atualmente parece não existir fluxo entre estas populações.

Para a análise de variância molecular (AMOVA) com a sequência do DNA mitocondrial foi testada a seguinte hipótese: presença de dois grupos, formado por populações do interior e litoral. Os dados obtidos mostram um padrão de subdivisão significativo entre o agrupamento onde temos que 71,84 % ($p < 0,001$) da variabilidade existente está distribuída entre os grupos genéticos (litoral e interior) e uma menor parte (28,16%) dentro desses grupos (Tabela 4.7).

Figura 4.4 – Árvore obtida pelo método de distância UPGMA nas populações de *Caiman latirostris*

Tabela 4.7 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre haplótipos de populações de *Caiman latirostris* divididas em dois grupos (litoral e continente) utilizando sequência do citocromo b

Fontes de Variação	GL	Porcentagem de variação	P-valores
Entre grupos	1	71,84	P<0,0001
Dentro de Grupos	9	28,16	P<0,0001

Em Ryberg et al., 2002, a análise de variância molecular não foi significativa para explicar o padrão de diferenciação de populações de *A. mississippiensis* do litoral e interior do Texas. Vasconcelos et al. (2004) encontrou forte estruturação geográfica em *Caiman crocodilus* através de seqüências do DNA mitocondrial, e pela análise de variância molecular (AMOVA) verificou que aproximadamente 49% da variação observada encontra-se entre biomas da Amazônia e mata Atlântica.

No nosso trabalho os resultados com dados microsatélite e DNA mitocondrial (com diferentes taxas de evolução) foram parecido e mostraram maior semelhança genética entre as populações dos litorais. Isto pode ser devido ao de fato que no Pleistoceno (16.000 anos atrás), o nível do mar era mais baixo ao longo da costa Brasileira (SCHWARZBOLD; SCHAFER, 1984). Durante este período os cursos d'água ao longo da costa do Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul eram conectado formando assim uma vasta área de drenagem litoral (WEITZMAN et al., 1988), sem barreira aparente para fluxo genético do Jacaré de papo-amarelo (*Caiman latirostris*) e estas populações estavam relativamente isoladas de bacias de rios continentais. Este padrão de maior semelhança genética ainda permanece em populações do litoral, mas no cenário atual percebemos a ausência de fluxo gênico em uma escala geográfica grande, com altos índices de diferenciação provavelmente pelo isolamento por distância, estando vulnerável a deriva. Em populações onde a escala geográficas é menor, como no caso de Rio Grande do Norte e Paraíba e Ilha do Cardoso e Cubatão, esta semelhança ainda é encontrada e não temos a subdivisão destas populações.

A análise de agrupamento realizada pelo programa Structure 2.1 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) sugere que as 12 populações de *Caiman latirostris* estudadas estão subdivididas em dez grupos, pois a estatística DeltaK sugerida por Evanno et al, 2005 identificou nessas populações maior probabilidade em K=10 (Figura 4.5)

Figura 4.5 - Estimativa de melhor K para as doze populações de *C. latirostris* estudadas de acordo com parâmetros de DeltaK. Valores para cada K, calculado como $K = m|L''(K)|/s[L(K)]$ (EVANNO et al., 2005)

Assim, foi possível a visualização da distribuição das populações conforme estrutura genética para K=10 (Figura 4.7 e 4.8). Com base neste valor de K escolhido, a Tabela 4.8 mostra a probabilidades de certificação das doze populações de *Caiman latirostris* amostrados ao longo dos 10 grupos genéticos definidos.

O grupo 1 foi formado por indivíduos provenientes da população do Rio Grande do Sul (RS). O grupo 2 foi formado, principalmente, por indivíduos provenientes da população de Cativeiro e também com contribuição de indivíduos de Charqueada/SP com probabilidade maior que 90%, o que era de se esperar, pois na colônia de cativeiro da ESALQ temos realmente animais provenientes esta localidade. O grupo 3 foi formado por indivíduos provenientes da população de Charqueada.

Tabela 4.8- Resultado do STRUCTURE para K=10 (probabilidade média para cada população). Em negrito refere-se ao número de indivíduos atribuídos para um dos 10 clusters com probabilidade >0,90. O número total de indivíduos de cada população esta entre parêntese

POP	Clusters definidos pelo Structure										n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AL	0.032	0.060	0.004	0.002	0.003	0.004	0.006	0.005	0.018	18 /0.87	25
RS	16 /0.96	0.004	0.003	0.002	0.002	0.005	0.003	0.006	0.009	0.005	17
RN	0.018	0.030	0.023	0.006	0.006	0.006	0.009	0.007	3 /0.892	0.004	5
PB	0.007	0.005	0.007	0.002	0.004	0.004	0.003	0.003	12 /0.96	0.003	12
POA	0.003	0.005	0.004	0.005	9 /0.96	0.012	0.004	0.002	0.004	0.004	9
PT	0.004	0.015	0.049	14 /0.81	0.09	0.01	0.005	0.003	0.003	0.003	20
CHA	0.007	1 /0.08	9 /0.74	0.034	0.102	0.013	0.008	0.003	0.006	0.004	12
DUF	0.003	0.027	0.008	0.004	0.022	20 /0.92	0.005	0.004	0.004	0.003	23
MS	0.006	0.025	0.007	0.021	0.02	0.01	8 /0.90	0.003	0.004	0.008	10
IC	0.003	0.009	0.005	0.002	0.004	0.006	0.003	7 /0.90	0.016	0.048	9
CUB	0.007	0.004	0.002	0.003	0.004	0.003	0.003	24 /0.96	0.006	0.004	25
CAT	0.004	2 /0.676	0.012	0.049	0.062	0.141	0.025	0.002	0.018	0.01	6

O grupo 4 foi formado por indivíduos provenientes da população do Pantanal/SP. O grupo 5 foi formado por indivíduos provenientes da população de Porto de Areia/SP. O grupo 6 foi formado por indivíduos provenientes da população de Dura Flora/SP. O grupo 7 foi formado por indivíduos provenientes da população do Mato Grosso do Sul. O grupo 8 foi formado por indivíduos provenientes das populações da Ilha do Cardoso e Cubatão. O grupo 9 foi formado por indivíduos provenientes das populações da Paraíba e do Rio Grande do Norte. O grupo 10 foi formado por indivíduos provenientes da população de Alagoas. Assim de acordo com a tabela 5.6 as populações do Rio Grande do Norte e Paraíba e as populações da Ilha do Cardoso e Cubatão,

estão diretamente relacionadas, os valores observados (0,892 e 0,963) e (0,902 e 0,963), respectivamente, comprovam a alta proporção das mesmas, refletindo uma alta identidade genética, confirmam a existência de fluxo gênico entre indivíduos destas populações.

Nas Figuras 4.7 e 4.8 temos os resultados obtidos pelo programa Structure 2.1, mostraram a distribuição e influência de cada grupo genético dentro das populações inferidas.

A maioria dos indivíduos foram atribuídos corretamente ao grupo representado pela sua população de origem (onde as amostras foram coletadas), de um total de 173 indivíduos sete foram atribuídos a população errada.

O indivíduo 23 de Alagoas foi atribuído a população de Cativeiro (probabilidade = 0,400). O indivíduo 4 da População de São Pedro/Pantanal/SP foi atribuído a população de Charqueada (probabilidade = 0,467) e os indivíduos 7 e 8 foram atribuídos para população de Porto de areia (probabilidade= 0,781 e 0,798, respectivamente). Os indivíduos 4 e 7 da população de Charqueada foram atribuídos para população de Porto de areia (probabilidade= 0,663 e 0,474, respectivamente) e o indivíduo 5 foi atribuído para a população de cativeiro (probabilidade= 0,910). Os dois indivíduos que foram atribuídos ao grupo da população de cativeiro, não deve ser considerado como atribuição errada, pois como já mencionado anteriormente esta população foi formada por indivíduos amostrados da natureza, inclusive desta região, possuindo genes em comum, mas não devido à imigração. Sendo assim podemos dizer que aproximadamente 96% dos indivíduos foram atribuídos a população de origem corretamente.

Na Figura 5.8 podemos visualizar a contribuição de cada indivíduo para sua população de origem. Os indivíduos atribuídos a populações erradas (4%) são pertencentes a populações vizinhas do interior do Estado de São Paulo (POA, PT e CHA), indicando a presença de imigração recente nestas populações, sugerindo que mesmo que limitado, existe fluxo gênico entre elas. As outras populações mostram uma subdivisão bem evidente, indicando ausência recente de fluxo e isolamento destas populações.

Figura 4.7- Resultado do STRUCTURE para $K = 10$, cada cor representa um agrupamento e a probabilidade do indivíduo pertencer a este agrupamento. Mapa: As 11 localidades onde as populações foram amostradas e as cores representam o grupo genético que elas foram atribuídas

Figura 4.8 – Representação do Q:coeficiente de participação do indivíduo a cada grupo, representados de cores diferentes. Cada linha vertical corresponde a um indivíduo

O Stokes de reprodutores da população de Cativeiro está representando a diversidade de algumas populações da região de Piracicaba, e observamos também compartilhamento de alelos com a população de Alagoas, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Norte (Figura 4.8). O programa de criação em cativeiro da Escola Superior de Agricultura/USP/SP parece ter sido efetivo no estabelecendo do sistema de *farming* (reprodução de uma espécie em cativeiro, em ciclo fechado) no sudeste do Brasil (VERDADE, 2001b). Não obstante, seu possível valor para esforços de conservação *ex situ* pode ser considerado como uma alternativa.

Azevedo (2003) diz que a criação comercial de crocodilianos em cativeiro tem sido uma das opções para preservar espécies e minimizar o declínio de populações na natureza e que o manejo reprodutivo é um dos requisitos mais importantes na produção de jacarés.

Para verificar se havia correlação entre distância geográfica e diferenciação genética, submeteu-se as matrizes dessas distância ao teste de Mantel. O coeficiente de correlação obtido foi baixo e não significativo para R_{ST} ($r = 0.236$; $P = 0.1119$) e para F_{ST} ($r = 0.1210$; $P = 0.2028$) indicando que não há uma maior diferenciação genética com aumento da distância geográfica (modelo de isolamento por distância).

Esta análise de correlação entre as matrizes de distância geográfica e diferenciação genética foi novamente realizada retirando-se a população da Ilha do Cardoso (IC) e a população de Cubatão (CUB), pois estas populações são um caso particular onde a “Serra do Mar” parece ser uma barreira eficiente, o que é independente da distância geográfica. Quando estas populações foram retiradas nesta análise a matriz de diferenciação genética (R_{ST} e F_{ST}) e a matriz de distância geográfica estiveram positivamente correlacionadas para R_{ST} ($r = 0.4791$, $P > 0.001$) e para F_{ST} ($r = 0.4418$, $P > 0.001$). Esta correlação positiva entre as matrizes de divergência genética e distância geográfica indica que o modelo de isolamento por distância explica 47% ou 44% da divergência genética entre as populações. Desta forma podemos ter uma idéia de como o fluxo gênico atua em relação a escala geográfica. A taxa máxima de aumento na diferenciação genética acontece a uma distância de 280km para populações continentais das espécies. Esta distância é relacionada possivelmente a dispersão padrão das espécies de crocodilianos (CAUGHLEY; SINCLAIR, 1994; SINCLAIR et al., 2006) e a habilidade de movimento de indivíduo (CAMPOS et al., 2006). A partir daí o aumento da distância geográfica tem um efeito menor na diferenciação genética (Figura 4.9). Este padrão deveria ser considerado para conservação de espécies contanto que nenhuma barreira geográfica estiver envolvida.

