

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DOS
CROCODILIANOS JACARÉ-AÇÚ (*Melanosuchus niger*) E JACARÉ-TINGA
(*Caiman crocodilus*) DA AMAZÔNIA

WILLIAM RANGEL VASCONCELOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – Amazonas
2005

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DOS
CROCODILIANOS JACARÉ-AÇÚ (*Melanosuchus niger*) E JACARÉ-TINGA
(*Caiman crocodylus*) DA AMAZÔNIA

WILLIAM RANGEL VASCONCELOS

Orientadora : Dra. Izeni Pires Farias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – Amazonas
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Vasconcelos, William Rangel

Diversidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) da Amazônia. -- 2005.

xviii, 78 f. : il.

Dissertação (mestrado)—INPA/UFAM, 2005.

1. Amazônia 2. *Melanosuchus niger* 3. *Caiman crocodilus* 4. Filogeografia 5. Citocromo *b* 6. Frequência haplotípica 7. Genética da conservação.

CDD 19. ed. 597.980415

Sinopse:

Dezoito populações de crocodilianos da Amazônia (nove de *Melanosuchus niger* e nove de *Caiman crocodilus*) foram analisadas para se identificar padrões espaciais e temporais da variabilidade genética. Tais análises incluíram frequência gênica e nucleotídica, AMOVA, *Fst*, testes de neutralidade seletiva de mutações, teste de Mantel e análise do agrupamento de clados (NCPA). Todos estes testes foram feitos a partir da variação na frequência dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo *b* e revelaram padrões semelhantes nas duas espécies. Observou-se elevada diversidade haplotípica, baixa diversidade nucleotídica, crescimento populacional e fragmentação entre as populações de drenagens fora da bacia Amazônica em relação às populações desta bacia. Isolamento por distância foi detectado nas populações de *M. niger*. Houve diferenciação genética entre algumas populações de ambas as espécies, quantificada pelo índice de *pairwise Fst*. Estes resultados podem fornecer subsídios para um manejo e/ou conservação mais eficaz.

Palavras-chave: Variabilidade genética, crocodilianos, *Melanosuchus niger*, *Caiman crocodilus*, DNAm, citocromo *b*, fragmentação populacional.

Dedico esta dissertação a minha família: meus pais Jóia Vasconcelos e Isaias Silva, meus irmãos Keila Elida e Wendell Mardson, aos colegas do laboratório LEGAL e da Vila Jaraqui.



"Distraídos venceremos"

Paulo Leminski

"Que ironia que o DNA também fosse o próprio instrumento que nos reconecta aos mistérios de nosso profundo passado e aumenta, em vez de diminuir, nosso senso de nós mesmos. Não "apenas substância química", afinal de contas, mas o mais precioso dos dons".

Bryan Sykes em "As Sete Filhas de Eva"

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, gostaria de agradecer sinceramente à Dra. Izeni Pires Farias, principalmente pelo seu exemplo de perseverança, trabalho e competência, no qual tentei me espelhar nestes dois últimos anos. Aproveito também para deixar meu muito obrigado à FAPEAM, pela bolsa de estudos. Ao INPA e à UFAM, instituições que tornaram possível este passo importante na carreira que escolhi (ou que me escolheu).

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores que me iniciaram na carreira científica, desde o jardim de infância (onde tudo começou) até o mestrado (onde tudo está começando). Especialmente:

À Norma Lindoso Viana que me convenceu de que Biologia seria muito melhor para mim que Arquitetura (coisa impossível de comprovar);

À Dra. Wilsea Maria Batista Figueiredo, pelo seu exemplo de ética e constante paciência quando me orientou nos meus primeiros passos na Filogeografia;

Ao Dr. Tomas Hrbek pela paciência nos momentos de dúvidas e pelo seu exemplo como pesquisador;

Ao Dr. Ronis da Silveira pela sua inestimável ajuda no trabalho de campo. Augusto Ruffeil (Guto), Boris Marione, Eduardo Matheus von Muhlen (Duca), Renato da Silveira (o Selvagem) e Pedro Alexandre Sampaio (Capiroto), pelo mesmo motivo;

Ao Dr. George Rebelo (Jaca) por sua ajuda de campo, sua contribuição literária e pelos bate-papos de boteco. Adriana Terra por sua ajuda no trabalho de campo;

Ao Msc. Marcelo Crossa do IPAM de Santarém pela disposição em sempre ajudar, contribuindo assim para o entendimento de questões ambientais na Amazônia;

À sociedade Civil Mamirauá pelo apoio logístico no início do projeto;

À The Nature Conservancy do Brasil, pelo apoio financeiro e principalmente por terem acreditado no meu trabalho;

Aos alunos que me senti responsável por seus primeiros passos na carreira científica, Herson Lima do Nascimento, Mário da Silva Nunes, Adam Alencar Leão e Edvaldo Pereira Mota;

Aos colegas de laboratório, por suas discussões, ajuda e compreensão no trato fino da convivência, que é uma arte, Wancley Santos, Maria da Conceição, Maria da Neves Viana e Rafaela Cardoso dos Santos. E posteriormente, Daniel Toffoli Ribeiro, Manuela Villar Amado, Andréa Cantanhede, Yane Almeida, Cleiton Fantin e Waleska Gravena;

Aos colegas do laboratório de Tecnologia de DNA, Enedina, Márcia, Edmar, Larissa, Alessandra e ao Dr. Spartaco Astolfi Filho;

Aos colegas Geconbebianos: Renata Schimitt, Carla Sardelle, Ivanildo Pereira, Wancley Santos, Márcia Neiva e André. E posteriormente, Carlos David Santana, Adília Nogueira, Taciana, Paulo Estéfano, Daniel Raid, Dutra, Barros e Toffoli. À Hercília e todos do GCBEv.

A todos os colegas do curso que considero mãe e pai do curso de Genética do INPA, o BADPI, se eu escrevesse nomes provavelmente não seria justo, eu não me recordaria de todos, então meus sinceros agradecimentos a todos que fazem parte deste programa de pós-graduação;

A todos os colegas que fiz na Universidade Federal do Amazonas: Paulo Evandro, Cláudio, Ed, Liene, Samanta, Marcelo Gordo, dentre outros.

Ao Fábio e Alexandre por sua amizade paraense;

A todos os amigos de Santarém e Itaituba pela grande amizade e apoio dispensados a mim através do tempo e da distância;

Aos irmãos do Espaço Cultural e Residencial Vila Jaraqui: César de Oliveira Haag, Leonardo da Silveira Rodrigues e Daniel Toffoli Ribeiro. E a todos os amigos da Vila: Adília e Joana, David Santana, Regina, Maria Joana de Albuquerque, Daniela (botinho), Camila, Paulo Evandro e etc.

Aos meus pais (Jóia Maria Holends Vasconcelos e Isaias da Silva Porto), meus irmãos (Wendell Mardson Vasconcelos e Keila Elida Vasconcelos) e minhas sobrinhas (Wendy e Ana Carolina) por terem compartilhado comigo as alegrias de um trabalho que deu certo (graças a Deus). A todos vocês que fazem parte do meu mundo e contribuíram de certa forma para que este trabalho fosse concluído, meu *muito obrigado*.

RESUMO

Os crocodilianos Amazônicos são incluídos em três gêneros, *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus*. Dentro destes, duas espécies merecem atenção especial porque foram muito exploradas em décadas passadas e hoje passam por uma recuperação populacional, o jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) e o jacaré-açú (*Melanosuchus niger*), que são os crocodilianos mais abundantes da Amazônia brasileira. Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de quantificar o grau de variabilidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos *M. niger* e *C. crocodilus*, através de um marcador de linhagem materna (gene mitocondrial citocromo *b*), e desta forma, contribuir com informações que possam ser utilizadas em futuros planejamentos para a conservação e o manejo destas espécies. Com base nas análises de aproximadamente 1.080 pares de bases obtidas para um total de 125 indivíduos de *C. crocodilus* e 132 de *M. niger* provenientes de 9 e 11 localidades respectivamente, em diferentes regiões da Amazônia Brasileira, Peru, Equador e Guiana Francesa, foi possível identificar padrões genéticos biogeográficos. Os resultados demonstram que algumas populações de ambas as espécies estão em expansão populacional mostrando um número relativamente grande de haplótipos únicos. 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, como possíveis eventos histórico-demográficos em populações de *C. crocodilus*. Em *M. niger*, os dados não foram conclusivos para identificar possíveis eventos históricos. Entretanto, possibilitaram identificar a existência de correlação entre divergência genética e distância geográfica. Esta correlação também foi identificada pelo

teste de Mantel, indicando isolamento por distância em *M. niger* e pelos valores significativos de *pairwise* F_{st} que confirmaram a ocorrência de fragmentação. Esta fragmentação foi identificada entre as populações oriundas de rios que deságuas diretamente nas drenagens do oceano Atlântico em relação às populações da bacia Amazônica, entretanto, dentro da bacia Amazônica algumas populações também apresentaram estrutura genética populacional, como por exemplo, a população de *M. niger* do rio Napo. As populações da Guiana Francesa e do Estado do Amapá representam potenciais unidades evolutivas diferenciadas das populações da bacia Amazônica.

ABSTRACT

The Amazonian crocodylians are included in three genera, *Caiman*, *Melanosuchus* and *Paleosuchus*. Within these genera, two species deserve special attention because they were overexploited in past decades; these are the black caiman (*Melanosuchus niger*) and spectacled caiman (*Caiman crocodilus*), the two more abundant crocodylians in the Brazilian Amazon. The objective of this research was to quantify the degree of genetic variability and population structure of the black caiman and the spectacled caiman using a matrilineal marker (mitochondrial gene cytochrome *b*), which to contribute information that can be used for management and for conservation of these species. Approximately 1080 bp were sequenced for a total of 125 individuals of *C. crocodilus* and 132 of *M. niger* representing 9 and 11 localities of each species, respectively. Sampling localities were distributed throughout the Brazilian Amazon, as well as Peru, Ecuador and French Guyana. Results of population genetic analyses demonstrate that some populations of both species are in a process of a demographic expansion shown by a relatively greater number of singleton haplotypes. Both species have high gene diversity but low nucleotide diversity. The Nested Clade Phylogeographical Analysis indicated range expansion, long-distance colonization and past fragmentation as possible historic-demographic event *C. crocodilus* populations. NCPA results for *M. niger* showed no significant historical events. However, in *M. niger* a significant correlation between genetic divergence and geographic distance also was identified by the Mantel test, indicating isolation by distance. The isolated populations of the Atlantic drainages potentially represent evolutionary units differentiated from the Amazon basin populations.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	III
DEDICATÓRIA.....	IV
EPÍGRAFE.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
ANEXO.....	XVIII
	Pag.
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1-HISTÓRIA NATURAL DE CROCODILIANOS AMAZÔNICOS.....	1
1.2-DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DE <i>Caiman crocodilus</i> E <i>Melanosuchus niger</i>	3
1.3-CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PESCA E COMERCIALIZAÇÃO DE CROCODILIANOS NA AMAZÔNIA.....	5
1.3.1- Status de Conservação em <i>M. niger</i> e <i>C.crocodilus</i>.....	7
1.4 – GENÉTICA COMO FERRAMENTA ÚTIL NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE	9
1.4.1- Uso de DNA mitocondrial em estudos genéticos.....	11
1.4.2- Estudos moleculares na ordem Crocodylia.....	13
1.5- JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES.....	18
1.6- OBJETIVOS.....	19

1.6.1- Objetivo geral.....	19
1.6.2- Objetivos específicos.....	19
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1- LOCAIS DE COLETA E AMOSTRAGEM	20
2.2- MÉTODOS LABORATORIAIS.....	23
2.2.1- Extração de DNA.....	23
2.2.2- Amplificação <i>in vitro</i> do gene da citocromo <i>b</i>	23
2.2.3- Sequenciamento do gene citocromo <i>b</i>	25
2.2.4- Alinhamento das seqüências nucleotídicas.....	26
2.3 - MÉTODOS DE ANÁLISES INTRA-ESPECÍFICOS.....	27
2.3.1- Cladogramas de haplótipos e a inferência de eventos históricos.....	27
2.3.2- Polimorfismo molecular em populações.....	28
2.3.3- Testes de neutralidade e equilíbrio genético.....	29
2.3.4- Metodologias para detectar estrutura de população.....	31
3- RESULTADOS.....	36
3.1- <i>Caiman crocodilus</i>	36
3.2- <i>Melanosuchus niger</i>	44
4- DISCUSSÃO.....	53
4.1- <i>Caiman crocodilus</i>	53
4.1.1- Polimorfismo da região do citocromo <i>b</i> em <i>C. crocodilus</i> e testes de neutralidade.....	53
4.1.2- Análise Filogeográfica do Agrupamento de Clados (ou NCPA) e estrutura genética entre populações de <i>C. crocodilus</i>	54
4.2 – <i>Melanosuchus niger</i>	58

4.2.1 - Diversidade genética e neutralidade de mutações em <i>M. niger</i>	58
4.2.2 – Análise Filogeográfica de Clados Agrupados ou NCPA e estrutura genética entre populações de <i>Melanosuchus niger</i>.....	59
4.3 – BENEFÍCIOS PARA A TOMADA DE DECISÕES QUANTO AO MANEJO E A CONSERVAÇÃO DE CROCODILIANOS AMAZÔNICOS.....	61
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Frequência dos haplótipos do gene citocromo <i>b</i> em populações de <i>C. crocodilus</i>	37
Tabela 02- Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em <i>C. crocodilus</i> , mostrando os valores das distâncias dos clados (D_c), distâncias dos clados agrupados (D_n) e distância dos clados interiores versus os de ponta (I-T).....	38
Tabela 03- Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva.....	40
Tabela 04- Matriz mostrando os valores de F_{st} das comparações entre os pares de populações de <i>C. crocodilus</i> e os números efetivos de migrantes por geração (Nm).....	41
Tabela 05- Distribuição dos 41 haplótipos encontrados no fragmento de 1027 pb em <i>M. niger</i>	45
Tabela 06- Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em <i>M. niger</i> , mostrando os valores das distâncias dos clados (D_c), distâncias dos clados agrupados (D_n) e distância dos clados interiores versus os de ponta (I-T).....	47
Tabela 07- Matriz de valores de <i>pairwise</i> F_{st} usando o método da distância (abaixo da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) entre os pares de populações (acima da diagonal) em populações de <i>M. niger</i>	49
Tabela 08 - Sumário com os principais índices de diversidade genética populacional em <i>M. niger</i> e valores dos testes de neutralidade.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Filhotes de jacaré-tinga - <i>C. crocodilus</i>	2
Figura 02- Captura de <i>M. niger</i>	4
Figura 03- Distribuição geográfica de <i>Caiman crocodilus</i> e <i>Caiman yacare</i>	5
Figura 04- Esquema gráfico do DNA mitocondrial de <i>Caiman crocodilus</i> com destaque à região do gene citocromo <i>b</i>	11
Figura 05- Cladograma ilustrando as relações filogenéticas entre crocodilianos existentes e extintos.....	14
Figura 06- Distribuição geográfica das 11 populações de jacaré-açú analisadas e os respectivos números amostrais por localidade.....	21
Figura 07- Distribuição geográfica das 9 populações de <i>C. crocodilus</i> analisadas e os respectivos números amostrais por localidade.....	22
Figura 08- Detalhe do DNAm _t mostrando as regiões de anelamento dos primers.....	25
Figura 09- Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídio mostrando o fragmento do gene citocromo <i>b</i> amplificado.....	26
Figura 10- Modelo de Ilha simples com o fluxo de migrantes da população principal (A) em direção a uma população previamente isolada (B).....	33
Figura 11- Esquema do modelo de n-ilhas, o qual utiliza dois parâmetros: tamanho efetivo de população e taxa de migração por geração.....	34
Figura 12- Cladograma dos 38 haplótipos de <i>C. crocodilus</i>	39
Figura 13- Árvore filogenética de <i>Neighbor Joining</i> sem raiz baseada nos valores de <i>pairwise F_{st}</i> das populações de <i>Caiman crocodilus</i>	42