Em escala microgeográfica, embora as espécies possam colonizar habitats antrópicos como açudes artificiais pequenos em fazenda de gado (SCOTT et al., 1990), sua dispersão parece restrita nestas circunstâncias (VERDADE et al., 2002). Podendo conduzir a fragmentação da população, deriva genética e *inbreeding* (FOOSE; BALLOU, 1988).

Figura 4.9 - Correlação entre a distância geográfica em linha reta e a diferenciação genética entre pares de população (R_{ST} e F_{ST}). Os círculos representam as distâncias geográficas e a diferenciação genética das nove populações com a Ilha do Cardoso e Cubatão. Os triângulos representam as comparações entre Rio Grande do Sul e as populações do Nordeste do Brasil [Alagoas (AL), Paraíba (PB), e Rio Grande do Norte (RN)]

Em um balanço macrogeográfico, a distribuição da espécie cobre três bacias hidrográficas principais: a bacia do São Francisco, Paraná e pequenas bacias costeiras drenagens do Rio Grande do Sul para o Rio grande Norte (VERDADE; PIÑA, 2006). Desde que estas áreas coincidem com as maiores densidades de população humanas na América do Sul, todos eles têm problemas de poluição e perda de hábitat. Pequenas bacias costeiras habitadas pela espécie no Brasil oriental são atualmente fragmentada. Porém, em recentes tempos geológicos eles formaram uma área de drenagem contínua nas populações do litoral do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul sem barreira aparente para fluxo genético das populações (SCHWARZBOLD; SCHAFER, 1984), por isto, eles também devem ser considerados para propósitos de conservação.

Resultados presentes sugerem que a única população de *Caiman latirostris* que se encontra na bacia do rio Paraguai (Bonito/Mato Grosso do Sul) está relativamente isolada das outras e, por conseguinte também requer esforços de conservação. Estudos genéticos futuros da espécie deveriam incluir populações da Bacia do São Francisco, pois esta região cobre uma porção extensa da área do norte da distribuição de espécies (VERDADE; PIÑA, 2006).

4.3 Conclusões

A maior parte da variabilidade genética encontrada nas populações de *Caiman latirostris* estão correlacionadas com diferentes sub-biomas no litoral e interior. Existe uma relação entre distância geográfica e diferenciação genética, porém outros fatores de biogeografia são pertinentes. O jacaré-de-papo-amarelo cobre uma grande área de distribuição que pode conduzir a pressões seletivas variando as respostas genéticas. A estrutura genética das espécies parece compatível com isto, mostrando que existem vários níveis de estruturação, dependendo da população em questão. O conhecimento da composição genética desta espécie, e de como ela esta estruturada em suas populações será fundamental para ações futuras de manejo e conservação se necessário.

Referências

- AZEVEDO, J.C.N. **Crocodilianos**: biologia, manejo e conservação. João Pessoa: Ed Arpoador, 2003. 122 p.
- CAMPOS, Z; COUTINHO, M; MOURÃO, G; BAYLISS, P; MAGNUSSON, WE. Long distance movements by *Caiman crocodilus yacare*: Implications for management of the species in the Brazilian Pantanal. **Herpetological Journal**, London, v. 16, p. 123-132, 2006.
- CAUGHLEY, G.; SINCLAIR, A.R.E. **Wildlife ecology and management**. Boston: Blackwell Scientific, 1994. 334 p.
- DAVIS, L.M.; GLENN, T.C.; STRICKLAND, D.C.; GUILLETTE, L.J.J.R.; ELSEY, R.M.; RHODES, W.E.; DESSAUER, H.C.; SAWYER, R.H. Microsatellite DNA analyses support an East-West phylogeographic split of American alligator populations. **Journal Experimental Zoology. Molecular and Developmental Evolution**, Philadelphia, v. 294, p. 352-372, 2002.
- DEVER, J.A.; STRAUSS, R.E.; RAINWATER, T.R.; MCMURRY, S; DENSMORE, L.D. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletti*) from Belize, Central America. **Copeia**, Washington, p. 1078-1091, 2002
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 14, p. 2611-2620, 2005.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 175-185, 1998.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin, ver.3.000**: an integrated software package for population genetic data analysis. Berne: University of Berne, Institute of Zoology, Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), 2005. 23 p.
- FOOSE, T.J.; BALLOU, J. Population management: theory and practice. Management of small populations. **International Zoo Yearbook**, London, v. 27, p. 26-41, 1988.
- FUTUYMA, D.J. **Evolutionary biology**, 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 600 p.

GALETTI J.R.; RODRIGUES, F.P.; SOLÉ-CAVA, A.M.; MIYAKI, C.Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E.A.; SANTOS, F.R.; FARIAS, I.P.; VIANNA, J.A.; OLIVEIRA, L.R.; WEBER, L.I.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FRANCISCO, M.R.; REDONDO, R.A.F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S.N.; FREITAS, T.R.O.; HRBEK, T.; MOLINA, W. F. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. (Ed). **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. cap. 10, p. 199-229.

GLENN, T. C.; DESSAUER, H. C.; BRAUN, M. J. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. **Copeia**, Washington, v. 3, p. 591-601, 1998.

GODSHALK, R. Conservation genetics for *Caiman yacare* in Bolivia: potential forensic applications. In: WORKING MEETING OF THE CROCODILE SPECIALISTS GROUP, 16., 2002, Gland. **Proceedings...** Gland: IUCN, 2002. p. 219.

GOODMAN S.J. RST calc: A collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 6, p. 881-885, 1997.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, n. 8, p. 195-202, 1998.

GRIGG, G.C.; BEARD, L.A.; MOULTON, T.; MELO, M.T.Q.; TAPLIN, L.E. Osmoregulation by the broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*, in estuarine habitat in southern Brazil. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v. 168, p. 445-452, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford., v. 41, p.95-98, 1999.

HOEZEL, A.R. **Molecular genetic analysis of populations**. Oxford: IRL Press. 1992. 315 p.

HUTTON, J.M.; LOVERIDGE, J.P.; BLAKE, D.K. Capture methods for the Nile crocodile in Zimbabwe. In: WEBB, G.J.W.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 211-216.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. version 1.0 (d15). Disponível em: <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. Acesso em: 12 dez. 2007.

MEDEM, F. **Los Crocodylia de Sul América**. Bogotá:: Univ. Nac. Colombia y Fondo Col. Invest. Cien. Poy. Esp. “Francisco José de Caldas”, 1983. v. 2

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

OLSON GA, HESSLER JR, FAITH RE. Techniques for blood collection and intravascular infusion of reptiles. **Laboratory Animal Science**, Joliet, v. 25, p. 783-786, 1975.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Baltimore. v. 155, p. 945-959, 2000.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, p. 817-818, 1998.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Cary, v. 86, p. 248-249, 1995.

RYBERG, W.A.; FITZGERALD, L.A.; HONEYCUTT, R.L.; CATHEY J.C. Genetic relationships of American alligator populations distributed across different ecological and geographic scales. **Journal Experimental Zoology. Molecular and Developmental Evolution**, Philadelphia, v. 294, p. 325-333, 2002.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc 1.70**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Setauket: Applied Biostatistics, 1992. 1 CD-ROM

SCHWARZBOLD, A.; SCHAFER A. Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brazil. **Amazoniana**, Manaus, n. 9, p. 87-104, 1984.

SCOTT, N.J, JR.; AQUINO, A.; FITZGERALD, L.A. Distribution, habitats and conservation of the caiman (Alligatoridae) of Paraguay. **Vida Silvestre Neotropical**, San José, v. 2, p. 43-51, 1990.

SILL, W.D. The zoogeography of the Crocodylia. **Copeia**, Washington, v. 1968, p. 76-88, 1968.

SINCLAIR, A. R. E.; FRYXELL, J. M.; CAUGHLEY, G. **Wildlife ecology, conservation, and management**. 2nd ed. Malden: Blackwell, 2006. 469 p.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 139, p. 457-462, 1995.

THOISY, B. ; HRBEK, T. ; FARIAS, I. P. ; VASCONCELOS, W. R. ; LAVERGNE, A. Genetic structure, population dynamics and conservation of Black caiman (*Melanosuchus niger*). **Biological Conservation**, Barking, v. 33, p. 474-482, 2006.

THOMPSON, J. D. T. J.; GIBSON, F.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, D. G. HIGGINS. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VASCONCELOS, W.R. **Diversidade Genética e Estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) da Amazônia.** 2004. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

VERDADE, L.M. Manejo e conservação do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: VALLADARES-PÁDUA, C.B.; BODMER, R.E.; CULLEN, L.J.R. (Ed.). **Manejo de vida silvestre para a conservação.** Mamirauá: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. p. 222-232.

_____. *Caiman latirostris*. In: ROSS, J.P. (Ed.). **Crocodile status survey and conservation action plan.** Gland: IUCN., 1998. p. 18-20.

_____. The São Francisco River ‘codfish’: the northernmost populations of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Crocodile Specialist Group Newsletter**, Sanderson, v. 20, p.29-30, 2001a.

_____. O programa experimental de criação em cativeiro do Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*) da ESALQ/USP: histórico e perspectivas. In: MATTOS, W.R.S. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros.** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001b. p. 559-564.

VERDADE, L.M.; PIÑA C.I. *Caiman latirostris*. **Catalog of the American Society of Amphibians and Reptiles**, Salt Lake, v.833, p.1-21, 2006

VERDADE, L.M.; SARKIS-GONÇALVES, F. Age at first reproduction in captive *Caiman latirostris* (Broad-snouted Caiman). **Herpetological Review**, Lawrence, v. 29, p. 227-228, 1998.

VERDADE, L.M.; ZUCOLOTO, R.B.; COUTINHO, L.L. Microgeographic variation in *Caiman latirostris*. **Journal Experimental Zoology. Molecular and Developmental Evolution**, Philadelphia, v. 294, p. 387-396, 2002.

VILLELA, P.M.S. **Caracterização Genética De Populações de Jacaré-De-Papo-Amarelo(*Caiman Latirostris*), utilizando Marcadores Microsatélites.** 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VILLELA, P.M.S.; COUTINHO, L.L.; PINA C.I.; VERDADE, L.M. Macrogeographic genetic variation in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Journal Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 309A, p. 628- 636, 2008.

WALSH, B. Crocodile capture methods used in the Northern Territory of Australia. In: WEBB, G.J.W.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators.** Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 249-252.

WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A.; WEITZMAN, M.J. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: VANZOLINI, P.E; HEYER, W.R, editors. **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciência, 1988. p. 379-427.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian population. **Genetics**, Baltimore, v. 16, p. 97-159, 1931.

YANOSKY, A.A. A population of *Caiman latirostris* at 800 m above sea level. **Bulletin Maryland Herpetological Society**, Baltimore, v. 30, p. 108-113, 1994.

ZUCOLOTO, R.B. **Desenvolvimento de sequências microssatélite para estudo de populações remanescentes de Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*), da região central do estado de São Paulo**. 2003. 118 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ZUCOLOTO, R.B.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. **Journal Experimental Zoology. Molecular and Developmental Evolution**, Philadelphia, v. 294, p. 346-351, 2002.