Figura 14- Árvore dos haplótipos inferida com 95% de parcimônia, contendo os 41 haplótipos de DNAMt detectados em <i>M. niger</i>	46
Figura 15- Árvore filogenética de <i>Neighbor Joining</i> sem raiz baseada nos valores de <i>pairwise F_{st}</i> das populações de <i>Melanosuchus niger</i>	51

ANEXO

Tabela A- Sítios variáveis nos 1085 pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo <i>b</i> de <i>Caiman crocodilus</i>	74
Tabela B- Sítios variáveis nos 1027 pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo <i>b</i> de <i>Melanosuchus niger</i>	75
Figura A- Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de <i>C. crocodilus</i>	76
Figura B- Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de <i>M. niger</i>	76
Figura C- Composição da freqüência nucleotídica da região do citocromo <i>b</i> de <i>C. crocodilus</i>	77
Figura D- Composição da freqüência nucleotídica da região do citocromo <i>b</i> de <i>M. niger</i>	77
Figura E- Freqüência dos aminoácidos nas seqüências de <i>C. crocodilus</i>	78
Figura F- Freqüência dos aminoácidos nas seqüências de <i>M. niger</i>	78
Tabela C- Matriz de distâncias de rios em Km utilizada nas análises de agrupamento de clados (NCPA) e no teste de Mantel.....	79

1- INTRODUÇÃO

1.1- HISTÓRIA NATURAL DE CROCODILIANOS AMAZÔNICOS

Os crocodilianos são considerados “fósseis vivos” por apresentarem características atuais muito similares às de seus ancestrais e formam, juntamente com as aves, os únicos descendentes de um grupo ancestral conhecido como Archosauria, representado por répteis que dominaram as comunidades terrestres do planeta na Era Mesozóica (245 a 65 milhões de anos atrás).

Atualmente são reconhecidos apenas 8 gêneros e 23 espécies viventes que são divididas nas Famílias Crocodylidae, Alligatoridae e Gavialidae, pertencentes à subordem Eusuchia. Estas famílias foram separadas pelo menos desde o Mioceno (Steel, 1973), formando um grupo pequeno e relativamente homogêneo de répteis caracterizados pelo tamanho corporal grande, longo período de tempo para maturidade, vida reprodutiva relativamente longa, oviparidade, um ou poucos ninhos por ano e distribuição tropical e subtropical (Ferguson, 1985).

As cinco espécies de crocodilianos que ocorrem no Brasil pertencem à Família Alligatoridae, popularmente chamadas de jacarés (Carvalho, 1951; Magnusson, 1985), *Caiman crocodilus*, *Melanosuchus niger*, *Paleosuchus trigonatus*, *Paleosuchus palpebrosus* e *Caiman latirostris*. Destas, apenas *Caiman latirostris* não ocorre na Amazônia. Alguns autores consideram seis espécies brasileiras, elevando o *status* de *Caiman crocodilus yacare* (King e Burke, 1989) ao nível específico *Caiman yacare*, primeiramente proposto por Daudin (1802).

Existe uma falta de análises sistemáticas no gênero *Caiman* (Busack e Pandya, 2001), que atualmente compreende cinco taxa reconhecidos associados a *Caiman crocodilus*: *C. c. apaporiensis* (Medem, 1955), *C. c. chiapasius* (Bocourt, 1976), *C. c. crocodilus* (Linnaeus, 1758), *C. c. fuscus* (Cope, 1868), e *C. c. yacare* (King e Burke,

1989). Na região Amazônica, ocorrem todas estas subespécies acima citadas, exceto *C. c. chiapasius* possui distribuição ampla, alcançando o sul do México e *C. c. fuscus*. A espécie *C. yacare* se distribui até o norte da Argentina.

O *Caiman crocodilus crocodilus* (Fig. 01) é a subespécie com maior distribuição geográfica na Amazônia (área 3 da Fig. 03), onde é popularmente conhecido como jacaré-tinga. Esta classificação em subespécies não é aceita por ser irreal, segundo alguns pesquisadores (Busack e Pandya, 2001).



Figura 01- Filhotes de jacaré-tinga - *C. crocodilus*. Fotografia: Luís Cláudio Marigo

O jacaré-tinga pode alcançar 2,5 metros de comprimento total, e pode atingir maturação sexual com 3 a 4 anos de idade (Staton e Dixon, 1977), bem menos tempo que os outros crocodilianos, que requerem mais de 9 anos para as fêmeas alcançarem a maturidade sexual. Exceto o *Alligator mississippiensis* que pode alcançar tamanho reprodutivo em idade similar ao *C. crocodilus* (Brisbin, 1988).

O gênero *Melanosuchus* compreende apenas a espécie *Melanosuchus niger* (Spix, 1825), conhecido popularmente na região Amazônica como jacaré-açú. A

espécie constitui o maior membro da família Alligatoridae e o maior predador da América Continental podendo alcançar mais de cinco metros de comprimento (Medem, 1983).

Tanto o jacaré-tinga quanto o jacaré-açú são considerados animais oportunistas e generalistas em seus hábitos alimentares porque consomem uma ampla variedade de presas e apresentam dietas bem diversificadas e geralmente similares (Magnusson *et al.*, 1987).

1.2 - DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DE *Caiman crocodilus* E *Melanosuchus niger*

O jacaré-tinga (Fig. 01) e o jacaré-açú (Fig. 02) são os jacarés de maior densidade demográfica nas florestas alagáveis (várzeas e igapós) da Amazônia brasileira e suas respectivas áreas de abrangência constam nas figuras 02 e 06.

O *Caiman crocodilus* habita a bacia amazônica, incluindo o rio Amazonas e seus tributários, em elevações aproximadamente abaixo de 600 m, em rios, pequenos lagos artificiais, igarapés, e outros corpos d'água (Brazaitis, Rebêlo e Yamashita, 1996). Esta espécie possui ampla distribuição, que vai do sul do México até o norte da Argentina, incluindo a bacia do rio Orinoco (Venezuela), bacia Amazônica, Colômbia, Bolívia, Brasil e Peru (Ross, 1998) e por vários outros países americanos. Foi introduzida em Cuba, Porto Rico e Estados Unidos. *Caiman crocodilus crocodilus* distribui-se através da drenagem do rio Orinoco, Venezuela, da Colômbia até o norte do Brasil e leste da Bolívia e Peru (área 3 da Fig. 02).

O *Melanosuchus niger* distribui-se por basicamente toda a bacia Amazônica (Fig. 06), incluindo Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru, e algumas áreas das Guianas (Ross, 1998).

Estes dois crocodilianos ocupam microhabitats distintos. O *M. niger* é mais

comum em lagos e locais mais fundos (Rebêlo e Lugli, 2001), enquanto *C. crocodilus* é mais generalista quanto ao uso do habitat e costuma ser mais encontrado em áreas rasas ou em capinzais nos maiores rios, lagos e paranás da Amazônia (Magnusson, 1985).

Estudos realizados no Parque Nacional do Jaú (Amazonas/Brasil) em 1993 e 1996 confirmam a presença de *C. crocodilus* e *M. niger*, principalmente em lagos e rios, contudo, estas espécies também habitam em riachos. Nestes estudos pesquisadores identificaram 290 indivíduos, sendo 69% de *Caiman crocodilus*, 14% de *Melanosuchus niger*, 12% de *Paleosuchus trigonatus* e 4% de *Paleosuchus palpebrosus* (Rebêlo e Lugli, 2001).



Figura 02- Captura de *M. niger*. Fotografia: Luís Cláudio Marigo

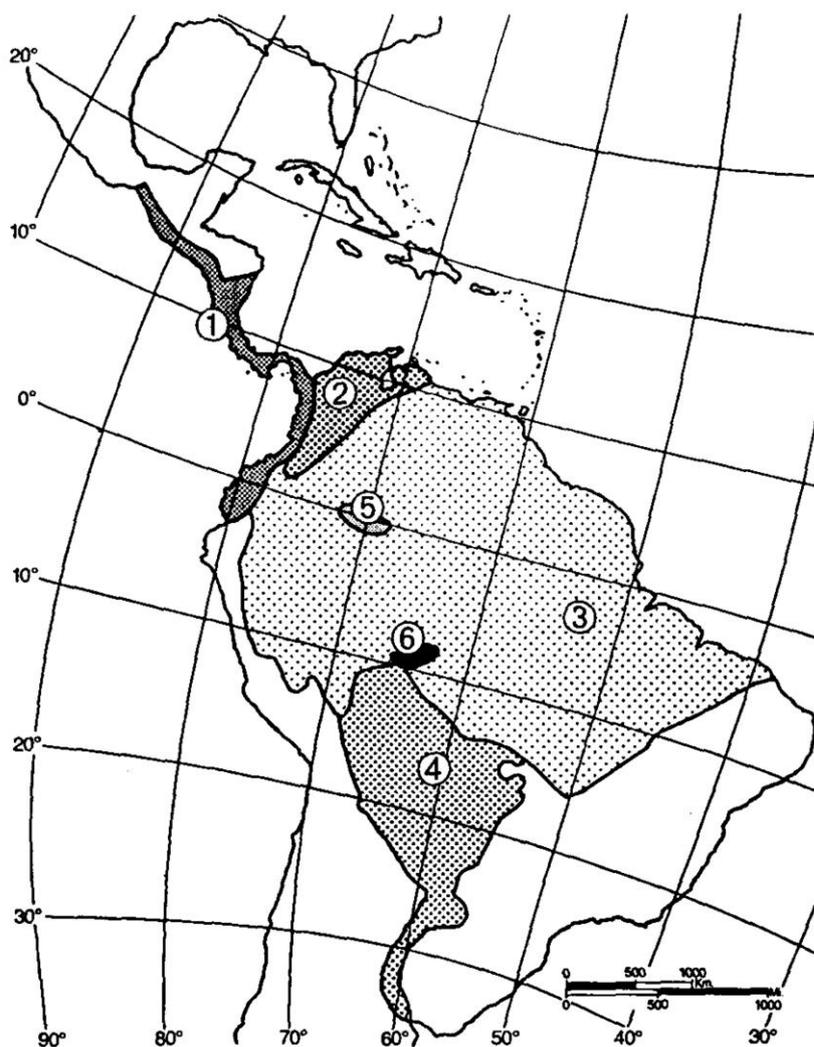


Figura 03- Distribuição geográfica de *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare* (Busack e Pandya 2001): *C. c. chipasius* (1); *C. c. fuscus* (2); *C. c. crocodilus* (3); *C. yacare* (4); e *C. c. apaporiensis* (5). Na área 6 ocorrem *C. c. crocodilus* e *C. yacare*. Este trabalho concentrou-se na área 3.

1.3- CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PESCA E COMERCIALIZAÇÃO DE CROCODILIANOS NA AMAZÔNIA.

Os crocodilianos pertencem a um dos grupos faunísticos de maior valor econômico mundial e estão tradicionalmente sujeitos às mais variadas formas de manejo, legais ou ilegais. A utilização de crocodilianos ocorre, principalmente por seus ovos, carne, couro e dentes, que são utilizados na alimentação ou como adornos por humanos modernos e aborígenes, além da gordura, que os ribeirinhos de algumas

regiões da Amazônia usam na medicina popular contra reumatismo (Santino Mendes, comunicação pessoal).

A caça comercial de *M. niger* para obtenção do couro começou na década de 30 (Smith, 1980; Medem, 1983). Os couros eram exportados para a Europa e os Estados Unidos, tornando-se mais intensa do início da década de 50 (Fittkau, 1970) até o final da década de 70 e início dos anos 80 (Smith, 1980; Rebêlo e Magnusson, 1983). Houve superexploração inicialmente de *M. niger* por produzir um couro de qualidade superior em relação aos outros jacarés do Brasil, sendo pouco ossificado. O couro dos jacarés é usado como matéria-prima para a confecção de sapatos, cintos, bolsas e outros artefatos de couro. A espécie *M. niger* foi a espécie amazônica mais afetada por este comércio (Plotkin *et al.*, 1983), tornando-se bastante rara entre 1970 a 1989, apenas aproximadamente 10% dos couros de jacarés confiscados no Brasil pertenciam a esta espécie nestas duas décadas (Rebêlo e Magnusson, 1983). A exploração de *C. crocodilus* para comercialização de couro também foi intensa e, entre 1960 e 1969, mais de 1,5 milhões de peles foram exportadas legalmente da Amazônia Brasileira (Smith, 1980).

Estudos realizados na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (Amazonas/Brasil), mostraram que, nos últimos anos, a exploração dessas espécies ocorreu mais para obtenção de carne do que de couro. O impacto provocado pela caça por carne é diferente daquele provocado pela exploração do couro. A caça pelo couro reduz significativamente as populações de jacaré e a caça para obtenção de carne, não. Isto ocorre por que ao contrário dos altos preços alcançados pelo couro no mercado internacional, a carne, de menor valor, tornou-se mais uma fonte de subsistência com poucos lucros quando comercializada no Brasil ou no exterior (Da Silveira e Thorbjarnarson, 1999). A carne salgada é vendida na Colômbia e no estado do Pará, sendo muitas vezes misturada com pirarucu (*Arapaima gigas*) (Da Silveira e

Thorbjarnarson, 1999). Outro fato que contribui para a diminuição significativa das populações naturais de crocodilianos utilizados na indústria do couro pode ser relacionado à idade dos indivíduos abatidos. Para se obter couro de qualidade (menos ossificado) é necessário abater indivíduos jovens, que ainda não alcançaram idade reprodutiva (Rebêlo, comunicação pessoal).

Em estudos realizados no Parque Nacional do Jaú (Amazonas/Brasil), pesquisadores concluíram que a pressão da caça e a alteração ou perda de habitat naquele local, não estão tão evidentes devido a ampla recuperação das populações (Rebêlo e Lugli, 2001).