5 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *PALEOSUCHUS TRIGONATUS*

Resumo

Novos marcadores genéticos foram caracterizados para jacaré-coroa (*Paleosuchus trigonatus*) pela construção de bibliotecas enriquecidas de DNA microssatélites. A construção e a caracterização desta biblioteca estão descritas no presente trabalho. Esses marcadores foram testados em duas populações da espécie *P. trigonatus* e resultaram em oito novos microssatélites polimórficos. O número de alelos variou de cinco a onze, com uma média de 7,75 alelos por loco, e a heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,5343 a 0,8550. O conteúdo de informação polimórfica médio (PIC) foi 0,6694. Os testes de amplificações heteróloga destes marcadores sugerem que estes locos poderão ser utilizados nas outras espécies de crocodilianos brasileiros.

Palavras-chave: *Paleosuchus trigonatus*; Marcadores microssatélites; Amplificação interespecífica

Abstract

New genetic markers were characterized for the Schneider's Dwarf Caiman (*Paleosuchus trigonatus*) by constructing libraries enriched for microsatellite DNA. Construction and characterization of these libraries are described in the present study. These markers were tested in two wild populations of *P. trigonatus* and resulted in eight new polymorphic microsatellite markers. The number of alleles per locus ranged from five to eleven, with a mean of 7.75. The expected heterozygosities varied from 0.5343 to 0.8550. The mean polymorphic information content (PIC) was 0.6694. Cross-species amplification suggested that these loci may be useful in the other species of Brazilian crocodilians.

Keywords: *Paleosuchus trigonatus*; Microsatellite markers; Cross-species amplification

5.1 Introdução

A utilização de marcadores microssatélites tem facilitado a compreensão de questões relevantes em estudos de estrutura genética populacional, respondendo a questões ecológicas essenciais para a adoção de medidas conservacionistas. Temos pouco conhecimento relacionado a parâmetros populacionais para a espécie *Paleosuchus trigonatus*. Como não tivemos sucesso na transferência de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Caiman latirostris* (ZUCOLOTO et al, 2002) e para *Alligator mississippiensis* (GLENN et al., 1998) em *P. trigonatus*, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para esta espécie. Foi utilizado um protocolo eficiente para a construção de uma biblioteca enriquecida em microssatélites, a partir da qual foram isolados oito marcadores microssatélites polimórficos.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e Métodos

População experimental

Foram coletados 23 indivíduos da espécie *Paleosuchus trigonatus*, 13 indivíduos distribuídos na região próxima a Manaus e 10 indivíduos no Rio Madeira.

Método de captura e imobilização de jacaré

As capturas dos animais e a coleta das escamas foram feitas à noite, manualmente ou com o auxílio de laço de cabo de aço, após visualização com facho de luz intensa do tipo *sealed beam* e aproximação em barco, conforme descrito por Hutton et. al. (1987) e Walsh (1987). Sua imobilização foi mecânica, dispensando-se o uso de anestésicos ou relaxantes musculares, conforme realizado por Verdade (1997). As escamas foram armazenadas em Etanol 94%.

Extração e Digestão do DNA Genômico.

O DNA genômico foi extraído da escama de um indivíduo de *Paleosuchus trigonatus* utilizando o método de digestão com Proteinase K. Foram cortados pedaços (de 2 a 3mm) da escama caudal de cada indivíduo, e posteriormente foram acrescentados: 500µl de tampão de lise celular (10mM Tris, 100mM EDTA, 2% SDS; PH 8.0), 15µl Proteinase K (20mg/ml) e incubado *overnight* à 55 °C. A proteína é precipitada dessa solução com 200µl de Acetato de Amônio (7,5M) incubando-se no gelo por 20-30, centrifugando-se a 14000 rpm por 5 min., descartando o sobrenadante. O DNA é precipitado dessa solução com 500 l isopropanol absoluto, centrifugando-se a 12000 rpm por 10 min., descartando o sobrenadante. Faz-se duas lavagens com 500 l Etanol 70%, com centrifugações de 5 min. à 12000 rpm em cada lavagem. O pellet é seco em estufa a 37°C por 30 min. e suspenso em 50 l de H₂O MilliQ e armazenado em *freezer* à -20°C. Após as extrações as amostras foram lidas em espectrofotômetro (HITACHI U-2000) para determinar a quantidade de DNA. O DNA foi precipitado com etanol e acetato de sódio e ressuspendido em um menor volume de água suficiente para que a concentração final fosse de 1 g/ l. Este DNA foi digerido com a enzima RSAI para gerar fragmentos no intervalo de 200 a 800 pares de base. Foram utilizado 4U da enzima para digerir cada 1 g de DNA. A reação de

restrição foi mantida a 37°C e, após 16 horas, foi interrompida através da incubação a 65 °C por 15 minutos.

Ligação dos adaptadores

O processo de enriquecimento utilizado foi adaptado de ZANE et al. (2002). Este processo requer uma etapa de PCR ao final, para atender a esta etapa final, é necessário ligar os fragmentos digeridos a adaptadores, cuja sequência foi construída para ser local de anelamento do *primer* da PCR. A ligação dos adaptadores é importante para garantir que cada fragmento (previamente digerido com a enzima *Rsa* I) tenha uma terminação comum e conhecida. A ligação dos adaptadores ocorre através da reação catalisada pela enzima DNA ligase. Assim, serão formados fragmentos de DNA com sequências conhecidas para hibridização do “primer” (“PrimerSau”) na reação de PCR.

Sequências dos adaptadores utilizados:

Rsa21 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'
Rsa25 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'

As sequências dos adaptadores são hibridizadas uma com a outra, estes adaptadores estão prontos para ligação com o DNA inserto, a extremidade coesiva resultante da reação é complementar às extremidades deixadas pela *Rsa* I nos fragmentos digeridos.

Figura 5.1 - Ligação entre o DNA inserto e os adaptadores pré-hibridizados

A reação de ligação entre o DNA inserto e os adaptadores pré-hibridizados (Figura 5.1) foi feita em volume final de 50 μ L contendo 2 μ L do adaptador Rsa21 (10 μ M), 2 μ L do adaptador Rsa25 (10 μ M), 6 μ L do DNA digerido, 10 μ L Tampão 5x de *T₄ DNA ligase*, 4 μ L de *T₄ DNA ligase* (1u/ μ L) e 26 μ L de Água MilliQ e incubada por 2 horas a 20°C.

Pré-amplificação dos fragmentos ligados aos adaptadores

Após a ligação do DNA aos adaptadores foi feita uma Pré-Amplificação via PCR para amplificar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tenha ocorrido. Após a verificação foi feita uma Purificação usando o Kit “Quiaquick PCR purification Kit” para preparar o DNA para a etapa de seleção de fragmentos que contém regiões microssatélites (enriquecimento propriamente dito). Esta etapa de seleção do fragmento de interesse requer a utilização de sondas para regiões microssatélites marcadas com biotina e esferas paramagnéticas marcadas com streptavidina, usando a propriedade de alta afinidade da streptavidina pela biotina.

Enriquecimento para microssatélites

Beads magnéticas (Streptavidine MagneSphere Paramagnetic Particles, Promega) foram utilizadas para selecionar os fragmentos contendo microssatélites. As beads foram ressuspendidas em seu tampão original, magnetizadas e o sobrenadante descartado, e em seguida lavadas sucessivamente com SSC 0.5X. Sondas de microssatélites biotinoladas (Biotina-III(CT)₈; Biotina-III(GT)₈) foram adicionadas ao DNA purificado e incubadas a temperatura ambiente por 20 min para hibridização. As beads lavadas foram então adicionadas a esta mistura de hibridização e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura de hibridização contendo os beads foi magnetizada, o sobrenadante descartado e a hibridização ressuspendida em SSC 0.1X. Os fragmentos enriquecidos com microssatélites foram eluídos em água e amplificados por PCR.

Clonagem em um vetor pGEM-T e Seqüenciamento

Imediatamente após a amplificação e confirmação da PCR por eletroforese, uma alíquota de 2 μ L dos fragmentos amplificados foi utilizada para ser introduzida em 50 ng de pGEM-T Easy Vector (Promega). A reação de ligação contendo 3U de T4 DNA ligase foi mantida em temperatura ambiente por 2 horas.

Em seguida, 2µL desta reação de ligação foi adicionada a 20 µL de células eletrocompetentes DH10B (Invitrogen) para a transformação por eletroporação (a 1.8 kV). Após o choque, 1 mL de meio de cultura SOC foi adicionado à cubeta para recuperar as bactérias. A cultura foi incubada a 37°C por uma hora sob agitação e inoculada em placas de petri com LB Agar (50mL) contendo ampicilina (50µL) e X-gal (40µL). As colônias transformadas foram inoculadas em meio de cultura e estocadas em -80°C após 24 horas de crescimento em estufa a 37°C. As colônias transformadas foram isoladas e inoculadas em meio Circle Grow com ampicilina (100mg/mL) e incubadas a 37°C por 22 horas sob agitação constante. As células foram sedimentadas a 4000 rpm por 6 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Ao pellet foram adicionados 240µL da solução GET - glicose 20%, EDTA 0,5M (pH8,0) e Tris-HCl 1M (pH 7,4). Após nova centrifugação, descartou-se o sobrenadante por inversão, e o pellet foi ressuspensionado em 80µL de GET. Foram transferidos para uma microplaca de 250µL de polipropileno de fundo redondo (tipo Elisa) contendo 2,5µL de RNase (10 mg/mL). Adicionou-se ao meio uma solução tensoativa de hidróxido de sódio (NaOH 0,2N) com SDS 1% (dodecil sulfato de sódio) e, após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, acrescentou-se 60µL de acetato de potássio 3M. Após centrifugação a 4000rpm por 4 minutos à temperatura ambiente, a solução foi filtrada em uma placa millipore (MAGV N22). Ao material filtrado acrescentaram-se 110µL de isopropanol e centrifugou-se a 4000rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em etanol 70%. Após secagem em temperatura ambiente por 60 minutos, o pellet foi ressuspensionado em 40µL de água Milli-Q. A presença de insertos foi confirmada por uma PCR a partir do DNA plasmidial obtido das colônias de bactérias.

Sequenciamento

Os clones positivos para insertos foram seqüenciados a partir dos promotores T7 ou SP6 para obtenção das seqüências microssatélites, utilizando-se o *Kit Big Dye terminators* (PE Applied Biosystems), contendo tampão *Save money* (4mM de tris-HCl, e 0,1mM de MgCl₂) para um volume final de 10µL. A reação foi feita com 25 ciclos de 95°C por 20s, 50°C por 15s, e 60°C por 1min. Após a reação foi feita a purificação do material para que os ddNTPs, dNTPs, *primers* não incorporados e a enzima não interferissem na leitura do seqüenciador. A reação de purificação foi realizada adicionando 2µL de acetato de sódio/EDTA (1,5M NaAc e 259mM EDTA) por amostra, seguida da adição de 60µL de etanol absoluto. Após agitação em vortex,

centrifugou por 45min a 4°C, 4000 rpm. O material precipitado foi lavado em etanol 70%, e centrifugado por mais 15min. Após secagem em temperatura ambiente por 1h, as amostras foram aplicadas em seqüenciador automático *ABI prism 3100*.

Análises das seqüências e Desenho dos *Primers*

Os cromatogramas produzidos pelo seqüenciador foram analisados através do programa Gramene SSRIT - Simple Sequence Repeat Identification Tool (<http://www.gramene.org/>) para localização das repetições dentro das seqüências. Para evitar o desenho de *primers* redundantes, ou seja, iniciadores que amplificassem um mesmo loco, todas as seqüências obtidas foram alinhadas entre si. O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa de alinhamento múltiplo Clustal X. (THOMPSON et al., 1997).