Informações mais recentes (Ronis da Silveira, comunicação pessoal) relatam que em algumas comunidades ribeirinhas da Amazônia, pescadores utilizam carne de jacarés e botos como isca para pegar piracatinga (*Calophysus macropterus*), um bagre necrófago presente nos rios de água doce, que possui carne menos nutritiva que dos jacarés. Os preços da carne de jacarés e piracatingas no mercado na região do Solimões são iguais, ocorrendo então o desperdício da carne e da pele dos jacarés abatidos, que segundo o pesquisador Ronis da Silveira, são cerca de 8 mil por ano.

1.3.1- Status de Conservação em *M. niger* e *C. crocodilus*

No Brasil, o uso da fauna, incluindo os jacarés, foi proibido totalmente em 1967 (Lei N° 5.197). No entanto, a exploração ilegal para obtenção de peles de jacarés na Amazônia estendeu-se até o início dos anos 80.

O *Melanosuchus* (Fig. 03) esteve recentemente na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) e na lista oficial da fauna em extinção do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis). Atualmente, consta na lista de espécies ameaçadas da IUCN

na categoria de baixo risco, mas dependente de conservação, táxon-específico ou habitat-específico. Consta também no Apêndice I do CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e da Fauna Selvagens em Perigo de Extinção) o que proíbe a comercialização internacional de *M. niger*. As principais ameaças para esta espécie atualmente são a perda de habitat e a caça ilegal.

Caiman crocodilus, apesar da caça, não esteve na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN e atualmente consta apenas no apêndice II do CITES, o que permite sua comercialização internacional. Entretanto, é preciso considerar que cada país possui uma legislação própria.

1.4 – GENÉTICA COMO FERRAMENTA ÚTIL NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE

O objetivo central da Genética da Conservação é o estudo da biodiversidade molecular nas populações naturais das espécies sob impacto antropogênico (Solé-Cava, 2001). A Genética da Conservação foi criada há cerca de 23 anos e tornou-se muito útil na medida em que os geneticistas melhor compreenderam os problemas enfrentados pelos conservacionistas, que por sua vez, compreenderam melhor o potencial que marcadores genéticos têm para a abordagem de seus problemas (Solé-Cava, 2001).

Para conservar a diversidade genética de uma população é necessário considerar os efeitos da mutação, migração, deriva genética, seleção e todas as mudanças que atuam sobre a diversidade genética de maneira integrada. O balanço das forças que mantêm a diversidade genética difere entre populações grandes e populações pequenas. A Seleção, por exemplo, possui maior impacto em populações grandes do que em populações pequenas, enquanto que a deriva genética possui papel importante em populações pequenas (Frankham *et al.*, 2002).

A perda da diversidade genética pode levar populações ou espécies à extinção devido à perda de alelos e redução da heterozigosidade. A estratégia para conservar a variação genética nas espécies depende do nível da estruturação genética, ou seja, do padrão de distribuição espacial de diferenças genéticas entre as populações de uma espécie. Dados sobre o fluxo gênico, diversidade genética e níveis de estrutura das populações naturais podem fornecer informações importantes para se diagnosticar possíveis populações fragmentadas e orientar planos de translocação e reintrodução de indivíduos com a finalidade de se evitar a depressão por endocruzamento (Frankham *et al.*, 2002). Outro aspecto é a identificação de unidades de manejo a partir do grau de fragmentação e taxas de fluxo gênico dentro e entre populações, que podem ser consideradas unidades evolutivas significantes (UES), constituindo prioridades no manejo e na conservação genética de populações naturais (Crandall *et al.*, 2000).

As implicações desse tipo de análise para estudos de conservação são muito importantes: se uma espécie ocupa uma determinada área e apresenta estrutura populacional (ou seja, diferenciação genética), a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais acumuladas que se perderiam no caso de a população ser misturada com outras. Por outro lado, se as populações da espécie são homogêneas ao longo de toda sua área de ocorrência, então é viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos dessa área para recolonização das outras quando necessário (Haig, 1998). Neste caso, assume-se que existem conexões demográficas ou genéticas entre as populações geograficamente distanciadas, através de indivíduos migrantes. Quando uma espécie encontra-se subdividida geograficamente em várias populações diferenciadas (*demes*), conectadas por indivíduos migrantes, isto pode definir uma metapopulação, ou seja, uma população de populações flutuantes no

tempo (Wells e Richmond,1995). Desta maneira, para estudos de recolonização ou conservação de espécies ameaçadas deve ser levado em consideração não a espécie, mas as unidades de manejo, que são subpopulações diferenciadas geneticamente (Berg *et al.*, 1996).

O estudo das estruturas populacionais através de técnicas moleculares talvez seja a parte mais importante da genética da conservação e têm sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente (ou seja, abundantes, mas com riscos populacionais devido a superexploração), como nas espécies já ameaçadas de extinção (Solé-Cava, 2001).

1.4.1- Uso de DNA mitocondrial em estudos genéticos

Marcadores moleculares têm sido amplamente empregados para estimar parâmetros de genética de populações de relevância para a conservação biológica, assim como o grau de heterozigose dentro e entre populações, fluxo gênico entre populações e a distinção genética de unidades taxonômicas.

Entre os marcadores de DNA mais utilizados nos últimos anos para estudar os níveis e padrões de distribuição de variabilidade genética entre populações de espécies animais, destaca-se o DNA mitocondrial (DNAmt), cuja herança é predominantemente materna e não ocorre recombinação, por se tratar de um DNA haplóide (Avise, 2000).

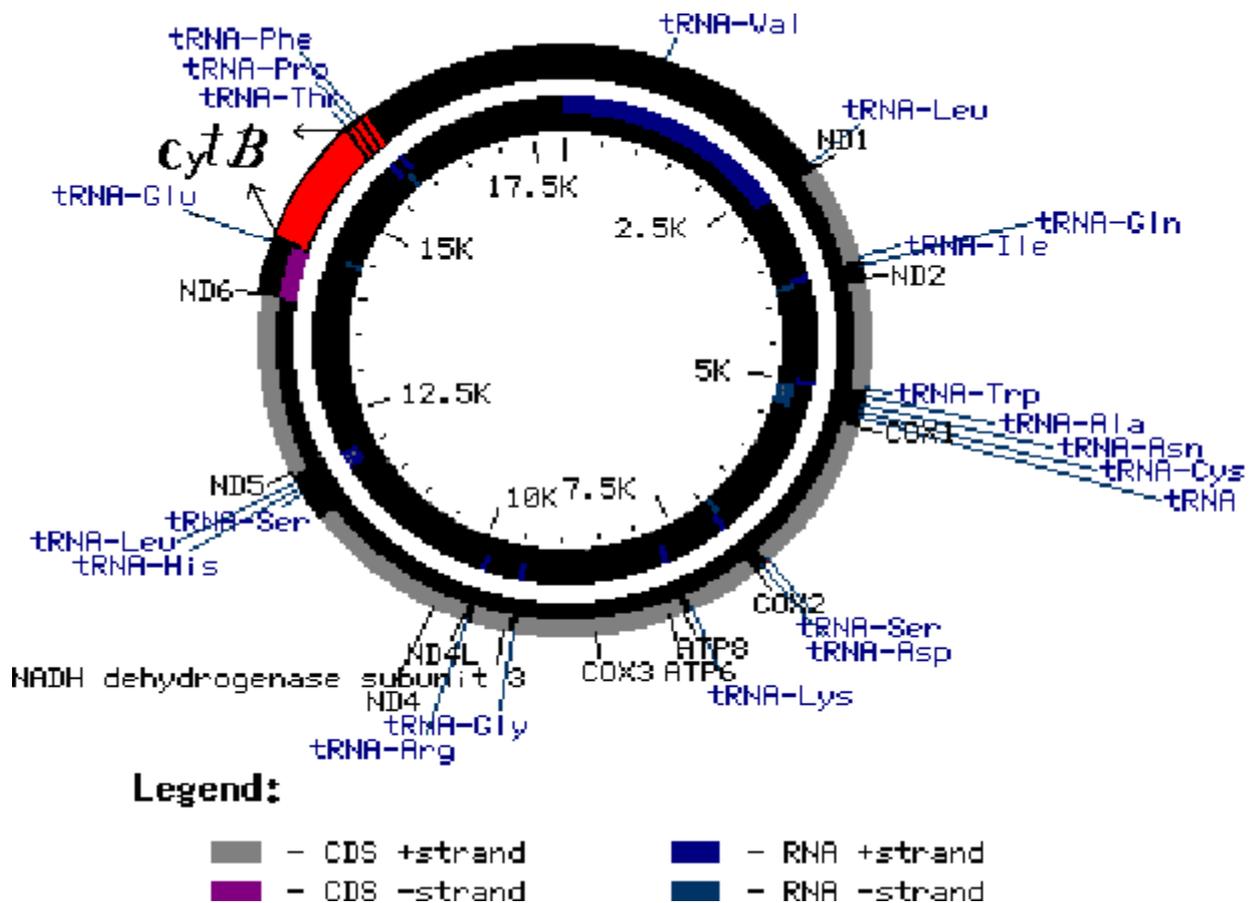


Figura 04. Esquema gráfico do DNA mitocondrial de *Caiman crocodilus* seqüenciado por Janke *et al.*, 2001, com destaque à região do gene citocromo *b*. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/paltik.cgi?gi=15642&db=genome&from=1&to=17900&len=500&shift=10&cx=140&cy=130&view=1&x=187&y=89>, acessado em 09/12/2004.

Em vertebrados, o DNAm_t é uma molécula circular (Fig. 04) com 37 genes codificadores: 13 genes que codificam para proteínas relacionadas à função mitocondrial, 22 RNAs de transferência, e 2 RNAs ribossomais. Além de uma região não codificadora chamada de região controle (Avise *et al.*, 1986). Quanto aos genes, há ausência de seqüências não codificadoras (*introns*), sendo o DNAm_t geralmente conservado no tamanho (cerca de 16 Kb) e no arranjo dos genes (Avise *et al.*, 1986).

Uma das vantagens em usar o DNAm_t em estudos populacionais e filogenéticos é que ele possui uma elevada taxa de evolução (mutação), sendo de 5 a 10 vezes maior (1×10^{-8} substituição / sítio / geração) do que os genes codificadores de

proteínas do DNA nuclear (Li, 1997; Brown *et al.*, 1982). Este fenômeno ocorre devido a alguns atributos deste material genético: (a) DNAm não codifica proteínas envolvidas diretamente em sua própria replicação ou transcrição, e a molécula produz apenas 13 tipos de proteínas; (b) ineficiência dos mecanismos de reparo, alta exposição a radicais livres mutagênicos no ambiente oxidante da mitocôndria; e (c) o fato do DNAm não estar associado a proteínas histonas, que são evolutivamente conservadas (Wilson *et al.*, 1985; Li, 1997; Nedbal e Flynn, 1998).

O DNAm é também muito utilizado devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno e sua organização simples (Avice *et al.*, 1984). Esta ferramenta tem sido utilizada extensivamente nas últimas três décadas para inferir o passado evolutivo e demográfico de populações e espécies. Em ecologia molecular, a maioria dos estudos empregando DNAm ocorre na estimativa de história demográfica e filogenética através da genealogia de um segmento deste genoma (Ballard *et al.*, 2004).

1.4.2- Estudos moleculares na ordem Crocodylia

Polimorfismos protéicos foram inicialmente estudados em alguns crocodilianos. Com o advento de novas técnicas moleculares, foi possível resolver problemas mais eficientemente usando-se o sequenciamento automático de segmentos do DNAm e análises com marcadores moleculares de microssatélites, por exemplo.

O DNA mitocondrial de *C. crocodilus* (Fig. 04) foi seqüenciado por Janke *et al.* (2001), totalizando 17.900 pb (pares de base), o que ajudou muito no entendimento das relações evolutivas entre quelônios, aves e crocodilianos. Entretanto, alguns trabalhos com genes mitocondriais iniciaram bem antes, principalmente para elucidar questões de sistemática, isto porque dados gerados por pesquisas com parasitos, morfologia e

osteologia, geraram incongruência na filogenia de crocodilianos (Poe, 1996). Pesquisas com seqüências da subunidade ribossomal 12 S do DNAm t e posteriormente, ND6 e citocromo *b* mostraram o poder da ferramenta molecular no entendimento de relações filogenéticas em crocodilianos (Gatesy *et al.*, 1993; White e Densmore, 2001).

Gatesy *et al.* (2003), utilizaram uma abordagem combinada de dados morfológicos e moleculares com o objetivo de elucidar incongruências na filogenia de crocodilianos. Naquele trabalho os autores utilizaram 240 pb do gene mitocondrial da citocromo *b*, dentre o conjunto dos genes mitocondriais analisados. DNAm t, nuclear e morfologia foram analisadas em conjunto e a filogenia resultante consta na Fig. 05.

Isto demonstra que recentemente vários trabalhos usando uma abordagem de genética molecular iniciaram-se dentro do grupo dos crocodilianos (para revisão ver Dessauer *et al.*, 2002). Na África, o gênero *Osteolaemus* apresenta um grande problema sistemático, anteriormente era dividido em dois gêneros e atualmente é reconhecido como duas subespécies dentro da espécie *Osteolaemus tetrapis*. Estudos utilizando ferramentas de sistemática molecular (DNAm t) no crocodilo africano *Osteolaemus tetrapis tetrapis* indicaram que existem dois grupos distintos quanto ao nível de divergência, sugerindo o reconhecimento de uma nova subespécie ou pelo menos uma nova análise taxonômica (Ray *et al.*, 2000).

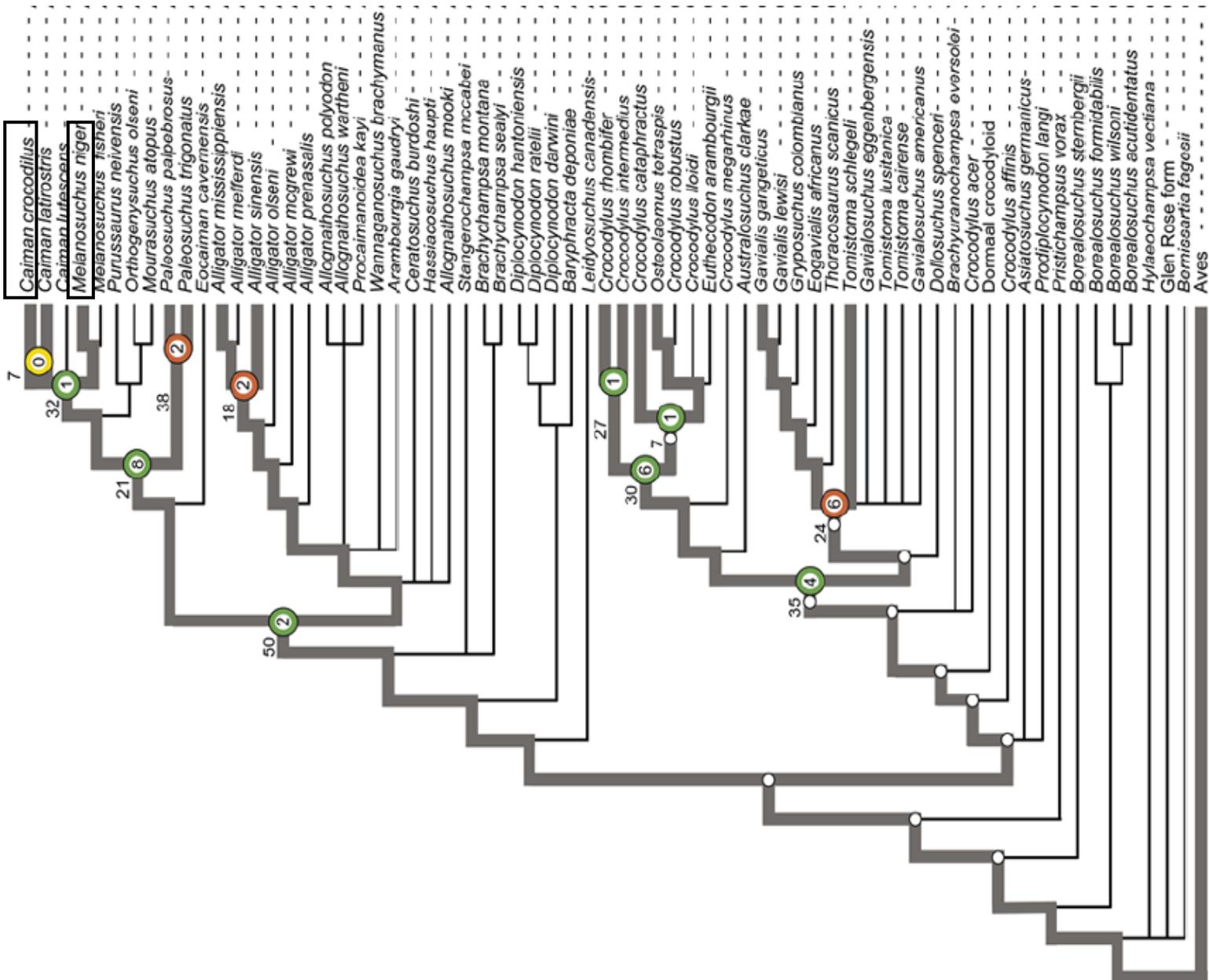


Figura 05- Cladograma ilustrando as relações filogenéticas entre crocodilianos existentes e extintos (Gatesy *et al.*, 2003). Esta é uma topologia de consenso *strict* baseada em dados morfológicos e moleculares, incluindo seqüências de DNAmT e DNAnu, com 2.262 passos de comprimento. Com destaque para *C. crocodilus* e *M. niger*, os quais estão envolvidos por um retângulo. Os valores dentro dos círculos correspondem ao suporte do índice de decaimento.

Segmentos mitocondriais também foram utilizados em análises populacionais em crocodilianos, como por exemplo, em Glenn *et al.* (2002), que utilizaram sequenciamento da região do citocromo *b* ao domínio central da região controle do DNAm^t de 25 indivíduos de *Alligator mississippiensis* e verificaram o baixo nível de polimorfismo do DNAm^t desses crocodilianos, cujo número de haplótipos foi apenas quatro. Naquele trabalho, o baixo polimorfismo do DNAm^t levou os autores a hipotetizar um possível “efeito gargalo de garrafa” em *A. mississippiensis*. As seqüências nucleotídicas (693-1199, pb) do citocromo *b* ao tRNA^{thr} foram analisadas por Glenn *et al.* (2002), assim como o códon de parada (*stop codon*) incompleto que ocorre em *Alligator* e *Caiman* (Janke e Arnason, 1997; Janke *et al.*, 2001) na porção final do gene citocromo *b*. Desta forma, os Alligatoridae e Crocodylidae apresentam uma região não-codificante cujo tamanho estimado varia entre 32 a 68 pb, e pode ser considerada uma sinapomorfia para crocodilianos (Glenn *et al.*, 2002).

Outros estudos têm sido realizados utilizando-se o gene mitocondrial citocromo *b* em *C. crocodilus* e *M. niger* da Amazônia (Farias *et al.*, 2002). 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 Farias *et al.* (2004) também indicam, através de valores do F_s de F_u , 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, segundo classificação de Sioli 1984).

Considerando que o gene citocromo *b* é amplamente utilizado em estudos de sistemática para resolver divergências em vários níveis taxonômicos (Avise, 2000), inclusive em crocodilianos (Glenn *et al.*, 2002; Farias *et al.*, 2004), o que me levou a

utilizar seqüências deste gene para desenvolver um estudo biogeográfico e na análise da estrutura genética de populações naturais de *Melanosuchus niger* e *Caiman crocodilus* da Amazônia.

Além dos trabalhos anteriormente citados que utilizaram DNAmt, outros utilizando microssatélites (regiões repetitivas de DNA nuclear) têm sido amplamente utilizados em genética populacional de crocodilianos. Na América do Norte, Davis *et al.* (2002) pesquisaram a estrutura genética em populações de *Alligator mississippiensis* de doze localidades do Sudeste dos Estados Unidos, utilizando marcadores microssatélites. Dentre essas populações, apenas duas apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que em geral a heterozigosidade foi baixa. As análises da estrutura populacional revelaram pouca diferenciação, exceto quando as populações foram separadas em dois grandes grupos, um do leste e outro do oeste, mostrando uma “descontinuidade” (*gap*) filogeográfica naquela região.

Outro estudo com *Alligator mississippiensis* foi conduzido utilizando *loci* microssatélites no Texas, Estados Unidos (Ryberg *et al.*, 2002). Naquele trabalho seis populações foram amostradas e as distinções genéticas e ecológicas de diferentes estoques sugeriram considerável subdivisão populacional, o que os autores associaram a diferenças na demografia e história natural, bem como a barreiras para dispersão destes crocodilianos.

Na América Central, nove *loci* microssatélites foram usados para estimar a estrutura genética e os padrões de fluxo gênico em *Crocodylus moreletii* (Dever *et al.*, 2002), de sete localidades no norte de Belize. Naquele estudo, os autores correlacionaram a distância geográfica com a subdivisão genética das populações.

Na América do Sul, estudos utilizando marcadores de DNA microssatélites previamente desenvolvidos para *Alligator mississippiensis* e testados para *Caiman latirostris* (Verdade *et al.*, 2002) e novos marcadores microssatélites desenvolvidos

para *Caiman latirostris* (Zucoloto *et al.*, 2002), mostraram que existem diferenças microgeográficas em termos de diversidade genética e heterozigosidade entre as populações de *C. latirostris* do rio Piracicaba e tributários, no estado de São Paulo, Brasil.

1.5- JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

Atualmente, em relação aos jacarés da Amazônia, uma questão genética, de conservação e manejo muito relevante a ser abordada se referem ao conhecimento dos níveis e padrões de distribuição espacial da variabilidade genética, para se entender padrões evolutivos inter e intrapopulacionais que podem fornecer subsídios na busca de melhores estratégias para o uso racional deste recurso.

Além disto, identificar populações cuja variabilidade genética encontra-se pequena é importante para se propor maneiras eficientes de conservação. Por outro lado, identificar populações com elevada variabilidade genética também pode ser interessante para o manejo sustentável destas populações naturais.

Saber quantas populações ou subpopulações de crocodilianos ocorrem na Amazônia pode gerar informações importantes para a tomada de decisões quanto à conservação destes animais. Neste sentido, o presente trabalho representa um dos estágios iniciais de um esforço para se caracterizar geneticamente as populações naturais de jacaré-açú e jacaré-tinga, utilizando frequência haplotípica para se inferir padrões filogeográficos.

Baseado nas informações expostas anteriormente e na extensão geográfica da bacia Amazônica, que abriga uma grande e complexa diversidade de organismos, é possível levantar diversas hipóteses. Neste estudo, toda a problemática abordada se resume em três hipóteses a serem testadas:

H_0 = As populações de jacarés na Amazônia encontram-se em equilíbrio genético com relação ao gene mitocondrial citocromo *b*;

H_1 = As populações de jacarés na Amazônia não se encontram em equilíbrio genético evidenciando uma expansão populacional que pode ou não estar relacionada a uma recuperação após o período de sobre-exploração comercial;

H_0 = Não existe correlação significativa entre divergência genética e distância geográfica nas populações amostradas, que se encontram em panmixia;

H_2 = Existe correlação entre geografia e distribuição da variação genética e esta correlação é devido a eventos demográficos tais como: isolamento por distância, fragmentação no passado, fluxo gênico restrito e colonização;

H_0 = As populações de jacarés pertencentes à bacia Amazônica apresentam-se em uma única e grande população;

H_3 = Existem populações no rio Amazonas/Solimões e tributários que não são geneticamente homogêneas, apresentando diferenciação genética entre si.

1.6- Objetivos

1.6.1- Objetivo geral

- Quantificar o grau de variabilidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos *M. niger* e *C. crocodilus*, através de um marcador de linhagem materna (gene mitocondrial citocromo *b*), e desta forma, contribuir com informações que possam ser utilizadas em futuros planejamentos para a conservação e o manejo destas espécies.

1.6.2- Objetivos específicos

- Determinar e comparar as seqüências nucleotídicas da região do citocromo *b* de indivíduos de jacaré-tinga e jacaré-açú coletados em diferentes áreas macrogeográficas da Amazônia;
- Inferir se há eventos históricos (colonização, fragmentação, expansão, isolamento por distância) envolvidos no padrão de distribuição geográfica dos haplótipos;
- Determinar possíveis unidades de manejo a partir do nível de diferenciação genética encontrado na frequência dos haplótipos do gene citocromo *b*;
- Comparar os padrões genéticos encontrados nas duas espécies em estudo e explicar as diferenças e/ou as similaridades entre eles.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- LOCAIS DE COLETA E AMOSTRAGEM

Indivíduos de ambas as espécies analisadas foram coletados em populações das seguintes localidades: Rio Uaçá (RU), na Terra Indígena Uaçá, incluindo os rios Oiapoque, e lagos adjacentes; Lago Txipok, também na Terra Indígena Uaçá (LT); Rio Approuague (RA), na Região de Kaw e do rio Rupununi, na Guiana Francesa; Rio Purus (RP); Lago Janauacá (LJ), no rio Solimões; Arquipélago das Anavilhanas (AA), no rio Negro; Lago Mamirauá (LM), na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; Reserva Pacaya-Samíria (P-S), nos rios Pacaya e Samíria; Rio Madeira (RM); região do Rio Napo (RN), no Equador; na Ilha de São Miguel (ISM) e na Comunidade do Tapará (CT), nestes dois últimos locais, as coletas foram no rio Amazonas.

As coletas foram na maioria noturnas, respaldadas pelas licenças 007/03-IBAMA/RAN e 156/3003, assim como pelos processos do IBAMA, 02010.0093/03-53 e 02005.002878/03-91. As escamas foram coletadas em procedimento padrão muito utilizado em estudos de captura e recaptura, no qual os danos causados aos animais são mínimos. Estes procedimentos incluem laçar o animal, imobilizá-lo, medir comprimento corporal, determinar o sexo e retirar a escama para análise de DNA.

Dados da amostragem de *M. niger* constam na Fig. 06, que contém os pontos de coleta indicados sobre a área geográfica ocupada pela espécie. As informações sobre os locais de coleta e número amostral de *C. crocodilus* encontram-se na Fig. 07.

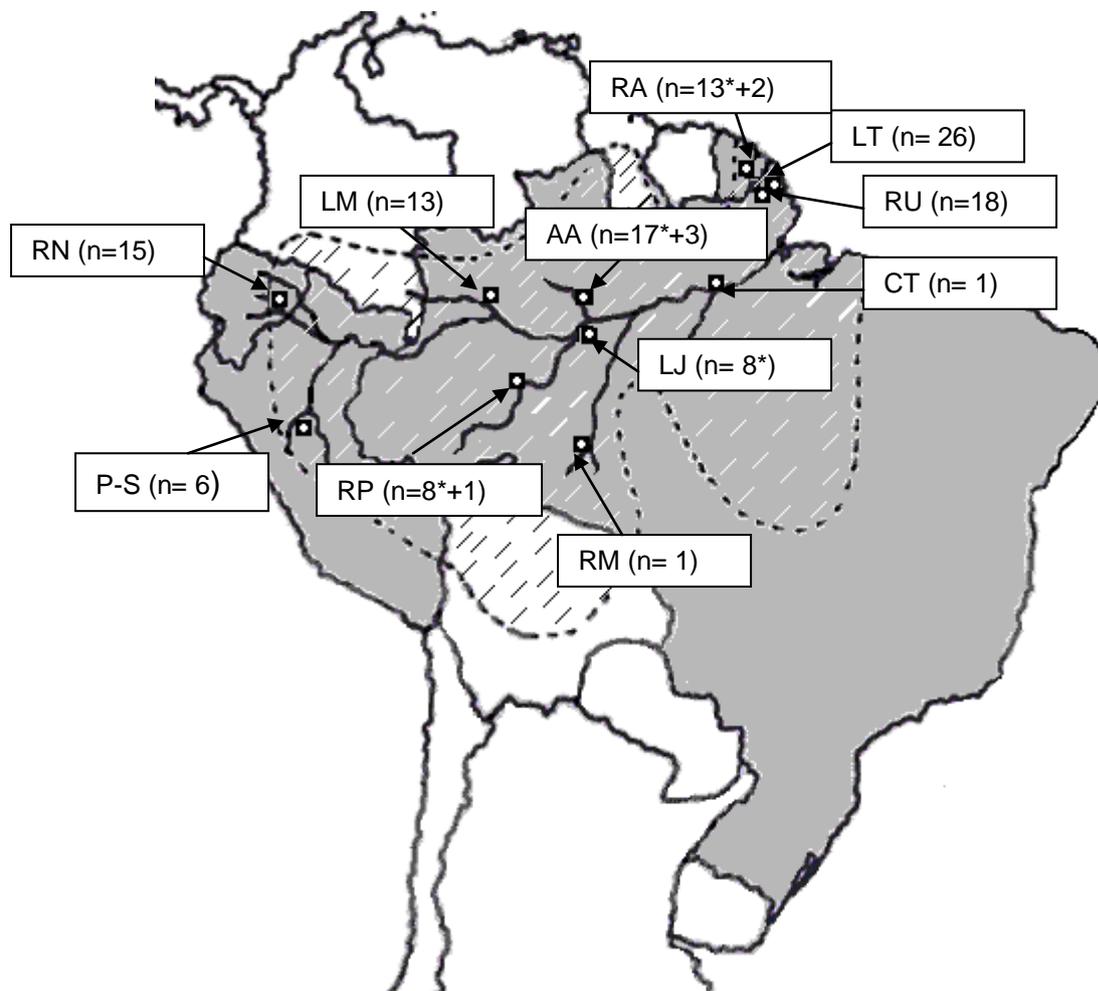


Figura 06- Distribuição geográfica das 11 populações de jacaré-açú analisadas e os respectivos números amostrais por localidade. A área tracejada indica a distribuição da espécie *M. niger*. As seguintes coordenadas correspondem a pontos centrais dos locais das coletas: RA ($4^{\circ} 40' N$ & $52^{\circ} 10' W$); RU ($3^{\circ} 45' N$ & $51^{\circ} 36' W$); CT ($0^{\circ} 77' S$ & $97^{\circ} 65' W$); AA ($2^{\circ} 32' S$ & $60^{\circ} 15' W$); LJ ($3^{\circ} 26' S$ & $60^{\circ} 17' W$); RP ($4^{\circ} 43' S$ & $62^{\circ} 21' W$); RN ($0^{\circ} 38' S$ & $76^{\circ} 9' W$); RM ($9^{\circ} 22' S$ & $6^{\circ} 57' W$); LM ($2^{\circ} 59' S$ & $64^{\circ} 53' W$) e P-S ($4^{\circ} 19' S$ & $76^{\circ} 55' W$).