Pares de *primers* complementares às seqüências flanqueando as repetições foram desenvolvidos utilizando o programa *PRIMER 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Para o desenho dos *primers*, alguns critérios foram adotados, como a escolha de primers com T_m entre 45 e 65 °C, com o máximo de 3°C de diferença na T_m dos dois primers, não conter bases redundantes, conteúdo de CG acima de 35% e consistindo de seqüência de 18 a 24 nucleotídeo, ser mais estável na extremidade 5', contendo dois nucleotídeos G/C e menos estável na 3', estar a uma distância entre 10 a 60 pb dos microssatélites (INNIS; GELFAND, 1990).

Os primers foram desenhados de forma que o produto de amplificação tenha no máximo 250pb e mínimo de 100pb, visando facilitar a detecção do polimorfismo. O programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) foi utilizado para a avaliação de sua qualidade, formação de dímero, cross dímero e alças. Apenas os pares com nota 100.0, ou muito próximas, foram selecionados do NetPrimer para a síntese.

As seqüências dos locos polimórficos foram anotadas e submetidas ao GenBank, com o auxílio da ferramenta BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>).

Amplificações iniciais, visualização dos Produtos de PCR e interpretação do Gel

Para cada par de primers desenhados, foram realizadas séries de amplificações visando alcançar as melhores condições para amplificação dos locos. Para as amplificações foi utilizada a enzima “Taq DNA polymerase” (Invitrogen) e as condições iniciais de amplificação foram seguidas conforme especificações do fabricante e, a partir delas, padronizadas para cada loco,

variando a temperatura de hibridização e as concentrações de MgCl₂, DNA molde, dNTP e enzima. Todas as reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 13 µL.

Cada par de *primers*, ou seja, cada loco, foi testado utilizando-se quatro amostras de DNA extraídas de diferentes indivíduos de *P. trigonatus*. Uma amostra do DNA plasmidial do clone contendo o alelo seqüenciado do loco a ser testado, também foi utilizada nas amplificações como controle positivo. Um controle negativo com todos os reagentes, mas sem DNA molde, foi utilizado para garantir que as reações estavam livres de contaminação.

Após a reação de PCR, a visualização dos produtos de amplificação dos locos de microssatélites foi realizada em gel de agarose 1,5% , submetido a uma condição de corrida de 100 Volts por aproximadamente 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídeo e analisado sob luz Ultra-Violeta. O marcador de peso molecular φX174/Hae III fragments (invitrogen) foi utilizado para verificar se de fato houve amplificação dos fragmentos esperados. Os locos que apresentaram uma boa amplificação foi genotipado no seqüenciador automático *ABI prism 3100*.

Amplificações

Uma vez determinadas as melhores condições para reação de amplificação de cada loco, amostras extraídas de 23 indivíduos e *P. trigonatus* foram utilizadas para acessar o conteúdo de informação dos locos.

As amplificações via PCR dos locos de microssatélites foram realizadas em reações com um volume final de 13 µL contendo 50 a 100ng de DNA genômico, 10mM tris-HCl ph 8.0, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mg/mL de BSA, 20 µM de cada dNTP, 0,6 ηM de cada primer e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (invitrogen). As amplificações foram conduzidas empregando-se um passo inicial de 3 minutos a 96 °C, seguido por ciclos, cada um consistindo de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a temperatura de hibridização do *primer* específica para cada loco (Tabela 4.1) e 1 minuto a 72 °C. Estes ciclos foram seguidos por um passo extensão final a 72 °C durante 20 minutos.

Genotipagem em Seqüenciador automático ABI 3100

A automatização do processo de genotipagem, através da utilização de seqüenciadores possibilitou uma maior agilidade e precisão na determinação dos diferentes alelos de microssatélites. Neste processo, para identificar o tamanho do fragmento o primer direto foi

marcado com um fluorocromo específico (FAM e HEX) para que assim, as novas fitas sintetizadas possam acoplar uma molécula fluorescente. No seqüenciador automático, uma amostra deste fragmento de DNA contendo moléculas fluorescentes FAM e HEX foram aplicadas no gel de sequenciamento que emite um feixe de laser e excita os fluorocromos. As ondas emitidas são registradas e as informações transferidas para um programa no computador.

Antes de iniciar a genotipagem é necessário preparar as amostras de DNA que serão sequenciadas. As amostras foram previamente preparadas da seguinte forma: 2 µl do produto de PCR foram diluídos em aproximadamente 12 µl de água milliQ (caso o produto de amplificação estivesse fraco, a amostra era diluída em um volume de 6 µl). Posteriormente, 1 µl da diluição com marcação FAM e 1 µl com marcação HEX foram misturadas em 8 µl de tampão de corrida (885 µl de formamida HI-DI e 15 µl de Rox), utilizando-se o Kit Rox™ Size Standard (Applied Biosystems). Em seguida, as amostras foram mantidas em termociclador por 5 minutos a 95°C para a denaturação. Após este tempo é importante fazer com que a temperatura decaia lentamente para que haja tempo suficiente das amostras serem retiradas e colocadas imediatamente no gelo sem que renaturem.

Análise dos fragmentos obtidos

O programa GeneScan 2.1(Applied Biosystems) capta a imagem do gel e configura o padrão do Rox a partir de informações que são fornecidas para cada *primer*. Em seguida, para que possa ser obtido o tamanho do fragmento de interesse, foi alinhado as bandas geradas pelo Rox, que é o marcador de tamanho molecular, com a banda obtida no gel. Dando continuidade a esta análise, o programa Genotyper 2.5.2 (Applied Biosystems) compara as bandas do Rox com os fragmentos no gel e gera o eletroferograma, que são gráficos que informam sobre o tamanho (em pares de base) dos fragmentos obtidos e sobre a qualidade de definição da banda e, portanto, sobre sua confiabilidade. Valores de picos acima de 1000 geralmente são os mais confiáveis, entretanto, valores menores foram aceitos, dependendo do tipo de *primer* que estava sendo utilizado e de testes preliminares que confirmam a reprodutibilidade do padrão obtido.

Análise dos dados microssatélites

Para cada loco foram estimados o tamanho médio do produto de PCR, a heterozigosidade observada e a esperada. As frequências alélicas e os testes de aderência às proporções esperadas de Hardy-Weinberg, usando o método da cadeia de Markov ($P < 0,05$) para cada loco com alelos

múltiplos (GUO; THOMPSON, 1992), foram obtidos através do programa computacional GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Os parâmetros da cadeia de Markov foram: número de desmemorização (1000), número de grupos (100) e número das iterações por grupo (1000).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado usando a fórmula, $PIC = 1 - \sum_{i=1}^j P_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^j \sum_{j=1}^{i-1} P_i^2 P_j^2$ onde os P_i e P_j são as frequências do i -ésimo e do j -ésimo alelo em um loco com l alelos da população, respectivamente (BOTSTEIN et al., 1980).

A heterozigosidade observada (Het_{obs}) foi calculada com base na fórmula $Het_{obs} = \left(\sum_{i=1}^N Z_j \right) / N$, onde Z_j é a contagem de animais heterozigóticos no loco j , e N é o número total de animais. A heterozigosidade esperada (Het_{esp}) não viesada de Nei, assumindo-se as proporções esperadas de Hardy-Weinberg, foram obtidas usando a fórmula $Het_{esp} = \frac{2N}{2N-1} \left(1 - \sum_{j=1}^l P_j^2 \right)$, onde P_j é a frequência do j -ésimo alelo do i -ésimo loco com l alelos na população e N é o número total de animais (NEI, 1987).

O PIC e as heterozigosidades foram estimados para cada loco usando-se o programa computacional CERVUS (MARSHALL et al., 1998; SLATE; MARSHALL; PEMBERTON, 2000; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) no modo de análise de frequência alélica com correção de Bonferroni para múltiplos testes. Os resultados de PIC e heterozigosidades foram apresentados com base na média aritmética para todos os locos.

Amplificação heteróloga

Os *primers* polimórficos desenvolvidos para *P. trigonatus* foram testados nas demais espécies de crocodilianos brasileiros para tentar amplificar possíveis locos homólogos nestas espécies. Três indivíduos de cada espécie de, *Caiman latirostris*, *Caiman crocodilus*, *Caiman yacare*, *Melanosuchus niger* e *Paleosuchus palpebrosus* foram utilizados nos testes. Para as amplificações via PCR foram utilizadas as condições anteriormente padronizadas para cada loco, a exceção da temperatura de hibridização dos *primers*. Seis diferentes temperaturas foram testadas: 50, 52, 54, 56, 58, 59 °C.

5.2.2 Resultados e Discussão

Digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *RsaI*

Cerca de 10µg de DNA foi digerido com 60U da enzima *RsaI*. Esta enzima foi utilizada por apresentar um corte freqüente, resultando em fragmentos de tamanhos adequados para a clonagem e seqüenciamento. O resultado, avaliado em eletroforese, indicou um rastro de DNA digerido entre 500 e 2.000 pb, tamanhos de fragmentos ideais para a construção da biblioteca (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Digestão do DNA genômico. O número 1 representa o marcador 1Kb DNA ladder, e o número 2, o DNA digerido

Ligação dos adaptadores e pré-amplificação

Adaptadores foram ligados aos fragmentos de DNA digeridos para garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem uma terminação comum e conhecida. A eficiência da ligação dos adaptadores foi testada por uma pré-amplificação, realizada tendo os próprios adaptadores como *primers*. Os rastros observados indicaram o sucesso da inclusão dos adaptadores nas extremidades dos fragmentos digeridos (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Gel da pré-amplificação. As quatro bandas (1,2,3,4) representam a mesma ligação feita em quatro alíquotas para garantir uma quantidade suficiente e obter um estoque caso fosse necessária uma reutilização posterior, Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes

Enriquecimento para microssatélites

O DNA digerido com adaptadores nas extremidades foi então hibridizado contra sondas de microssatélites biotinoladas (Biotina- $\text{IIII}(\text{CT})_8$; Biotina- $\text{IIII}(\text{GT})_8$), os microssatélites mais comuns. Apenas aqueles fragmentos que apresentaram microssatélites em suas seqüências foram capturados pelas *beads* magnéticas. Após sucessivas lavagens, os fragmentos enriquecidos com microssatélites foram eluídos por duas vezes em água Milli-Q e amplificados por PCR, para comprovar a recuperação do material após as lavagens e também para permitir a clonagem. Os eluatos de todas as quatro lavagens foram mantidos em tubos *ependorfs* separados e identificados (L1, L2, L3 e L4), para que fosse possível acompanhar o processo de eluição da coluna. Alíquotas de todos os eluatos foram utilizadas para as PCRs (Figura 5.4). A eletroforese de uma alíquota de cada material amplificado revelou o sucesso das lavagens e quantidade suficiente de material amplificado para a clonagem.

Figura 5.4 – Gel das sucessivas lavagens (L1, L2, L3, L4) e DNA eluído (E1, E2), Padrão de peso molecular ØX174 RFDNA/*Hae* III Fragmentes

Clonagem, mini-preparação e sequenciamento

A transformação resultou em cerca de 1×10^7 clones e um total de 192 deles (2 placas de 96 poços) foram aleatoriamente selecionados para serem sequenciados. A mini-preparação destes clones foi verificada em eletroforese, para permitir determinar a presença de insertos nos clones, por comparação com a eletroforese simultânea do plasmídeo vazio como controle de peso e tamanho, e também a quantidade de material obtido. O gel permitiu determinar a eficiência da transformação, com 48,95% dos clones contendo insertos. A metodologia de enriquecimento utilizada foi de extrema importância, pois os métodos tradicionais de isolamento de microssatélites (a partir de bibliotecas não enriquecidas) mostram uma baixa eficiência e exigem uma maior quantidade de trabalho, especialmente em genomas com uma baixa frequência de microssatélites. A etapa de enriquecimento vem sendo cada vez mais empregada tendo em vista o aumento da rapidez e eficiência para o isolamento de microssatélites.

Os clones positivos para insertos foram sequenciados a partir da extremidade 5' dos insertos pelo *primer* T7 ou SP6.

Análise das Sequências, Desenvolvimento e utilização dos *primers*

As seqüências obtidas foram analisadas no programa Gramene SSRIT - Simple Sequence Repeat Identification Tool (<http://www.gramene.org/>) para localização das regiões microssatélites. Esta análise permitiu a seleção de 20 seqüências para construção dos *primers*. Para evitar o desenho de *primers* redundantes, todas as seqüências obtidas foram alinhadas entre

si. O alinhamento entre as 20 sequências de microssatélites identificadas mostrou que 5 locos descritos eram complementares e/ou sobrepostos. Sendo assim restaram 15 locos adequados para a finalidade proposta. A região contendo a sequência única foi utilizada para a construção dos *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) para amplificação de cada loco em diferentes indivíduos. As sequências dos primers desenvolvidos e as informações relacionadas estão indicadas na Tabela 5.1.

Durante a padronização, mesmo após várias tentativas, as amplificações dos locos *Ptri01*, *Ptri11*, *Ptri13*, não produziram nenhum produto. Os locos *Ptri03*, *Ptri14*, *Ptri15* apresentaram resultados ambíguos, sendo detectados produtos de amplificação inespecíficas ou não reprodutíveis, ou seja, o padrão de bandas apresentado não se repetia após alterações sutis nas condições de amplificação. Para não gerar resultados duvidosos na caracterização do polimorfismo, estes locos não foram utilizados nas etapas posteriores.

Caracterização do Polimorfismo dos locos de microssatélites.

Uma vez determinada as melhores condições para a reação de amplificação de cada loco, amostras de DNA extraídas de 23 indivíduos de *P. trigonatus* foram utilizadas para acessar o conteúdo de informação de cada um dos nove locos selecionados.

Tabela 5.1 - Sequências dos *primers* desenvolvidos, temperatura de hibridização dos *primers* (T_h) e tamanho esperado dos produtos de PCR (Tam_e), baseado no tamanho do alelo clonado e sequenciado

Loco	Sequência	Motivo da Repetição	(Tam_e)	T_h (°C)
<i>Ptri02</i>	D:ATAAGGGGCAGAAGGAGCA R:GCAAACCTCTCTCAATCCA	9(TC)	193	56 °C
<i>Ptri04</i>	D:GAAAACAGGGCTTCAAATAC R:TAATCAGCAGCAAACCTCCTC	14(AC)	205	56 °C
<i>Ptri05</i>	D:CCCAACGAGTCTTGTCTGTCT R:TGCCCAGAGGTTAAAGTGAGA	5(TCTA)	218	59 °C
<i>Ptri06</i>	D:AACAATTTCCCACATTTACA R:TTCAGTATCACTCAAAGGAG	17(AG)	203	54 °C
<i>Ptri07</i>	D:CCCTGTGATAAGTCAGGTGGA R:TGAATGGGGAGAATTAAAAAGC	5(TATC) 12(AC)	207	54 °C
<i>Ptri08</i>	D:ATTCGCCCTTCTCTTGCTT R:CCGCACCTGTTTGTATGTGT	29(CA)	165	56 °C
<i>Ptri09</i>	D: TTGCTCTTCCTCTGCTTTCC R: TTCGCCCTTCTCTTGCTTAC	14(TG)	240	57 °C
<i>Ptri10</i>	D: CCCATTCCCAATCCACTACTT R: CCGCACAGTTTCTCCTCAGT	16(TG)	209	56 °C
<i>Ptri12</i>	D:TGACTTTACGGATGCTTTG R:TCACTGGCTCTCCCCTGT	8(TG)	183	53 °C

Os nove pares de primers apresentaram uma boa amplificação e genotipagem no ABI 3100. O marcador *Ptri09* apresentou apenas um alelo em todos os indivíduos. Este loco foi considerado monomórfico e não foi utilizado na análise subsequente. Para cada loco foram estimados o conteúdo de polimorfismo informativo (PIC), tamanho médio dos produtos de PCR, a heterozigotidade observada e a esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg e o número médio de alelos. Estes dados estão sumarizados na Tabela 5.2. O PIC é uma medida baseada na quantidade de heterozigotos de um marcador em uma população (BOTSTEIN et al., 1980). O PIC variou de 0,424 (*Ptri6*) a 0,814 (*Ptri11*) na média por marcador. A média geral foi 0.669, demonstrando o alto nível de polimorfismo obtido com estes marcadores.

O número de alelos variou de cinco a onze, com uma média de 7,75 alelos por loco. A heterozigotidade observada (H_o), variou de 0,261 a 0,783 e foi significativamente menor que a heterozigotidade esperada (H_e), que variou de 0,466 a 0,851 nos oito locos analisados, indicando um excesso de homozigotos.

Dentre os oito locos, quatro apresentaram valores P nos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg menores que 0,05, rejeitando a hipótese nula de união aleatória dos gametas, ou seja, estes seis locos mostraram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os fatores que podem causar a detecção de um excesso de homozigotos podem ser: o loco pode estar sendo selecionado; a população pode estar sob efeito de endocruzamento; a presença de sub-estruturação na população pode estar causando o efeito de Wahlund e/ou a presença de alelo nulos.

Tabela 5.2 - Caracterização genética dos oito locos microssatélites polimórficos isolados em *Paleosuchus trigonatus*.

Loco	N _a	PIC	Tamanho do Alelo	H _o	H _e	P-valor
<i>Ptri2</i>	7	0.508	161-191	0.522	0.594	0.23137
<i>Ptri4</i>	5	0.641	201-215	0.348	0.709	0.00000*
<i>Ptri5</i>	5	0.634	214-222	0.652	0.690	0.55129
<i>Ptri6</i>	5	0.424	203-219	0.261	0.466	0.00632*
<i>Ptri7</i>	10	0.748	193-219	0.609	0.787	0.07973
<i>Ptri8</i>	9	0.804	161-195	0.609	0.843	0.00000*
<i>Ptri10</i>	11	0.783	183-211	0.783	0.825	0.10460
<i>Ptri11</i>	10	0.814	175-203	0.652	0.851	0.00000*

N_a = Número de alelos;

H_o = Heterozigotidade observada; H_e = Heterozigotidade esperada

* = Desvio significativo ($P < 0,05$) do equilíbrio Hardy-Weinberg

Os novos *primers* polimórficos desenvolvidos para *P. trigonatus* também foram testados nas demais espécies de crocodilianos brasileiros. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.3. Este teste não teve o objetivo de avaliar o potencial desses locos na análise populacional das demais espécies, mas apenas uma tentativa de amplificação destes locos. Mesmo apresentando limitações, a utilização de *primers* heterólogos, vem fornecendo resultados satisfatórios para vários estudos.

Tabela 5.3 - Teste de amplificação em outras espécies de crocodilianos brasileiros utilizando *primers* desenvolvidos para *P. trigonatus*. Seis diferentes temperaturas de hibridização dos *primers* foram testadas (50, 52, 54, 56, 58 e 59 °C); a melhor temperatura está indicada para cada espécie/loco

Espécies	Loco							
	<i>Ptri02</i>	<i>Ptri04</i>	<i>Ptri05</i>	<i>Ptri06</i>	<i>Ptri07</i>	<i>Ptri08</i>	<i>Ptri10</i>	<i>Ptri12</i>
<i>Paleosuchus trigonatus</i>	+	±	-	+	+	-	+	±
	56°C	54°C		56°C	54°C		56°C	52°C
<i>Caiman latirostris</i>	+	-	-	±	+	-	±	-
	56°C			54°C	52°C		56°C	
<i>Caiman yacare</i>	+	-	-	±	+	-	±	-
	56°C			54°C	52°C		56°C	
<i>Caiman crocodilus</i>	+	-	-	±	+	-	±	-
	56°C			54°C	52°C		56°C	
<i>Melanosuchus niger</i>	+	-	-	+	+	-	±	-
	56°C			56°C	52°C		56°C	

+, Amplificação de produto de PCR dentro do intervalo esperado (baseado nos alelos de *P. trigonatus*)

±, Fraca amplificação de produto de PCR dentro do intervalo esperado

-, ausência de produtos dentro do intervalo esperado ou amplificação com múltiplas bandas

Os locos que foram amplificados nas outras espécies poderão ser utilizados futuramente em estudos populacionais após o sequenciamento dos alelos e caracterização do polimorfismo destes locos nestas espécies, poupando a tarefa trabalhosa e dispendiosa que envolve a clonagem, detecção dos microsatélites em uma biblioteca genômica e posterior sequenciamento.

5.3 Conclusões

A metodologia utilizada mostrou-se eficiente para isolar oito marcadores microsatélites polimórficos a partir de uma biblioteca enriquecida e poderá ser aplicada em outras espécies. Os níveis de polimorfismo detectados nestes oito locos indicam que eles podem ser utilizados para

elucidar aspectos de estruturação, fluxo gênico, análise de paternidade em *Paleosuchus trigonatus*.

Referências

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

GLENN, T. C.; DESSAUER, H. C.; BRAUN, M. J. Characterization of microsatellite DNA loci in American alligators. **Copeia**, Washington, v. 3, p. 591-601, 1998.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Oxford, v. 48, p. 361-372, 1992.

HUTTON, J.M.; LOVERIDGE, J.P.; BLAKE, D.K. Capture methods for the Nile crocodile in Zimbabwe. In: WEBB, G.J.W.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 211-216.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. In: INNIS; GELFAND; SNINSKY; WHITE. **PCR Protocols**. (Ed.). New York: Academic Press, 1990. p. 3-12.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1006, 2007.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 639-655, 1998.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Cary, v. 86, p. 248-249, 1995.

SLATE, J.; MARSHALL, T.C.; PEMBERTON, J.M. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 801-808, 2000.

THOMPSON, J. D. T. J.; GIBSON, F.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, D. G. HIGGINS. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VERDADE, L.M. Manejo e conservação do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: VALLADARES-PÁDUA, C.B.; BODMER, R.E.; CULLEN, L.J.R. editors. **Manejo de vida silvestre para a conservação**. Mamirauá: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. p. 222-232.