• Nota: * indica o número amostrado por Farias *et al.* (2004), com o qual o banco de dados deste trabalho foi combinado (N^o de acesso no *GenBank* AY462456-AY462487). RA=Rio Approuague; LT= Lago Txipok; RU= Rio Uaçá; CT= Comunidade do Tapará; LJ= Lago Janauacá; AA= Arquipélago das Anavilhanas; RM= Rio Madeira; RP= Rio Purus; LM= Lago Mamirauá; P-S= Pacaya-Samíria e RN= Rio Napo.

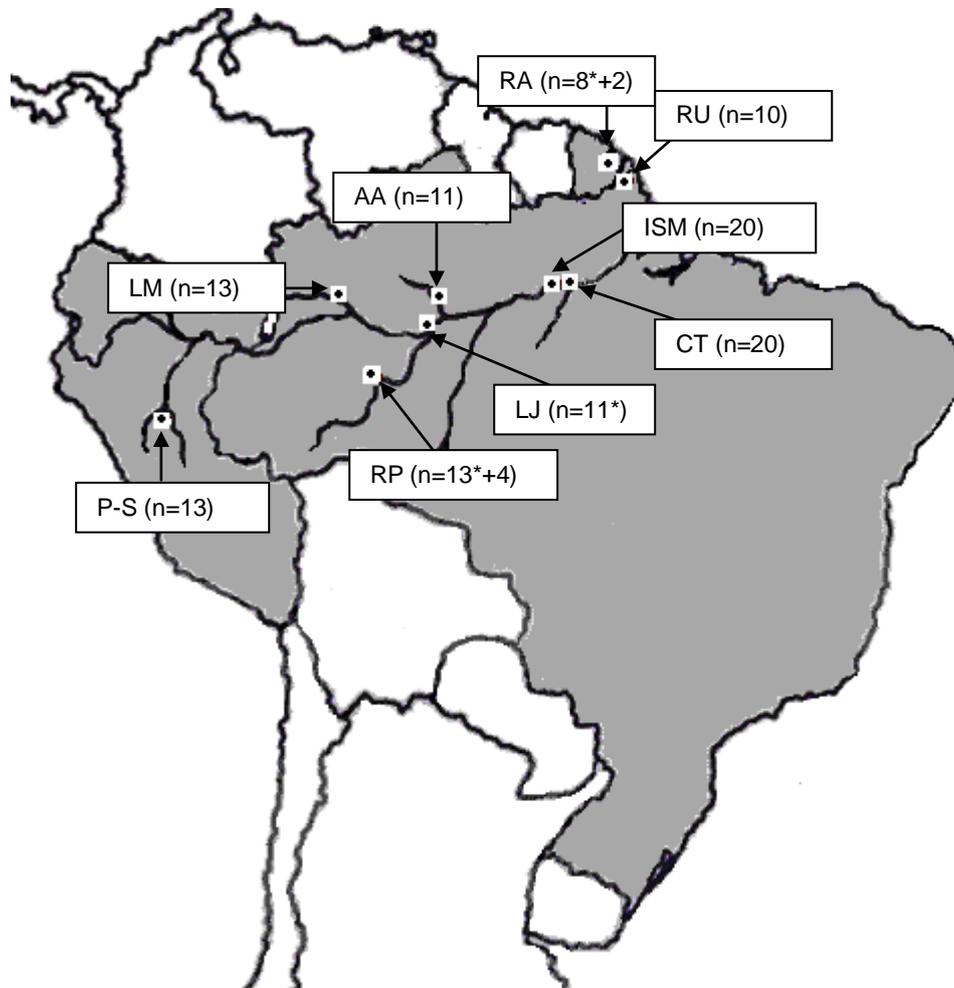


Figura 07– Distribuição geográfica das 9 populações de *C. crocodilus* analisadas e os respectivos números amostrais por localidade. As seguintes coordenadas correspondem a pontos centrais dos locais das coletas: RA (4° 40' N & 52° 10' W); RU (3° 45' N & 51° 36' W); ISM (0° 77' S & 97° 65' W); CT (0° 77' S & 97° 65' W); AA (2° 32' S & 60° 15' W); LJ (3° 26' S & 60° 17' W); RP (4° 43' S & 62° 21' W); LM (2° 59' S & 64° 53' W) e P-S (4° 19' S & 76° 55' W).

- Nota: * indica o número amostrado por Farias *et al.* (2004), com o qual o banco de dados deste trabalho foi combinado (N° de acesso no *GenBank* AY462456-AY462487). RA=Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; ISM= Ilha São Miguel; CT= Comunidade do Tapará; LJ= Lago Janauacá; AA= Arquipélago das Anavilhanas; RM= Rio Madeira; RP= Rio Purus; LM= Lago Mamirauá e P-S= Pacaya-Samíria.

2.2- MÉTODOS LABORATORIAIS

2.2.1- Extração de DNA

O DNA foi isolado por digestão com Proteinase K, que é uma enzima proteolítica não específica, com atividade em vários níveis de pH, e solução SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), um detergente iônico que dissolve membranas celulares, pois solubiliza lipídeos e desagrega complexos macromoleculares. Foram cortados pedaços (de 2 a 3 mm) da escama caudal de cada indivíduo, e posteriormente foram acrescentados: 5µl de RNase, 500µl de Tampão STE (2ml de EDTA 0.5 M, 1 ml de Tris-KCl 1M, 10 ml de NaCl 3M e 20 ml de SDS 5%, completados para 100ml de ddH₂O), 25µl de proteinase K e 75µl de SDS 10% (Sambrook *et al.*, 1989, com algumas modificações).

A seguir foram feitas lavagens sucessivas com fenol, fenol clorofórmio álcool isoamílico e clorofórmio hidratado (600µl de cada um destes reagentes, respectivamente), com a finalidade de desnaturar e solubilizar proteínas, separando-as de lipídios, resultando em um sistema bifásico, após ter sido submetido há 10 minutos na centrífuga. A precipitação do DNA constituiu a fase seguinte, na qual colocou-se 55µl de NaCl 3M e 1000µl Etanol a 100%. O DNA precipitado foi diluído em 50 a 100 µl de ddH₂O.

2.2.2- Amplificação *in vitro* do gene da citocromo *b*

O gene mitocondrial da citocromo *b* foi amplificado por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987), utilizando os seguintes iniciadores (*primers*): L14254 (5'-ATGACCCACCAACTACGAAAAT-3'), L14731 (5'-TCGTGCCATGAATTTGAG-3') e H14779 (5'-CGAATGGAAGGAGGAAGTG-3')

desenhados por Glenn *et al.* (2002); e H15982 ou ProR4 (5'-TCCCTRGCTTTGGTAGCCAGG-3'), publicado por Farias *et al.* (2002).

As reações de PCR foram feitas em um termociclador da marca *Thermo Hybaid*, para volume final de 25 μ l, contendo: 11,7 μ l de ddH₂O; 3 μ l de MgCl₂ (25mM); 2,5 μ l de dNTP (2,5 mM); 2,5 μ l de 10X Tampão (100mM Tris-HCl, 500mM KCl); 2 μ l de cada *primer* (2 μ M); 0,3 μ l de Taq DNA Polimerase (5 U/ μ l) e 1 μ l de DNA (entre 30 a 50 ng). As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação a 92°C por 35 segundos, anelamento a 55°C por 35 segundos, e extensão a 72°C por 1:30 minutos repetidos por 35 ciclos. Os sítios específicos de anelamento dos *primers* estão esquematizados na Fig. 08. Os fragmentos amplificados *in vitro* foram submetidos a uma corrida eletroforética a 100V em géis de agarose 1%. Nestes géis (Fig. 09) utilizou-se um marcador de peso molecular conhecido (*Ladder 1 Kb*) e 3 μ l de produto amplificado misturado com 2 μ l de corante azul de bromofenol, após esta etapa, os géis foram corados com brometo de etídio por 15 minutos e visualizados em um transiluminador de luz UV (*Image Master*) da *Pharmacia Biotech*. A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o uso do kit GFXTM PCR DNA Kit (*Amersham Bioscience*), seguindo-se o protocolo sugerido pelos fabricantes.



Figura 08- Detalhe do DNAmt mostrando as regiões de anelamento dos *primers*.

2.2.3- Sequenciamento do gene citocromo *b*

Os produtos finais das purificações foram utilizados nos PCRs de sequenciamento, estes foram feitos em placas contendo: 4 a 5 μ l de DNA amplificado (mais ou menos 30 ng); 2 μ l de cada *primers* (L14254, para o segmento inicial do gene e L14731, para o segmento interno do gene); 2 μ l de tampão Dig Dye e 2 μ l do mix ET (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems*), em um volume final de 10 μ l para cada amostra.

Os fragmentos de DNA resultantes destes PCRs foram precipitados, com o acréscimo de 1 μ l de acetado de amônio e 27,5 μ l de álcool 100% da Merk. Posteriormente, submeteu-se à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugou-se por 45 minutos. Após esta etapa, eliminou-se o álcool e lavou-se com álcool 70% da Merk, centrifugou-se por mais 15 minutos e a seguir eliminou-se o álcool por inversão da placa. Deixou-se secar totalmente em temperatura ambiente, para então ser ressuscitado em 10 μ l de tampão (*Loading buffer*).

Para a etapa de leitura das seqüências de DNA amplificadas e purificadas nas

etapas anteriores, foi utilizado um seqüenciador automático de capilar, *MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Bioscience)*.

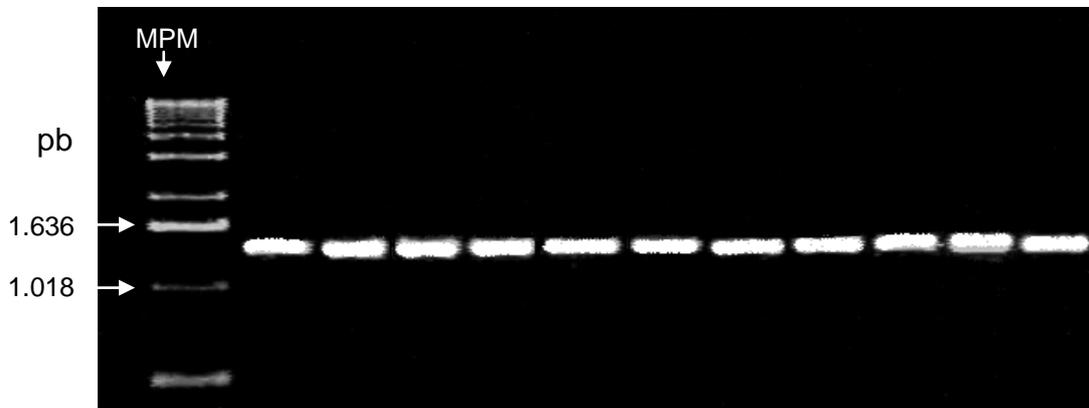


Figura 09- Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídio mostrando o fragmento do gene citocromo *b* amplificado de 5 indivíduos de *C. crocodilus* e 6 de *M. niger*. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado foi o *DNA Ladder 1 Kb*.

2.2.4- Alinhamento das seqüências nucleotídicas

As seqüências obtidas no sequenciador automático foram verificadas no *GenBank*, confirmando a homologia com as seqüências do gene citocromo *b* publicadas de *Alligator mississippiensis* (Nº de acesso AF318548-AF318557) (Glenn *et al.*, 2002), *Caiman crocodilus* e *Melanosuchus niger* gene citocromo *b* (Nº de acesso AY462456-AY462487) (Farias *et al.*, 2004) e genoma mitocondrial (Nº de acesso NC 002744) (Janke *et al.*, 2001).

As seqüências foram editadas no programa Bioedit (Hall, 1999) e, por se tratar de um gene conservado (citocromo *b*) e a pesquisa ser no nível intra-específico, os alinhamentos foram manuais. Não foram necessárias inserções de “*indels*” nas matrizes, para manter a homologia dos sítios entre os indivíduos.

A tradução das seqüências para aminoácidos foi feita no programa DnaSP 4.00

(Rozas *et al.*, 2003) com o objetivo de se verificar a existência ou não de códons de parada no interior do gene citocromo *b*. A ocorrência de códons de parada no meio de um gene pode indicar que, ao invés do gene mitocondrial alvo da pesquisa, um possível pseudogene pode estar sendo amplificado nas reações de PCR.

2.3 - MÉTODOS DE ANÁLISES INTRA-ESPECÍFICOS

2.3.1- Cladogramas de haplótipos e a inferência de eventos históricos

O segmento inicial e o segmento interno do gene foram sobrepostos e as seqüências foram unidas, formando o segmento parcial do citocromo *b* de cada indivíduo, gerando uma matriz de dados com 1.027 pb (pares de bases) nas seqüências de *M. niger* e 1.085 pb nas seqüências de *C. crocodilus*. Estas matrizes foram utilizadas para estimar cladogramas intra-específicos não enraizados de haplótipos, com o uso do critério da máxima parcimônia (95%), produzindo topologias que representam os agrupamentos (*clusters*) dos haplótipos. Este designe foi construído no programa TCS 1.18 (Clement *et al.*, 2000) um *software* que agrupa seqüências dentro de haplótipos (conjunto de seqüências nucleotídicas idênticas de um segmento de DNA, quando se trata de genoma haplóide), calcula a freqüência destes haplótipos nas populações amostradas e estima relações genealógicas entre elas, usando um algoritmo descrito por Templeton, Crandall e Sing (1992). Portanto, a árvore gênica é uma reconstrução evolutiva da história genealógica da variação genética encontrada em amostras de DNA que experimentaram pouca ou nenhuma recombinação (Templeton, 2001). Isto faz do DNAm, uma excelente ferramenta para se analisar possíveis eventos históricos envolvidos no padrão genético demográfico intra-específico.