WALSH, B. Crocodile capture methods used in the Northern territory of Australia. In: WEBB, G.J.W.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 249-252.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford , v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZUCOLOTO, R.B, VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. **Journal Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, Philadelphia, v.294, p.346-351, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - Sítios variáveis nos 1673pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo b e região controle das seis espécies de crocodilianos brasileiros. Foram variáveis 424 sítios, cujas posições estão indicadas na tabela

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas											
	111111111	111111111	111111111	222222222	222222222	222333333	333333333	333333333	333333333	444444444		
	122344444	555677888	900001112	222344457	778888899	111222334	444667778	899001122	234444455	666667899	023444555	
	247802356	457625478	325891470	367081780	470134693	039028470	679180690	517392815	763456845	034798103	595147036	
<i>P. palpebrosus</i> 1	ACCACCTCAC	CCCCACCCGC	GTAACAGCGA	CCCATAAGCT	ATCACAGCTA	CCAGCCATCA	CCCACCCGTT	TCCGGCCCCAC	CGGCTGATAT	ACTCATAGTC	CGCTACGGTC	
<i>P. palpebrosus</i> 2	G.....	A.....		A.....					G...		A..	
<i>P. palpebrosus</i> 3	G.....	A.....		A.....	T..				G.G.			
<i>P. palpebrosus</i> 4	G.....	A.....		A.....					G...		A..	
<i>P. trigonatus</i> 1	G.....	T...	A...G..AG	G...	.C..TG.TCG	G	...G...A..	..AA..TG.	.CAA...C.A	G..T.CG.C.	.A.CC....T	
<i>P. trigonatus</i> 2	G.....	T...	A...G..AG	G...	.C..TG.TCG	G	...G...A..	..AA..TG.	.CAA...C.A	G..T.CG.C.	.A.CC....T	
<i>P. trigonatus</i> 3	G.....	T...	A...G..AG	G...	.C..TG.TCG	G	...G...A..	..AA..TG.	.CAA...C.A	G..T.CGAC.	.A.CC....T	
<i>P. trigonatus</i> 4	G.....	T...	A...G..AG	G...	.C..TG.TCG	G	...G...A..	..AA..TG.	.CAA...C.A	G..T.CG.C.	.A.CC....T	
<i>C. crocodilus</i> 1	.A..TTG...	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	.A.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A...C.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. crocodilus</i> 2	.A..TTG...	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	CA.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A...C.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. crocodilus</i> 3	.A..TTG...	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	CA.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A...C.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. crocodilus</i> 4	.A..TTG..A	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	CA.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A..GC.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. yacare</i> 1	.A..TTG...	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	CA.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A..GC.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. yacare</i> 2	.A..TTG.TA	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	CA.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A..GC.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. yacare</i> 3	.A..TTG.TA	A.AACA.TA.	AC..T.A...	.TA.CC..AC	CCT...AT..	.G..T...G	T..A..A..	CA.AA...TT	ACAAC.TA.C	.A..GC.AC.	AA.CC.AAC.	
<i>C. latirostris</i> 1	.AT..TGT..	A.AAGA..AT	AC..T.ATA.	.TACCC...A	CC...A...	TT...G..G	T.....CC	CA.AATT.CT	ACAACACAG.	GA....AC.	AATCC.AAC.	
<i>C. latirostris</i> 2	.AT..TGT..	A.AAGA..AT	AC..T.ATA.	.TACCC.A..	CC...A...	T.....G	T.....C	CA.AATT.CT	ACAACACAG.	.A....AC.	AATCT.AAC.	
<i>C. latirostris</i> 3	.AT..TGT..	A.AAGA..AT	AC..T.ATA.	.TACCC.A..	CC...A...	TT..T.C..G	T.....T..C	CA.A.T..CT	ACAACACAG.	.AC..C.AC.	AATCC.AACG	
<i>C. latirostris</i> 4	.AT..TGT..	A.AAGA..AT	AC..T.ATA.	.TACCC....	CC...A...	T..T.G..G	T.....T..C	CA.A.T..CT	ACAACACAG.	.AC..C.AC.	AATCC.AAC.	
<i>C. latirostris</i> 5	.AT..TGT..	A.AAGA..AT	AC..T.ATA.	.TACCC....	CC...A...	T.....G..G	T.....CC	CA.AAT..CT	ACAACACAG.	GA....AC.	AATCC.AAC.	
<i>M. niger</i> 1	.GT..TG...	ATA.GA..AT	-CGGT.CT..	.TA.CC..A.	CC.G.....	...A.T.CT.	..A.TA.A..	CATAA...CT	GCAACATG.C	C..CT	A..C.TAAA.	
<i>M. niger</i> 2	.GT..TG...	ATA.GA..AT	A.GGT.CT..	.TA.CC..A.	CC.G.....	...A.T.CT.	..A.TA.A..	CATAA...CT	GCAACATG.C	C..CT	A..C.TAAA.	
<i>M. niger</i> 3	.GT..TG...	ATA.G...AT	A.GGT.CT..	.TA.CC..A.	CC.G.....	...A.T.CT.	..A.TA.A..	CATAA...CT	GCAACATG.C	C..CT	A..C.TAAA.	
<i>M. niger</i> 4	.GT..TG...	A.A.GA..AT	ACGGT.CT..	.TA.CC..A.	CC.G.....	...A.T.CT.	..A.TA.A..	CATAA...CT	GCAACATG.C	C..CT	A..C.TAAA.	

ANEXO A - Sítios variáveis nos 1673pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo b e região controle das seis espécies de crocodilianos brasileiros. Foram variáveis 424 sítios, cujas posições estão indicadas na tabela

(Continuação)

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas											
	4444444444	4555555555	5555555555	5666666666	6666666666	6666666667	7777777777	7777777777	7777777777	7778888888	8888888888	
	6667888999	9001123444	6667777889	9000111122	2333333444	4677888990	000112223	3334444455	5566677788	8990111223	3444566778	
	1581369036	9256719238	6780235176	7235134706	9012689023	8549019012	3480370291	4574578901	7923514546	9357036254	7037517032	
<i>P. palpebrosus</i> 1	CACCCG-AAT	GGAGACTCGT	TACCCAGCG	ATCAAGGGCC	CCTCCAAGCA	GCCCACTGCA	CAGCCCCATC	CCACCAACCC	GCCCACCAAC	CACCCATAAT	ATCCTAGCAA	
<i>P. palpebrosus</i> 2	-...	...A.....		...G.....			G..		T....			
<i>P. palpebrosus</i> 3	-...	..G...T..		...G.....			G..		T....			
<i>P. palpebrosus</i> 4	-...	...A.....		...G.....			G..		T....			
<i>P. trigonatus</i> 1	T...TA-G.C	TC...	CG....G...	...T...A.T	GA.T	..T...G...	..T.....C.	..T.T.G...	A...G.....	GC..C	AT..	
<i>P. trigonatus</i> 2	T...TA-G.C	TC...	CG....G...	...T...A.T	GA.T	..T...G...	..T.....C.	..T.T.G...	A...G.....	GC..C	AT..	
<i>P. trigonatus</i> 3	T...TA-G.C	TC...	CG....G...	...T...A.T	GA.T	..T...G...	..T.....C.	..T.T.G...	A...G.....	GC..C	AT..	
<i>P. trigonatus</i> 4	T...TA-G.C	TC...	CG....G...	...T...A.T	GA.T	..T...G...	..T.....C.	..T.T.G...	A...G.....	GC..C	AT..	
<i>C. crocodilus</i> 1	T..T.AG..C	AA.A...T..	C.TA...A.A	.C....AA.T	AGCTT.TCA	AT..CA..T	T...AAT.CT	.GC...G.TG	.AG.T.T.CT	AGTTA...C	C.TTCTAAC	
<i>C. crocodilus</i> 2	T..T.AG..C	AA.A...T..	C.TA...A.A	.C....AA.T	AGCTT.TCA	AT..CA..T	T...AAT.CT	.GC...G.T	.A..T.T.CT	AGTTA...C	C.TTCTAAC	
<i>C. crocodilus</i> 3	T..T.AG..C	AA.A...T..	C.TA...A.A	.C....AA.T	AGCTT.TCA	AT..CA..T	T...AAT.CT	.GC...G.T	.A..T.T.CT	AGTTA...C	C.TTCTAAC	
<i>C. crocodilus</i> 4	...T.AG.GC	AA.A...T..	C.TA...A.A	.C....AA.T	.GCTT.TCA	AT..CA..T	T...AAT.CT	.GC...G.T	.A..T.T.CT	AGTTA...C	C.TTCTAAC	
<i>C. yacare</i> 1	...T.AC.GC	AT.A...T..	C.TA...A.A	.C.G...AA.T	.GCTT.TCA	AT.TCA..T	T...AAT.CG	TGC.G.GTGG	.AGAT.TTCT	AGTTT...C	C.TTCTAAC	
<i>C. yacare</i> 2	...T.AG.GC	AT.A...T..	C.TA...A.A	.C....AA.T	.GCTT.TCA	AT.TCA..T	T...AAT.CG	TGC.G.GTGG	.AGAT.TTCT	AGTTT...C	C.TTCTAAC	
<i>C. yacare</i> 3	...T.AG.GC	AT.A...T..	C.TA...A.A	.C.G...AA.T	.GCTT.TCA	AT.TCA..T	T...AAT.CG	TGC.G.GTGG	.AGAT.TTCT	AGTTT...C	C.TTCTAAC	
<i>C. latirostris</i> 1	T..TTAC..C	AT.A.T.TA	C.TAT...AAA	..G.AAA..	.GCT.CTCA	..T..CA..T	T.AAAAT.C	..CT.....	A.....G.	A...T...T	T...C..GC	
<i>C. latirostris</i> 2	T..TTAC..C	AC.A.T.T.C	.G..T...AAA	..G.AAA..	GG.T.CTCA	..T..CA..T	T.AAAAT.C	..CT.....	A.....TG.	A...T...T	T...C..GC	
<i>C. latirostris</i> 3	TG.TTAC..C	AC.AGT.TAC	.G..A...AAA	GC...AAA..	AGCT.CTCA	..T..CA..T	T.AAAAT.C	..CT.....	T.....TG.	A...T...T	TC..C..GC	
<i>C. latirostris</i> 4	T..TTAG..C	AC.AGT.TA	.G..A...AAA	GC...AAA..	AGCT.CTCA	..T..CA..T	T.AAAAT.C	..CT.....	T.....G.	A...T...T	TC..C..GC	
<i>C. latirostris</i> 5	T..TTAG..C	AC.A.T.TA	.G..A...AAA	GC.G.AAA..	.GCT.CTCA	..T..CA..T	T.AAAAT.C	..CT.....	T.....G.	A...T...T	TC..C..GC	
<i>M. niger</i> 1	TTT..AG..C	ACCA..CTAC	CG...TGA.A	.C.G.AATA	.AC..CTCA	A...CACA.G	T..TAA.CC	..C.....	.TGAC...G	A...T...T	TC..C..GC	
<i>M. niger</i> 2	TTT..AG..C	ACCA..CTAC	CG...TGA.A	.C.G.AATA	.AC..CTCA	A...CACA.G	T..TAA.CC	..C.....	.TGAC...G	A..TT.CGCC	CC.TC.AGCG	
<i>M. niger</i> 3	TTT..AG..C	ACCA..CTAC	CG...TGA.A	.C.G.AATA	.AC..CTCA	A...CACA.G	T..TAA.CC	..C.....	.T..C...G	A..TT.CGCC	CC.TC.AGCG	
<i>M. niger</i> 4	TTT..AG..C	ACCA..CTAC	CG...TGA.A	.C.G.AATA	.AC..CTCA	A...CACA.G	T..TAA.CC	..C.....	.T..C...G	A..TT.CGCC	CC.TC.AGCG	

ANEXO A - Sítios variáveis nos 1673pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo b e região controle das seis espécies de crocodilianos brasileiros. Foram variáveis 424 sítios, cujas posições estão indicadas na tabela

(Continuação)

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas										
	8888999999	9999999999	9999999999	9999999999	0000000000	0000000000	0000000000	0111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	9999000011	1222233344	5556667778	8999990000	0122223444	4555556667	7777788888	9000111112	2233344444	4455666788	9999000011
	1347367036	8123548958	4574593565	6034792357	8103679168	9014692561	2347905789	8189016780	5835603457	8912016879	0589147037
<i>P. palpebrosus</i> 1	CCCCTCTTCG	GTGCCGAAGC	CGCTTCCCCG	CCCCGCCTTT	ATTGCCCTTA	TCCAGCACGC	TCACCTGTGC	CCACACGTCC	GCTACACTAC	TGC-ACT-CT	AAAAC--AA-
<i>P. palpebrosus</i> 2	A	A.			...A.....			A...		...T...A..	--..-
<i>P. palpebrosus</i> 3	A	A.			...A.....			A...		...T...A..	--..-
<i>P. palpebrosus</i> 4	A	A.			...A.....			A...		...T...A..	--..-
<i>P. trigonatus</i> 1	.T...T... .	AC..AA..AA	...CC.....	...T...C..	.CA....A.	C..G.....	.T.T..C...	T	A..G..T..T	CA.CG..C..	--..-
<i>P. trigonatus</i> 2	.T...T... .	AC..AA..AA	...CC.....	...T...C..	.CA....A.	C.....	.T.T..C...	A..T	A..G..T..T	CA.CG..C..	--..-
<i>P. trigonatus</i> 3	.T...T... .	AC..AA..AA	...CC.....	...T...C..	.CA....A.	C..G.....	.T.T..C...	T	A..G..T..T	CA.CG..C..	--..-
<i>P. trigonatus</i> 4	.T...T... .	AC..AA..AA	...CC.....	...T...C..	.CA....A.	C..G.....	.T.T..C...	T	A..G..T..T	CA.CG..C..	--..-
<i>C. crocodilus</i> 1	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A.A	.T.TAT.CCC	TCCAAAT.A.	.T.CAA..AA	CT..AT.AC.	.GCTG.AG..	ATC...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTCATGG
<i>C. crocodilus</i> 2	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A..	.T.TAT.CCC	TCCAA.T.A.	.T.TAA..AA	CT..AT.ACT	AGCTG.AG..	AT...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTTATGA
<i>C. crocodilus</i> 3	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A..	.T.TAT.CCC	TCCAA.T.A.	.T.TAA..AA	CT..AT.ACT	AGCTG.AG..	AT...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTTATGA
<i>C. crocodilus</i> 4	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A.A	.T.TAT.CCC	TCCAAAT.A.	.T.TAA..AA	CT..AT.AC.	.GCTG.AG..	ATC...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTCATGG
<i>C. yacare</i> 1	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A.A	.T.TAT.CCC	TCCAAAT.A.	.T.CAA..AA	CT..AT.ACT	AGCTG.AG..	ATC...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTTT.GA
<i>C. yacare</i> 2	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A.A	.T.TAT.CCC	TCCAAAT.A.	.T.CAA..AA	CT..AT.ACT	.CTG.AG..	ATC...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTTT.GA
<i>C. yacare</i> 3	T....CC.A	CCTT.ACCA	TCAC.A.A.A	.T.TAT.CCC	TCCAAAT.A.	.T.CAA..AA	CT..AT.ACT	A.CTG.AG..	ATC...ACCT	.TTT.TCATA	CCTCTTT.GA
<i>C. latirostris</i> 1	..T.C.C.TA	ACA..ACCAA	TA.C.ATAT.	TT..A.TCCC	CCCA...AA.	C..TAA.TAA	.TC.ATCAC.	.TCT..ACT.	AT..T.ACCT	.TTC.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>C. latirostris</i> 2	..T.C.C.TA	ACA..ACCAA	TA.C.ATAT.	TT..A.TCCC	CCCA...AA.	C..TAA.TAA	.TC.ATCAC.	.TCT..ACT.	AT..T.ACCT	.TTC.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>C. latirostris</i> 3	..T.C.C.TA	ACA..ACCAA	TA.C.ATAT.	TT..A.TCCC	CCCA...AA.	C..TAA.TAA	.TC.ATCAC.	.TCT..ACT.	AT..T.ACCT	.TTC.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>C. latirostris</i> 4	..T.C.C.TA	ACA..ACCAA	TA.C.ATAT.	TT..A.TCCC	CCCA...AA.	C..TAA.TAA	.TC.ATCAC.	.TCT..ACT.	AT..T.ACCT	.TTC.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>C. latirostris</i> 5	..T.C.C.TA	ACA..ACCAA	TA.C.ATAT.	TT..A.TCCC	CCCA...AA.	C..TAA.TAA	.TC.ATCAC.	.TCT..ACT.	AT..T.ACCT	.TTC.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>M. niger</i> 1	..T.C.C.TA	ACA..ACCAA	TA.C.ATAT.	TT..A.TCCC	CCCA...AA.	C..TAA.TAA	.TC.ATCAC.	.TCT..ACT.	AT..T.ACCT	.TTC.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>M. niger</i> 2	..TC.C..A	AA...A.C.A	...C.A.A.A	T.TT..TCCC	.CCA....AG	..TTAAGTAA	.T..A.CA..	TT.T.TCCT.	AT...CACCT	.TTT.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>M. niger</i> 3	..TC.C..A	AA...A.C.A	...C.A.A.A	T.TT..TCCC	.CCA....AG	..TTAAGTA.	.T..A.CA..	TT.T.TCCT.	AT...CACCT	.TTT.TCATA	CCTCTCT.GG
<i>M. niger</i> 4	..TC.C..A	AA...A.C.A	...C.A.A.A	T.TT..TCCC	.CCA....AG	..TTAAGTAA	.T..A.CA..	TT.T.TCCT.	AT...CACCT	.TTT.TCATA	CCTCTCT.GG

ANEXO A - Sítios variáveis nos 1673pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo b e região controle das seis espécies de crocodilianos brasileiros. Foram variáveis 424 sítios, cujas posições estão indicadas na tabela

											(Conclusão)
Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas										
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111]
	2222222222	2222222222	2333333333	3334444444	4444444444	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5556666666	6666]
	2233333444	5555668999	9001111355	5690001134	5667888999	1111222333	3344444444	5555556666	6880012233	3334]	
	5901467038	0679259123	6033467605	6070140613	6674679345	2346789124	6801345789	0257891345	6234510625	6784]	
<i>P. palpebrosus</i> 1	CGGGAATTTT	TAAAGAAAAC	AGCCACCAAC	ACTTATGTCT	TTCGTCCAAC	ACGACACGCG	TACCTCCCAA	ACGTTCCCCC	CTCTTGTTTT	TTA-	
<i>P. palpebrosus</i> 2										...-	
<i>P. palpebrosus</i> 3										...-	
<i>P. palpebrosus</i> 4										...-	
<i>P. trigonatus</i> 1									..T..C....	...-	
<i>P. trigonatus</i> 2									..T..C....	...-	
<i>P. trigonatus</i> 3									..T..C....	...-	
<i>P. trigonatus</i> 4									..T..C....	...-	
<i>C. crocodilus</i> 1	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.CGAA	AA-G	
<i>C. crocodilus</i> 2	ATAAC.CCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.CGAA	AA-C	
<i>C. crocodilus</i> 3	ATAAC.CCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.CGAA	AA-C	
<i>C. crocodilus</i> 4	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.CGAA	AA-C	
<i>C. yacare</i> 1	ATAAC.CCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.CCAA	AA-G	
<i>C. yacare</i> 2	ATAAC.CCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.GCAA	AA-C	
<i>C. yacare</i> 3	ATAAC.CCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC.AC.GCAA	AA-G	
<i>C. latirostris</i> 1	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC..C.AGG.	.ACG	
<i>C. latirostris</i> 2	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC..C.AGG.	.ACG	
<i>C. latirostris</i> 3	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC..C.GGG.	.ACG	
<i>C. latirostris</i> 4	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC..C.AGG.	.ACG	
<i>C. latirostris</i> 5	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GC..C.AGG.	.ACG	
<i>M. niger</i> 1	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GG..G.ACA.	..CG	
<i>M. niger</i> 2	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GG..G.ACA.	..CG	
<i>M. niger</i> 3	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GG..G.ACA.	..CG	
<i>M. niger</i> 4	ATAACGCCCC	AGCCAGGGCT	CCTTTTGGTT	TTCCCAACTC	CCAACAACCT	TAACGTTCTA	CCTAGTAATC	GGTCATTTTT	GG..G.ACA.	..CG	

ANEXO B – Matriz de distância a partir da sequência do DNA mitocondrial das seis espécies de crocodilianos brasileiros, em negritos esta a distância de *Caiman latirostris* em relação aos outros Caimans e a *Melanosuchus niger*

	AS1	AM1	PP3	PP2	PT1	PT1	PP4	PT2	PT3	PT4	CC2	CC3	CC4	CC1	CY1	CY2	CY3	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	MN1	MN2
MN3																								
AS1																								
AM1	0.179																							
PP3	0.227	0.218																						
PP2	0.226	0.219	0.010																					
PP1	0.229	0.220	0.014	0.006																				
PT1	0.230	0.223	0.061	0.066	0.069																			
PP4	0.226	0.219	0.010	0.000	0.006	0.066																		
PT2	0.230	0.223	0.062	0.066	0.069	0.003	0.066																	
PT3	0.230	0.223	0.062	0.067	0.070	0.001	0.067	0.004																
PT4	0.230	0.223	0.061	0.066	0.069	0.000	0.066	0.003	0.001															
CC2	0.232	0.218	0.180	0.177	0.181	0.189	0.177	0.189	0.189	0.189														
CC3	0.229	0.214	0.178	0.174	0.178	0.186	0.174	0.187	0.186	0.186	0.010													
CC4	0.229	0.214	0.178	0.174	0.178	0.186	0.174	0.187	0.186	0.186	0.010	0.000												
CC1	0.230	0.216	0.181	0.177	0.181	0.191	0.177	0.191	0.191	0.191	0.009	0.009	0.009											
CY1	0.236	0.219	0.186	0.183	0.186	0.196	0.183	0.196	0.196	0.196	0.019	0.019	0.019	0.019										
CY2	0.232	0.217	0.183	0.180	0.184	0.193	0.180	0.194	0.193	0.193	0.018	0.018	0.018	0.016	0.007									
CY3	0.234	0.218	0.185	0.182	0.186	0.195	0.182	0.196	0.195	0.195	0.019	0.018	0.018	0.017	0.006	0.002								
CL1	0.234	0.217	0.175	0.172	0.176	0.180	0.172	0.181	0.180	0.180	0.074	0.073	0.073	0.075	0.079	0.080	0.080							
CL2	0.231	0.212	0.174	0.171	0.174	0.180	0.171	0.180	0.180	0.180	0.076	0.075	0.075	0.077	0.081	0.082	0.082	0.012						
CL3	0.238	0.222	0.186	0.183	0.187	0.194	0.183	0.194	0.194	0.194	0.087	0.086	0.086	0.089	0.094	0.093	0.094	0.025	0.023					
CL4	0.228	0.214	0.175	0.172	0.176	0.183	0.172	0.183	0.183	0.183	0.076	0.074	0.074	0.077	0.085	0.083	0.084	0.015	0.016	0.013				
CL5	0.229	0.215	0.175	0.172	0.176	0.180	0.172	0.181	0.180	0.180	0.077	0.076	0.076	0.077	0.084	0.083	0.083	0.009	0.013	0.020	0.007			
MN1	0.231	0.207	0.176	0.173	0.177	0.183	0.173	0.184	0.185	0.183	0.089	0.089	0.089	0.090	0.093	0.092	0.092	0.055	0.054	0.062	0.052	0.051		
MN2	0.228	0.207	0.175	0.173	0.177	0.180	0.173	0.182	0.182	0.180	0.092	0.094	0.094	0.095	0.096	0.096	0.095	0.081	0.080	0.088	0.078	0.077	0.026	
MN3	0.224	0.205	0.173	0.171	0.175	0.178	0.171	0.180	0.180	0.178	0.094	0.094	0.094	0.095	0.099	0.099	0.099	0.082	0.080	0.089	0.078	0.077	0.029	0.003
MN4	0.226	0.207	0.174	0.172	0.176	0.180	0.172	0.181	0.181	0.180	0.092	0.092	0.092	0.093	0.097	0.097	0.096	0.079	0.078	0.087	0.076	0.075	0.028	0.003 0.004