Dentre as metodologias utilizadas para trabalhar estas questões genéticas históricas destaca-se a Análise Filogeográfica de Clados Agrupados (*Nested Clade Phylogeographical Analysis*, NCPA; Templeton, 2001 e 2004). Esta análise converte a árvore dos haplótipos em um agrupamento hierárquico de conexões agrupadas, ou clados, usando as regras descritas por Templeton *et al.* (1987) e Templeton e Sing (1993). Os agrupamentos hierárquicos formados forneceram informações utilizadas no programa GeoDis versão 2.0 (Posada *et al.*, 2000) para testar se existe alguma associação significativa entre os níveis dos cladogramas dos haplótipos e sua localização geográfica através de uma análise de contingência (Templeton e Sing, 1993). Nesta análise de contingência, a hipótese nula da não associação entre a divergência genética e a distância geográfica pode ser rejeitada devido a eventos não atuais, mas históricos.

Para esta análise de contingência, são necessárias medidas geográficas e testes de associações. Estas medidas geográficas são obtidas direto de uma matriz de distância em quilômetros, que no caso deste trabalho foram distâncias de rios, que são mais adequadas para a espécie em estudo, posto que se trata de animais aquáticos (veja Fetzner Jr. e Crandall, 2003). Os testes de associações incluem D_c e D_n (Templeton, 1995). O primeiro (D_c) é calculado a partir da distância de um clado X em relação ao centro geográfico de todos os haplótipos que são incluídos neste clado. O segundo (D_n) é a medida da distância de um clado agrupado X em relação a outro (Templeton, 1995). Além destes dois índices, o índice I-T, que correlaciona os haplótipos do interior (mais antigos) vs. os de ponta (mais jovens) também compõe a análise de NCPA (Templeton, 1995; Templeton, 2001).

2.3.2- Polimorfismo molecular em populações

A variabilidade genética em populações naturais têm sido de grande interesse para geneticistas de populações e evolucionistas. Diversidade gênica (h) é a probabilidade de duas seqüências, escolhidas aleatoriamente de uma população, serem diferentes (Li, 1997), esta medida de polimorfismo é equivalente ao nível de heterozigose esperada, quando se trata de marcador com herança co-dominante (dados diplóides).

O número de nucleotídeos diferentes por sítio entre seqüências escolhidas aleatoriamente define outro parâmetro de diversidade molecular, a diversidade nucleotídica (π), que é equivalente à diversidade gênica, mas no nível nucleotídico (Tajima, 1983; Nei 1987). Estas duas medidas de variabilidade genética foram estimadas no programa Arlequin 2.000 (Schneider *et al.*, 2000) e no programa DnaSP 4.00 (Rozas *et al.*, 2003). A frequência das mutações ao longo das seqüências foi verificada no programa DAMBE 4.2.13 (Xia e Xie, 2001).

2.3.3- Testes de neutralidade e equilíbrio genético

De acordo com a teoria neutra de mutações, a variação dentro e entre populações ocorre principalmente devido a mutações neutras (Li, 1997). Esta teoria prediz que a maioria das substituições de bases que se tornam fixadas em uma população é neutra com respeito ao sucesso reprodutivo (*fitness*) (Kimura, 1968; 1983).

Alguns testes desenvolvidos sob as premissas da teoria neutra são muito utilizados em genética de populações. O teste de neutralidade seletiva D de Tajima, por exemplo, se baseia no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (Kimura, 1969), apropriado para seqüências curtas de DNA. O modelo dos sítios infinitos assume que os sítios ao longo de uma seqüência de DNA sofrem mutações independentes e irregulares e que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é

infinitamente pequena (Epperson, 2003).

O teste D de Tajima calcula a diferença entre θ estimada do número de sítios segregantes (θ_S) e θ estimada da média da divergência das sequências par a par (θ_π). A estatística D de Tajima é definida como: $D = \theta_\pi - \theta_S / \sqrt{\text{var}(\theta_\pi - \theta_S)}$ (Tajima, 1989). Em condições de equilíbrio, a diferença entre as duas estimativas θ deve ser igual a zero, porque ambos os métodos para estimar θ devem ter o mesmo valor, se há desvios, o nível de significância deve ser testado por geração randômica de amostras sob a hipótese de neutralidade seletiva e equilíbrio populacional, usando um algoritmo de coalescência adaptado de Hudson (1990). Eventos como expansão populacional, efeito “gargalo de garrafa” ou heterogeneidade nas taxas de mutação podem gerar tais valores significativos (Tajima, 1993).

Outra estimativa desenvolvida para testar a neutralidade seletiva de mutações muito utilizada é o F_s de Fu (Fu, 1997), também baseado no modelo dos sítios infinitos sem recombinação. Este teste leva em consideração o fator temporal das mutações que geram sítios polimórficos, classificando-as como antigas e recentes. Este modelo é aplicável principalmente quando há excesso de mutações jovens (mutações que ocorreram recentemente, com baixa frequência e que geram excesso de alelos raros). Neste modelo, Fu determinou que $p(k/\theta)$ é a probabilidade de ter K alelos em uma amostragem de n seqüências, dado pelo valor de θ . Para uma amostragem de K_o (K observado) alelos se o número de diferentes nucleotídios entre duas seqüências for igual a θ_π , pode-se definir S' como a probabilidade de não ter menos alelos do que K_o em uma amostragem randômica em que $\theta = \pi$. Assim, $S' = p(K_o \leq K / \theta = \theta_\pi)$ e a estimativa F_s pode ser descrita como: $F_s = \ln(S'/1-S')$ (Fu, 1997). Fu (1997) notificou que a estatística F_s tende a apresentar valores negativos quando existe um excesso de alelos raros, fornecendo evidências contra a neutralidade de mutações. Contudo, existem muitos fatores ou forças naturais que possuem papel importante na evolução

de populações e é improvável que apenas um teste estatístico seja suficiente para detectar todos os tipos de forças evolutivas que podem afetar o padrão de polimorfismo. Dentre os testes existentes, o F_s é o mais poderoso para se detectar crescimento populacional (Fu, 1997) e por isto foi utilizado no presente trabalho.

2.3.4- Metodologias para detectar estrutura de população.

Padrões espaciais e temporais de variação genética em populações naturais fornecem informações importantes para a genética da conservação porque apontam estratégias de como maximizar a diversidade genética. Para se pesquisar tais padrões, há a necessidade de se conhecer modelos e estimativas de diferenciação genética, tais como as seguintes:

- Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) - é uma estimativa de estrutura genética populacional similar a outras abordagens que levam em conta a variação na frequência gênica, entretanto AMOVA considera o número de mutações entre os haplótipos. Excoffier *et al.* (1992) utilizaram o fato de que uma soma de qui-quadrado pode ser escrita como uma soma de diferenças de qui-quadrado (Li, 1976), e construíram esta análise hierárquica de variância molecular diretamente de uma matriz de distância de qui-quadrado entre todos os haplótipos. Os autores arranjaram um conjunto de N indivíduos de n populações em uma matriz de distância D , separados em uma série de submatrizes correspondendo às subdivisões, como exemplificado a seguir:

$$D = \begin{bmatrix} [D_{11}] & [D_{12}] & \dots & [D_{1n}] \\ [D_{21}] & [D_{22}] & \dots & [D_{2n}] \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ [D_{n1}] & [D_{n2}] & \dots & [D_{nn}] \end{bmatrix}$$

Neste caso, **D** contém as distâncias de qui-quadrado, que neste exemplo correspondem a três fontes de variação, como por exemplo: entre regiões; entre populações dentro de regiões; e entre indivíduos dentro de uma população. Assim, os indivíduos são agrupados em populações e populações são incluídas em grupos previamente definidos com base em critérios não genéticos, como geográficos, ecológicos, ambientais, linguagem, etc. No caso deste trabalho, utilizou-se distribuição geográfica para a montagem dos grupos hierárquicos utilizados no programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Desta forma, sob a hipótese nula, as amostras são consideradas como retiradas de uma população global, com variações devido à amostragem aleatória (Excoffier *et al.*, 1992). Os níveis hierárquicos dependem da hipótese levantada e a permutação dos haplótipos pode ser em três níveis, o primeiro é obtido com a permutação entre populações entre os grupos (F_{st}), o segundo entre populações dentro dos grupos (F_{sc}) e o terceiro entre grupos (F_{ct}).

Neste trabalho duas hipóteses foram testadas após detecção de diferenciação genética indicada por NCPA. A primeira foi dividir artificialmente as populações em dois grandes grupos, um contendo os rios de drenagens fora da bacia Amazônica e outro com as populações da bacia Amazônica. A segunda foi testar se as populações da bacia Amazônica apresentam diferenciação entre si, utilizando AMOVA em um único grupo, excluindo-se as populações do Amapá e da Guiana Francesa da análise.

■ F_{st} - constitui outra metodologia clássica muito utilizada como medida genética de diferenciação entre subgrupos de uma população (Epperson, 2003). Para quantificar o efeito do cruzamento parental (*inbreeding*) na subestrutura de população, Wright (1921) definiu o que veio a ser chamado “índice de fixação”. Este índice é igual à redução no grau de heterozigose esperada com cruzamentos aleatórios em qualquer

um dos níveis hierárquicos de uma população em relação a outro nível mais inclusivo da hierarquia (Epperson, 2003), o que define o modelo de ilhas inicialmente proposto por Wright (1931) (Fig. 10).

O índice F_{st} é freqüentemente relacionado ao número de migrantes por geração, através da fórmula $F_{st} = 1 / 4Nm+1$ para dados diplóides e para marcadores haplóides $F_{st} = 1/2Nm+1$.

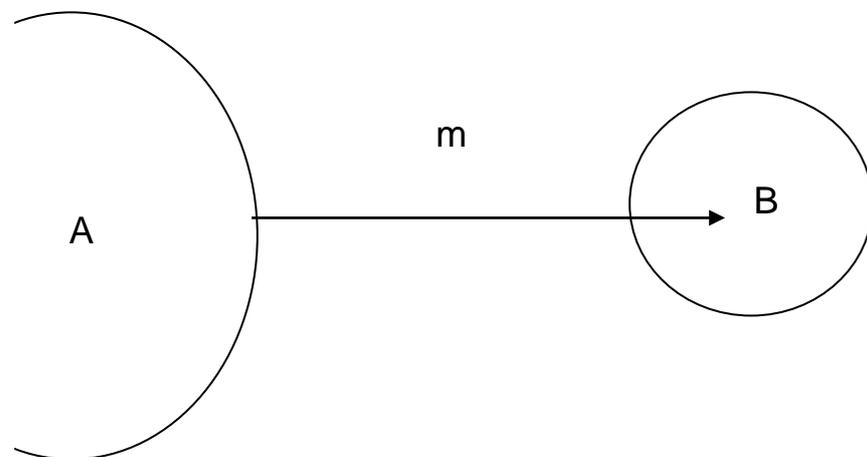


Figura 10 – Modelo de Ilha simples com o fluxo de migrantes da população principal (A) em direção a uma população previamente isolada (B). Quando o número de migrantes diminui, o valor do índice de fixação aumenta, e a população isolada torna-se mais homogênea geneticamente.

Onde N é o tamanho efetivo de população e m corresponde à taxa de migração entre populações.

Assim, a quantidade de migração é medida pelo parâmetro m , o qual é igual à probabilidade de um alelo escolhido aleatoriamente ser de um migrante (Epperson, 2003). O esquema a seguir (Fig. 11) mostra o modelo de n-ilhas, com migração entre todas as populações, as quais apresentam tamanhos iguais e migração simétrica.

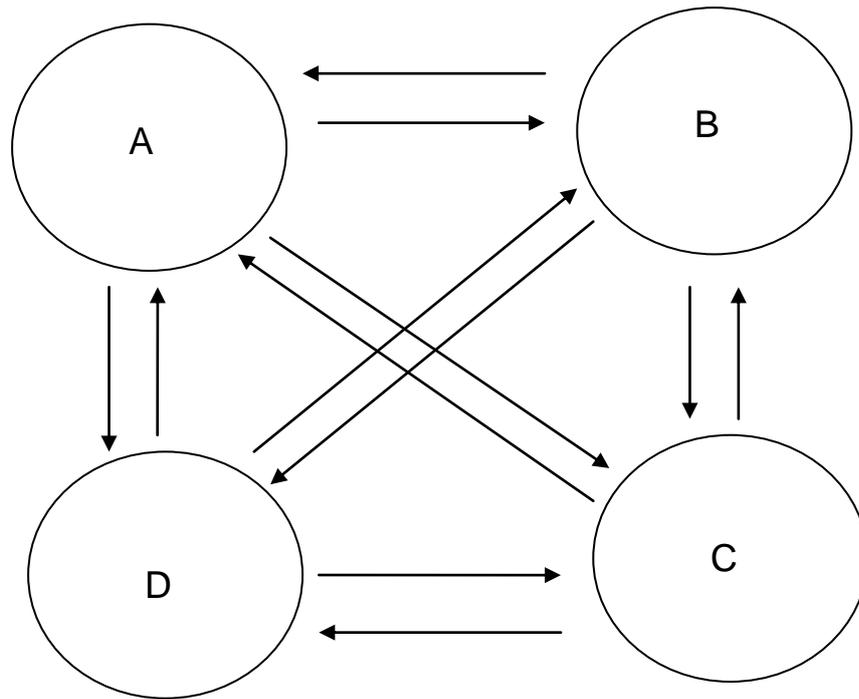


Figura 11- Esquema do modelo de n-ilhas, o qual utiliza dois parâmetros: tamanho efetivo de população (indicado pelo tamanho dos círculos) e taxa de migração por geração (indicado pelas setas).

Slatkin (1989) desenvolveu uma teoria para estimar parâmetros de fluxo gênico com base em observações de alelos raros. Slatkin e Barton (1989) também consideraram abordagens de máxima verossimilhança para este mesmo fim. Neste trabalho, os autores fizeram uma relação entre o modelo de ilhas para estimar o número efetivo de migrantes por geração (Nm), fornecendo informações sobre os padrões de fluxo gênico entre os pares de populações. Esta estimativa de fluxo gênico e a estimativa do F_{st} foram utilizadas neste trabalho com o uso de ferramentas implementadas no programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). O nível de significância para as comparações múltiplas foi verificado através da correção de Bonferroni (Rice, 1989).

■ Teste de Mantel – esta metodologia desenvolvida por Mantel (1967) é uma metodologia estatística geral que testa a significância da correlação entre duas matrizes de similaridade. Na área de genética de populações é usado para estimar a significância da correlação entre a distância genética (no caso deste trabalho, o índice

F_{st}) e uma distância espacial (neste caso uma matriz de distâncias geográficas aproximadas, seguindo o curso dos rios). Se Y é uma matriz de n x n medidas de distância genética, e X uma matriz de n x n medidas de distância geográfica, entre combinações (i, j) de n populações, o teste de Mantel (M) é a soma dos produtos de elementos X_{ij} e Y_{ij} , exceto para os elementos da diagonal $i=j$ (Epperson, 2003). Desta forma, por definição, $M = \sum X_{ij} Y_{ij}$. Para os elementos fora da diagonal, $SS_{(X)}$ é a soma de desvios de X_{ij} de X e $SS_{(Y)}$ é a soma dos desvios de Y_{ij} . O produto destas somas constitui o coeficiente de correlação do teste de Mantel, assim definido pela correlação entre duas matrizes: $r_{xy} = M - n_{xy} / \sqrt{SS_{(X)} \cdot SS_{(Y)}}$ (Smouse *et al.*, 1986).

Neste trabalho a hipótese de isolamento por distância foi testada via teste de Mantel (10.000 permutações), através de ferramentas disponíveis no software Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

3- RESULTADOS

3.1- *Caiman crocodilus*

Foram seqüenciados 1085 pares de base (pb) de 125 cópias gênicas obtidas de nove populações no norte da América do Sul. Foram encontrados 38 haplótipos (Tab. A em anexo), com um mais freqüente em relação aos demais (H1) (Tab. 1), que possui distribuição geográfica ampla e provavelmente constitui um haplótipo ancestral, segundo características descritas por Templeton, 1998. Este haplótipo se encontra em toda a bacia Amazônica, mas não foi detectado em populações amostradas nas drenagens do rio Uaçá e Approuague.

O conjunto de dados gerou 1043 sítios monomórficos e 42 sítios polimórficos. Dentre os sítios variáveis, 36 foram únicos e 6 foram informativos para parcimônia. A tradução gerou 361 códonos que foram convertidos em aminoácidos (cuja freqüência encontra-se na Fig. E em anexo) para se checar a ausência de stop códonos nas seqüências e ao mesmo tempo se confirmar a presença de um códon de parada incompleto no final do gene citocromo *b*, anteriormente relatado na literatura (Glenn *et al.*, 2002).

Tabela 01 - Frequência dos haplótipos do gene citocromo *b* em populações de *C. crocodilus*.

Haplótipos	Brasil							Peru	G.F.	Total
	RP	LJ	AA	LM	CT	ISM	RU	P-S	RA	
H1	15	5	4	3	18	12		6		63
H2								1		1
H3								1		1
H4						1				1
H5					1					1
H6				1						1
H7							1			1
H8							1			1
H9							3			3
H10				1						1
H11				2						2
H12			1							1
H13			1							1
H14			1							1
H15							3		6	9
H16							1			1
H17									1	1
H18									1	1
H19							1			1
H20		1								1
H21		2								2
H22		1								1
H23	1	1		1		5		5		13
H24				1						1
H25	1									1
H26		1								1
H27			2							2
H28			1							1
H29			1							1
H30				1						1
H31				1						1
H32				1						1
H33				1						1
H34					1					1
H35					1					1
H36						1				1
H37						1				1
H38									1	1
Total	17	11	11	13	21	20	10	13	9	125

Nota: G.F.= Guiana Francesa; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; AA= Arquipélago das Anavilhanas; LM= Lago Mamirauá; CT= Comunidade do Tapará; ISM= Ilha São Miguel; RU= Rio Uaçá; P-S= Pacaya-Samíria e RA= Rio Approuague.

As análises de NCPA encontraram dois níveis nos quais há a rejeição da hipótese nula da não associação entre distância geográfica e divergência genética, foram os clados 2-2 e 3-1, indicados na Fig. 12. O resultado da interpretação pela chave de inferência de Templeton (Templeton, 2004) indicou, para o nível 2-2, a ocorrência de eventos de expansão populacional, seguindo na interpretação, a chave de inferência indicou esquema de amostragem inadequado para diferenciar entre expansão, colonização a longa distância e fragmentação no passado. No nível mais elevado do cladograma, o 3-1, a chave indicou o mesmo evento do nível 2-2, como mostra a Tab. 02.

Tabela 02- Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em *C. crocodilus*, mostrando os valores das distâncias dos clados (D_c), distâncias dos clados agrupados (D_n) e distância dos clados interiores versus os de ponta (I-T). Apenas clados com permutações significantes (X^2) para estrutura geográfica constam nesta tabela.

Nível agrupado	Clados inclusos	Localização	D_c	D_n	Valores X^2 P	Conclusão da chave de Inferência	
2-2	1-3	Interior	769.8449 P^*	844.9258 P^*	0.000	TP – expansão contínua, longa distância de colonização ou fragmentação no passado	
	1-4	Ponta	0.0000	1702.9680 G^*			
	1-5	Ponta	0.0000	877.6818			
	1-6	Ponta	0.0000 P^*	624.8165			
	1-7	Ponta	0.0000 P^*	1720.4630 G^*			
	1-8	Ponta	1318.3851 G^*	1099.2298 G^*			BA – expansão contínua
	1-9	Ponta	0.0000	619.1364			
	1-10	Ponta	0.0000 P^*	661.6129 G^*			
	1-11	Ponta	0.0000	732.1364			
	I-T		174.4452	-256.6008 P^*			
	3-1	2-1	Ponta	0.0000			1510.8065
2-2		Ponta	939.3657 P^*	1036.6692 P^*			
1-2		Interior	107.3684 P^*	1622.9363 G^*			
I-T			-823.6101 P^*	582.0337 G^*			

Nota: Os valores significativamente menores ou maiores para D_c , D_n e I-T (D_c e D_n) estão indicados respectivamente por P (Pequeno) e G (Grande) e * indica o nível de significância $P < 0,05$. Os resultados foram interpretados utilizando a chave de inferências de Templeton (Templeton, 2004), onde TP indica Todas as Populações da análise e BA apenas as populações da Bacia Amazônica.

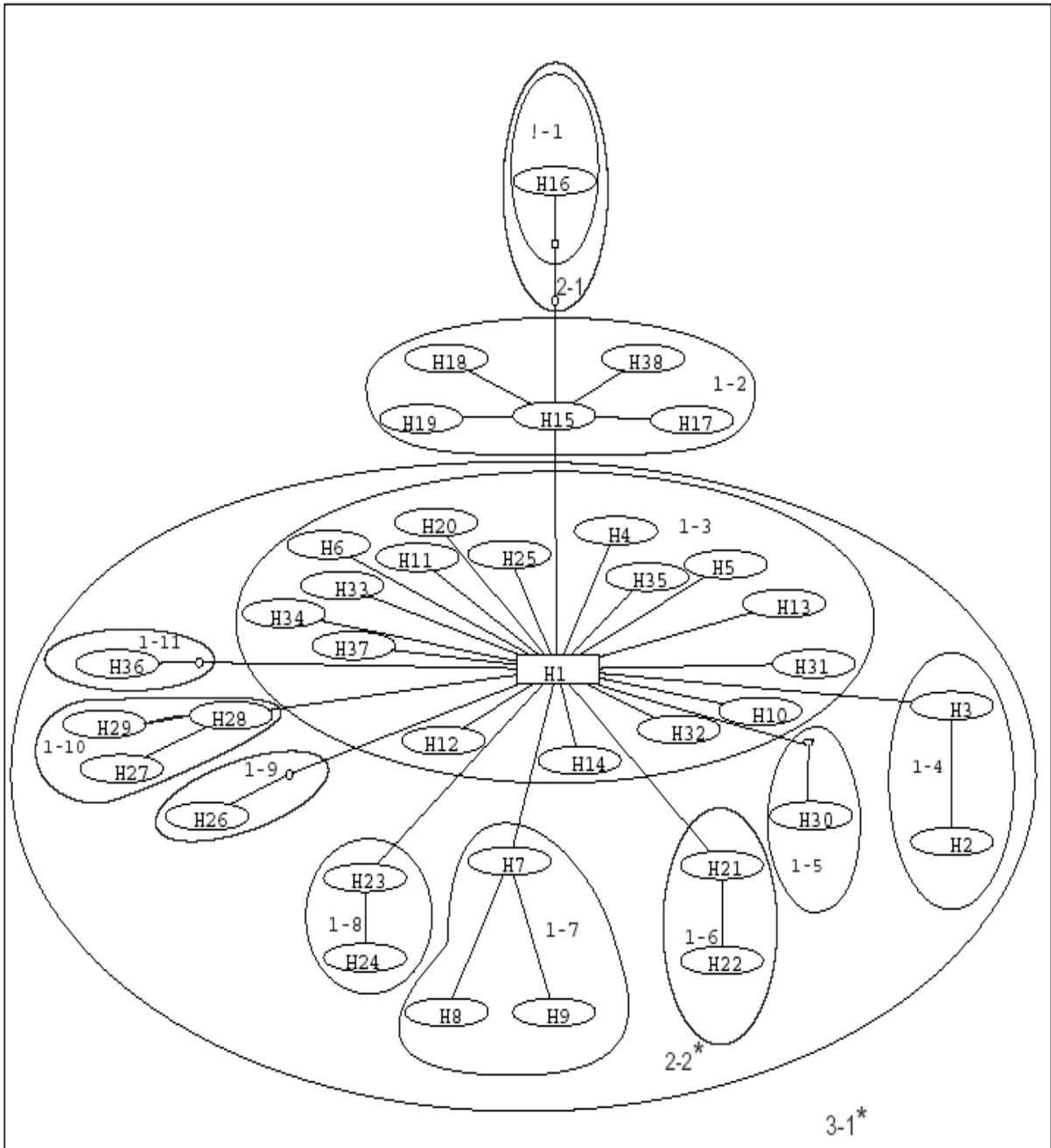


Figura 12- Cladograma dos 38 haplótipos de *C. crocodilus* detectados. Cada linha no cladograma representa uma mudança mutacional. Os círculos vazios representam os 5 haplótipos inferidos, mas não detectados. * Indica correlação significativa entre distância geográfica e divergência genética identificada nas permutações da NCPA.

Os valores dos testes de neutralidade seletiva de mutações de cada população e seus padrões de variabilidade genética intrapopulacionais podem ser verificados na

Tab. 03. Há elevados níveis de polimorfismo genético nas populações de *C. crocodilus*. O teste *D* de Tajima não mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações nas populações amostradas. Enquanto que o teste *F_s* de Fu apresentou valores significativos nas populações do arquipélago de Anavilhanas, lago Mamirauá e comunidade do Tapará.

Tabela 03- Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva, onde *N*= *N*^o amostral, *S*= *N*^o de sítios polimórficos, *h*= diversidade gênica, *π*= diversidade nucleotídica.

População	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>π</i>	Teste <i>D</i> de Tajima	Teste <i>F_s</i> de Fu
RP	17	2	0,228+/-0,129	0,0002+/-0,00029	-1,50358	-1,68032
LJ	11	6	0,800+/-0,114	0,0012+/-0,0009	-1,35867	-2,66235
AA	11	6	0,873+/-0,089	0,0014+/-0,00104	-0,93702	-3,70317*
LM	13	10	0,949+/-0,051	0,0016+/-0,0011	-1,76982	-7,84985*
CT	20	3	0,271+/-0,124	0,0002+/-0,0003	-1,72331	-2,74926*
ISM	20	5	0,600+/-0,101	0,0007+/-0,0006	-1,33438	-1,71119
RU	10	8	0,867+/-0,085	0,0023+/-0,0015	-0,38158	-1,18530
P-S	13	3	0,679+/-0,089	0,0008+/-0,0007	-0,05895	-0,62780
RA	10	3	0,583+/-0,183	0,0006+/-0,0005	-1,51297	-1,89165
Total	125 = 100%	3,871%	73,3+/-4,2%	0,116+/-0,01%	-2,56720*	-28,69603*

Nota: * indica o nível de significância $P < 0,0056$ (após correção de Bonferroni): AA= Arquipélago das Anavilhanas; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; RA=Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; P-S= Pacaya-Samíria; LM= Lago Mamirauá; CT= Comunidade do Tapará e ISM= Ilha São Miguel.

Testes de AMOVA hierárquica foram utilizados para detectar variação genética dentro e entre as populações, analisando primeiramente dois grupos geográficos, cuja diferenciação genética fora anteriormente identificada por NCPA, os da bacia Amazônica X os de drenagens fora da bacia Amazônica, com ligação ao oceano Atlântico (rio Uaçá e rio Approuague). Os resultados mostram que 35,30% da variação ocorreram entre estes grupos, 6,97% ocorreram entre as populações dentro destes grupos e 57,73% ocorreram dentro das populações. Uma porção significativa desta

variação foi devido a diferenças entre os grupos inter-regionais ($F_{ct} = 0,35302$; $P = 0,0234$). Nas análises de AMOVA contendo apenas um grupo, incluindo populações da bacia Amazônica, os seguintes valores foram encontrados: 8,39% da variação genética ocorreram entre as populações ($F_{st} = 0,0838$; $P = 0$) e 91,61% dentro das populações.

A hipótese do isolamento por distância foi testada através do teste de Mantel incluindo todas as populações amostradas. Os valores ($r = 0,464$; $P = 0,056$), indicam que não existe uma relação entre a variação genética e sua distribuição espacial ao longo das regiões pesquisadas. Mantendo apenas as sete populações da bacia Amazônica na análise, os valores do coeficiente de correlação do teste de mantel não foram significativos ($r = 0,1036$; $P = 0,344$). A estimativa do número efetivo de migrantes por geração entre as populações e os valores do índice de fixação (F_{st}) constam na Tab. 04, os quais foram utilizados para se construir uma filogenia de *Neighbor Joining* (Fig. 13).

Tabela 04- Matriz mostrando os valores de F_{st} das comparações entre os pares de populações de *C. crocodilus* usando o método da distância genética (abaixo da diagonal). E acima da diagonal encontram-se os números efetivos de migrantes por geração (Nm).

Populações	LJ	AA	LM	CT	ISM	RU	P-S	RA	
RP	-	5.3113	2,4972	20,3905	∞	13,0309	0,9608	2,6401	0,1873
LJ	0.0860	-	4,0000	16,2541	4,3075	6,7095	1,6876	4,3917	0,4983
AA	0.1668	0.1111	-	5,5869	2,3885	2,7013	1,5888	2,2512	0,5211
LM	0.0239	0.0298	0.0821	-	9,4655	38,7575	1,9501	14,1938	0,6681
CT	-0.0010	0.1040	0.1731	0.0501*	-	5,200	0,9052	1,8365	0,2019
ISM	0.0369	0.0693	0.1561*	0.0127	0.0877	-	1,1213	1,2256	0,3608
RU	0.3422*	0.2285*	0.2393*	0.2040*	0.3558*	0.3083*	-	1,2256	1,6788
P-S	0.1592	0.1022	0.1817	0.0340	0.2139*	0.0040	0.2897*	-	0,3679
RA	0.7274*	0.5008*	0.4896*	0.4280*	0.7122*	0.5808*	0.2294	0.5760*	-

Nota: RA= Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; CT= Comunidade do Tapará; ISM= Ilha São Miguel; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; LM= Lago Mamirauá; AA= Arquipélago das Anavilhanas e P-S= Pacaya-Samíria. * indica o nível de significância após a correção de Bonferroni ($P < 0,014$).