ANEXO C - Sítios variáveis nos 625pb dos haplótipos do gene *C-mos* das seis espécies de crocodilianos brasileiros. Foram variáveis 15 sítios, cujas posições estão indicadas na tabela

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas	
	124	55566
	23367302	08902
	5612573390	03662
<i>M. niger</i> 1	AACGCCAGAA	AGGGG
<i>M. niger</i> 2		
<i>M. niger</i> 3	..T.....	
<i>C. latirostris</i> 1	..TT.....G	G..A.
<i>C. latirostris</i> 2	..TT.....G	G..A.
<i>C. latirostris</i> 3	..TT.....G	...A.
<i>C. crocodilus</i> 1	T.A.G	..A..
<i>C. crocodilus</i> 2	T...G	G.A..
<i>C. crocodilus</i> 3	T.A.G	..A..
<i>C. yacare</i> 1	...T.T...G	G.A..
<i>C. yacare</i> 2	...T.T...G	G.A..
<i>C. yacare</i> 3	...T.T...G	G.A..
<i>P. palpebrosus</i> 1	GGTTG.G.G.	CC...
<i>P. palpebrosus</i> 2	GGTTG.G.G.	CC...
<i>P. palpebrosus</i> 3	GGTTG.G.G.	CC...
<i>P. trigonatus</i> 1	GG..G.G.G.	CC..A
<i>P. trigonatus</i> 2	GG..G.G.G.	CC..A
<i>P. trigonatus</i> 3	GG..G.G.G.	CC..A

ANEXO D - Matriz de distância a partir da sequência do gene *C-mos* das seis espécies de crocodilianos brasileiros, em negritos esta a distância de *Caiman latirostris* em relação aos outros Caimans e a *Melanosuchus niger*.

	MN1	MN2	MN3	CL1	CL2	CL3	CC1	CC2	CC3	CY1	CY2	CY3	PP1	PP2	PP3	PT1	PT2	PT3
MN1																		
MN2	0.002																	
MN3	0.002	0.003																
CL1	0.006	0.008	0.005															
CL2	0.006	0.008	0.005	0.000														
CL3	0.005	0.006	0.003	0.002	0.002													
CC1	0.008	0.010	0.010	0.011	0.011	0.010												
CC2	0.008	0.010	0.010	0.008	0.008	0.010	0.003											
CC3	0.008	0.010	0.010	0.011	0.011	0.010	0.000	0.003										
CY1	0.010	0.011	0.011	0.006	0.006	0.008	0.005	0.002	0.005									
CY2	0.010	0.011	0.011	0.006	0.006	0.008	0.005	0.002	0.005	0.000								
CY3	0.010	0.011	0.011	0.006	0.006	0.008	0.005	0.002	0.005	0.000	0.000							
PP1	0.023	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.028	0.026	0.028	0.025	0.025	0.025						
PP2	0.023	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.028	0.026	0.028	0.025	0.025	0.025	0.000					
PP3	0.023	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.028	0.026	0.028	0.025	0.025	0.025	0.000	0.000				
PT1	0.021	0.020	0.023	0.026	0.026	0.026	0.026	0.025	0.026	0.028	0.028	0.028	0.005	0.005	0.005			
PT2	0.021	0.020	0.023	0.026	0.026	0.026	0.026	0.025	0.026	0.028	0.028	0.028	0.005	0.005	0.005	0.00		
PT3	0.021	0.020	0.023	0.026	0.026	0.026	0.026	0.025	0.026	0.028	0.028	0.028	0.005	0.005	0.005	0.00	0.00	
AS	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.037	0.037	0.037	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.04	0.04	0.04

ANEXO E - Frequência de alelos. n = número de indivíduos amostrados. (AL) Alagoas; (RS) Rio Grande do Sul; (IC) Ilha do Cardoso; (RN) Rio Grande do Norte; (PB) Paraíba; (POA) Porto de Areia; (PT) Pantanal; (CH) Charqueada; (DUF) Dura Flora; MS, Mato Grosso do Sul; CUB, Cubatão; CaT Cataveiro

Locus	AL n=25	RS n=17	IC n=9	RN n=5	PB n=12	POA n=9	PT n=20	CH n=12	DUF n=23	MS n=10	CUB n=25	CAT n=6
<i>Amiμ08</i>												
p: 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
p: 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000
p: 3	0.980	1.000	0.944	0.700	0.542	0.778	0.300	0.500	0.978	0.000	0.900	0.667
p: 4	0.020	0.000	0.056	0.300	0.458	0.222	0.700	0.500	0.022	0.000	0.000	0.333
<i>Amiμ11</i>												
p: 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 2	0.000	0.000	0.500	0.100	0.042	0.000	0.025	0.000	0.000	0.100	0.480	0.000
p: 3	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.260	0.000
p: 4	0.040	0.500	0.000	0.000	0.000	0.222	0.000	0.125	0.109	0.200	0.040	0.000
p: 5	0.340	0.000	0.000	0.100	0.000	0.278	0.525	0.000	0.326	0.050	0.020	0.500
p: 6	0.080	0.000	0.056	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.100	0.000
p: 7	0.060	0.500	0.222	0.500	0.083	0.500	0.350	0.375	0.174	0.050	0.080	0.000
p: 8	0.440	0.000	0.222	0.100	0.792	0.000	0.100	0.458	0.370	0.000	0.000	0.500
p: 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000
p: 10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
<i>Amiμ13</i>												
p: 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083
p: 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
p: 4	0.000	0.000	0.056	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.080	0.000
p: 5	0.000	0.000	0.056	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
p: 6	0.020	0.147	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.020	0.000
p: 7	0.040	0.088	0.222	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.500	0.000
p: 8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.475	0.000	0.000	0.050	0.280	0.083
p: 9	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
p: 10	0.000	0.118	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.083
p: 11	0.000	0.294	0.000	0.000	0.000	0.000	0.225	0.000	0.000	0.100	0.020	0.167
p: 12	0.060	0.324	0.056	0.100	0.125	0.000	0.050	0.083	0.043	0.050	0.000	0.000
p: 13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	0.050	0.250	0.065	0.200	0.000	0.167
p: 14	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000	0.125	0.109	0.000	0.000	0.000
p: 15	0.800	0.029	0.500	0.200	0.417	0.000	0.000	0.042	0.674	0.050	0.040	0.250
p: 16	0.060	0.000	0.056	0.100	0.083	0.000	0.000	0.083	0.065	0.000	0.000	0.167
p: 17	0.020	0.000	0.000	0.100	0.083	0.778	0.175	0.250	0.043	0.400	0.000	0.000
p: 18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
<i>Amiμ20</i>												
p: 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000
p: 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.000
p: 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.444	0.053	0.000	0.182	0.100	0.000	0.083
p: 7	0.020	0.529	0.000	0.300	0.083	0.167	0.211	0.364	0.500	0.450	0.120	0.500
p: 8	0.000	0.000	0.833	0.200	0.583	0.000	0.000	0.091	0.068	0.000	0.700	0.000
p: 9	0.560	0.088	0.000	0.300	0.250	0.111	0.000	0.045	0.023	0.000	0.040	0.000
p: 10	0.060	0.000	0.000	0.200	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083
p: 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	0.237	0.045	0.000	0.150	0.000	0.083
p: 13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
p: 14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.136	0.100	0.000	0.083
p: 15	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.050	0.000	0.083
p: 16	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000	0.368	0.273	0.000	0.100	0.000	0.000
p: 17	0.320	0.324	0.167	0.000	0.000	0.056	0.053	0.091	0.000	0.000	0.080	0.000
p: 18	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083
p: 19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000

ANEXO E - Frequência de alelos. n = número de indivíduos amostrados. (AL) Alagoas; (RS) Rio Grande do Sul; (IC) Ilha do Cardoso; (RN) Rio Grande do Norte; (PB) Paraíba; (POA) Porto de Areia; (PT) Pantanal; (CH) Charqueada; (DUF) Dura Flora; (MS) Mato Grosso do Sul; CUB, Cubatão; CaT Cativairo

(continuação)												
Locus	AL n=25	RS n=17	IC n=9	RN n=5	PB n=12	POA n=9	PT n=20	CHA n=12	DUF n=23	MS n=10	CUB n=25	CAT n=6
<i>Clau06</i>												
p: 1	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 2	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.109	0.100	0.000	0.000
p: 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.278	0.125	0.375	0.370	0.050	0.000	0.000
p: 5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.050	0.000	0.000
p: 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000
p: 7	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.389	0.400	0.375	0.478	0.450	0.000	0.250
p: 8	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.450	0.167	0.000	0.250	0.000	0.000
p: 9	0.440	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.025	0.000	0.000	0.050	0.000	0.583
p: 10	0.020	0.000	0.444	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
p: 11	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 12	0.020	0.176	0.000	0.200	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 13	0.040	0.735	0.556	0.800	0.958	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.860	0.000
p: 14	0.000	0.088	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.140	0.000
p: 16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167
Locus	AL n=25	RS n=17	IC n=9	RN n=5	PB n=12	POA n=9	PT n=20	CHA n=12	DUF n=23	MS n=10	CUB n=25	CAT n=6
<i>Clau07</i>												
p: 1	0.160	0.000	0.111	0.400	0.458	0.056	0.050	0.458	0.217	0.450	0.000	0.250
p: 2	0.480	0.559	0.889	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.920	0.000
p: 3	0.360	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.080	0.000
p: 5	0.000	0.176	0.000	0.600	0.542	0.111	0.525	0.167	0.000	0.000	0.000	0.083
p: 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000
p: 7	0.000	0.265	0.000	0.000	0.000	0.333	0.000	0.292	0.630	0.550	0.000	0.583
p: 8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.022	0.000	0.000	0.000
p: 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.278	0.375	0.042	0.065	0.000	0.000	0.000
p: 12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000
p: 13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083
<i>Clau08</i>												
p: 1	0.180	0.529	0.000	0.700	0.750	0.000	0.325	0.292	0.000	0.050	0.100	0.083
p: 2	0.560	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
p: 3	0.000	0.000	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.360	0.000
p: 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.250	0.000	0.000	0.522	0.000	0.020	0.083
p: 5	0.040	0.206	0.278	0.200	0.042	0.000	0.000	0.042	0.000	0.500	0.520	0.250
p: 6	0.180	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 7	0.000	0.029	0.000	0.100	0.000	0.000	0.025	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 8	0.000	0.029	0.056	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.022	0.150	0.000	0.083
p: 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.042	0.174	0.000	0.000	0.250
p: 10	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.025	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000
p: 12	0.000	0.000	0.444	0.000	0.000	0.500	0.300	0.250	0.239	0.050	0.000	0.083
p: 13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.175	0.000	0.000	0.150	0.000	0.083
p: 14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.250	0.000	0.050	0.000	0.000
p: 15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083
p: 16	0.000	0.206	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000