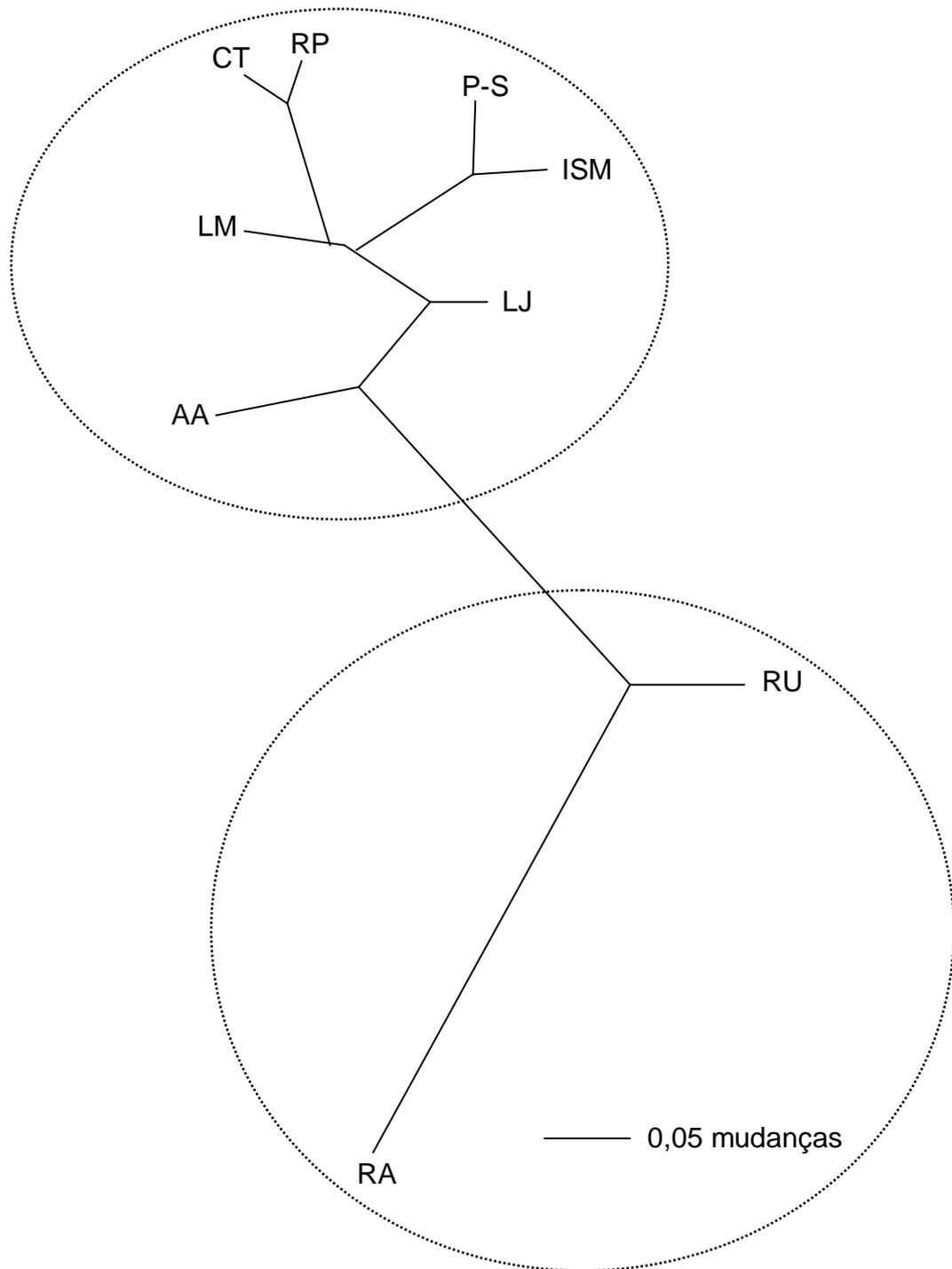


Figura 13- Árvore filogenética de *Neighbor Joining* sem raiz baseada nos valores de *pairwise* F_{st} das populações de *Caiman crocodilus*.
 Nota: RA= Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; CT= Comunidade do Tapará; ISM= Ilha São Miguel; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; LM= Lago Mimirauá; AA= Arquipélago das Anavilhanas e P-S= Pacaya-Samíria.

As duas populações de drenagens fora da bacia Amazônica, a do rio Approuague na Guiana Francesa e a do rio Uaçá no Amapá, extremo Norte do Brasil, apresentaram significativa estrutura genética em relação a todas as outras populações analisadas. A população da comunidade do Tapará também se apresenta geneticamente estruturada em relação à população do lago Mamirauá e dos rios Pacaya e Samíria, no Peru. A população coletada na ilha São Miguel também apresentou estrutura genética em relação à de Anavilhanas.

3.2- *Melanosuchus niger*

A matriz de dados contendo 132 cópias gênicas e um total de 1027 pb, oriundos de 11 populações no norte da América do Sul, apresentou 41 haplótipos diferentes (Tab. 05). Dois destes haplótipos (H1 e H2) foram mais freqüentes em relação aos demais, representando aproximadamente 60% de todo o conjunto haplotípico obtidos, constituindo os haplótipos de maior distribuição geográfica. Estes dois haplótipos são considerados os mais antigos e divergem por apenas uma mutação do tipo transição (C↔T) na posição 614 (Tab. B em anexo). Nenhum destes dois haplótipos foi detectado na população do rio Napo, no Equador.

As seqüências apresentaram 973 sítios monomórficos e 54 sítios polimórficos, dos quais 14 sítios foram informativos para parcimônia. Não houve sítios com três variações de bases nucleotídicas e a conversão em aminoácidos gerou 341 códonos. Não foram constatadas homoplasias na topologia do cladograma, uma vez que haplótipos com vias de origem alternativas não foram observados em nenhuma das duas espécies analisadas.

A identificação de correlação entre divergência genética e distância geográfica foi primeiramente analisada via NCPA, que apresentou índices significativos de D_c e D_n para os níveis 2-3 e 4-1 (Fig. 14; Tab. 06), nos quais não foi possível identificar nenhum evento histórico demográfico com o esquema de amostragem disponível neste trabalho.

Tabela 05 - Distribuição dos 41 haplótipos encontrados no fragmento de 1027 pb em *M. niger*.

Haplótipos	Populações											Total
	Brasil								Peru	Equador	G.F.	
	RU	CT	LJ	AA	RP	LM	RM	LT	P-S	RN	RA	
H1	2		4	10	4	7	1	6	3		3	40
H2	9	1	2	1	2	4		10			10	39
H3										11		11
H4				4								4
H5				1								1
H6											1	1
H7									1			1
H8									1			1
H9								1				1
H10	1											1
H11			1									1
H12					1							1
H13											1	1
H14											1	1
H15											1	1
H16											1	1
H17								1				1
H18						1						1
H19								1				1
H20	1											1
H21	1											1
H22	1											1
H23												1
H24	1										1	1
H25	1											1
H26	1											1
H27								1				1
H28								1				1
H29								1				1
H30								1				1
H31								1				1
H32								1				1
H33								1				1
H34				1								1
H35				1								1
H36					2							2
H37			1									1
H38									1			1
H39						1						1
H40				1								1
H41				1								1
Total	18	1	8	20	9	13	1	26	6	15	15	132

Nota: G.F.= Guiana Francesa; RU= Rio Uaçá; CT= Comunidade do Tapará; LJ= Lago Janauacá; AA= Arquipélago das Anavilhanas; RP= Rio Purus; LM= Lago Mamirauá; RM= Rio Madeira; LT= Lago Txipok; P-S= Pacaya-Samíria; RN= Rio Napo e RA= Rio Approuague.

Tabela 06- Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em *M. niger*, mostrando os valores das distâncias dos clados (D_c), distâncias dos clados agrupados (D_n) e distância dos clados interiores versus os de ponta (I-T). Apenas clados com permutações significativas (X^2) para estrutura geográfica constam nesta tabela.

Nível do Agrupamento	Clados inclusos	Localização	D_c	D_n	X^2 -P	Conclusão da Chave de Inferência
2-3	1-3	Interior	1239,569 ^{P*}	1419,7106 ^{P*}	0,000	EAI
	1-4	Interior I-T	0 ^{P*}	1808,5470 ^{G*}		
4-1	3-1	Ponta	1477,7989	1630,4527 ^{P*}	0,000	RNC
	3-2	Ponta I-T	859,970 ^{P*}	1422,3152 ^{P*}		

Nota: Os valores significativamente menores ou maiores para D_c , D_n e I-T (D_c e D_n) estão indicados respectivamente por P (Pequeno) e G (Grande) e * indica $P < 0,05$. Os resultados foram interpretados utilizando a chave de inferências de Templeton (Templeton, 2004), onde EAI significa Esquema de Amostragem Inadequado e RNC, Resultado Não Conclusivo.

Apesar de não conclusivos quanto à identificação de um possível evento histórico demográfico nas populações de *M. niger*, os resultados de NCPA forneceram informações a respeito da correlação significativa entre divergência genética e distribuição geográfica. Desta maneira, a formação dos grupos para as análises de AMOVA seguiu obedecendo tais resultados. Na primeira análise dois grupos foram artificialmente montados, um contendo as populações da bacia Amazônica e outro com as populações da drenagem fora da bacia Amazônica. Os resultados mostram que 16,40% da variação genética encontram-se entre os grupos ($F_{ct} = 0,163$; $P = 0,04$), enquanto que 13,24% encontram-se entre as populações dentro dos grupos ($F_{sc} = 0,158$; $P = 0$), entretanto a grande maioria da diversidade genética encontra-se mesmo no nível intrapopulacional (70,37%). Todas as análises de AMOVA deste trabalho foram baseadas em 1.023 permutações.

A segunda hipótese testada por AMOVA foi a da existência de uma única e grande população na bacia Amazônica. Para realizar este teste, as populações da Guiana Francesa e do Amapá foram excluídas. Então foi obtido que 25,93% da variância genética encontram-se entre as populações ($F_{st} = 0,259$; $P = 0$) e 74,07%

correspondem à variância intrapopulacional.

Entretanto, dentro da bacia Amazônica as permutações de NCPA apresentaram valores significativos entre os clados contendo haplótipos do Equador e os clados contendo haplótipos das demais populações do Peru e do Brasil. Desta forma, uma terceira análise de AMOVA foi feita, separando as populações da bacia Amazônica em dois grupos, o primeiro contendo as populações amostradas no Brasil e no Peru e o segundo contendo a população do rio Napo, no Equador. Os resultados mostram que 37,82% da variância genética ocorrem entre os grupos ($F_{ct} = 0,3782$; $P = 0,1749$), 4,55% ocorrem entre populações dentro dos grupos ($F_{sc} = 0,0731$; $P = 0,035$) e 57,63% da variância genética encontram-se dentro das populações.

A hipótese do isolamento por distância foi testada e constatou-se um valor significativo para o coeficiente de correlação ($r = 0,7728$; $P = 0,0003$), demonstrando que existe correlação entre a divergência genética anteriormente identificada por AMOVA e a distância geográfica em populações de *M. niger*. Retirando as populações do rio Uaçá e do rio Approuague e mantendo apenas as populações da bacia Amazônica os valores do teste de Mantel não continuaram significativos ($r = 0,6978$; $P = 0,02$). Retirando a população mais distanciada na distribuição dos pontos amostrados na bacia Amazônica, a do rio Napo, os valores não foram significativos ($r = 0,5929$; $P = 0,018$).

Os valores das comparações múltiplas entre os pares de populações através da estimativa do F_{st} (Tab. 07) foram utilizados para se construir uma árvore não enraizada com o objetivo de ilustrar a distância genética entre as populações (Fig. 15). Todas as comparações foram significantes quando envolveram a população do Equador (RN). A população do rio Approuague (RA), na Guiana Francesa, também se encontra estruturada (diferenciada) em relação às populações do arquipélago das Anavilhanas, do rio Purus e do lago Janauacá (Brasil), Pacaya-Samíria (Peru) e rio Napo (Equador),

após a correção de Bonferroni. As populações do rio Purus e Lago Janauacá encontram-se estruturadas em relação à população da Guiana Francesa (rio Approuague) apenas no nível de significância de 5%.

Os valores acima do nível de significância ($P > 0,014$) indicam que não existe forte estruturação genética entre as populações e que o número efetivo de migrantes (Nm) entre elas é (ou foi em um passado relativamente recente) suficiente para não haver diferenciação genética detectável no segmento do gene mitocondrial em estudo.

Tabela 07- Matriz de valores de *pairwise* F_{st} usando o método da distância (abaixo da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) entre os pares de populações (acima da diagonal) em populações de *M. niger*.

Populações	AA	RP	LJ	RA	RU	LT	P-S	LM	RN
AA	-	6,9613	9,984 6	1,7849	1,4898	2,1418	9,0285	4,7495	0,8233
RP	0,0670	-	∞	1,5340	1,8000	4,034 4	9,0000	27,8114	0,5062
LJ	0,0476	-0,0215	-	1,9140	2,2248	5,9356	12,8372	∞	0,5036
RA	0,2188*	0,2458*	0,2071	-	∞	∞	0,7110	4,2193	0,2871
RU	0,2512*	0,2173*	0,1834*	-0,0032	-	79,4831	1,0276	3,3861	0,3912
LT	0,1892*	0,1102*	0,0776	-0,0211	0,0062	-	2,0517	10,9352	0,5963
P-S	0,0524	0,0526	0,0374	0,4128*	0,3273*	0,1959*	-	3,1934	0,53187
LM	0,0952	0,017 6	-0,0307	0,1059	0,1286	0,0437	0,1353	-	0,4433
RN	0,3748*	0,4918*	0,4911*	0,6323*	0,5570*	0,4560*	0,4845*	0,5354*	-

Nota: * indica o nível de significância após a correção de Bonferroni ($P < 0,014$). AA= Arquipélago das Anavilhanas; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; RA= Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; LT= Lago Txipok; P-S= Pacaya-Samíria; LM= Lago Mamirauá; RN= Rio Napo.

Os índices elevados de diversidade gênica (h) em relação aos baixos valores de diversidade nucleotídica (π) encontrados em todas as populações de *C. crocodilus* são mostrados na Tab. 08. A estimativa da frequência e número de haplótipos entre indivíduos (h) varia de 0-1,0 e média de divergência entre as seqüências dos haplótipos varia entre 0 quando não há divergência até 10%, quando existem divergências muito profundas (Grant e Bowen, 1998).

Foram feitos dois testes de neutralidade seletiva de mutações, os quais apresentaram valores significativos. Para o índice D de Tajima, a população do lago Txipok apresentou significativa rejeição da hipótese da neutralidade seletiva. Enquanto que os valores do teste F_s de F_u foram significativos para as populações do lago Txipok e do rio Uaçá (Tab. 08).

Devido ao baixo número amostral (um indivíduo por localidade), os indivíduos do rio Madeira e do rio Amazonas (na comunidade do Tapará), não entraram nas análises populacionais, eles entraram nas filogeográficas de NCPA.

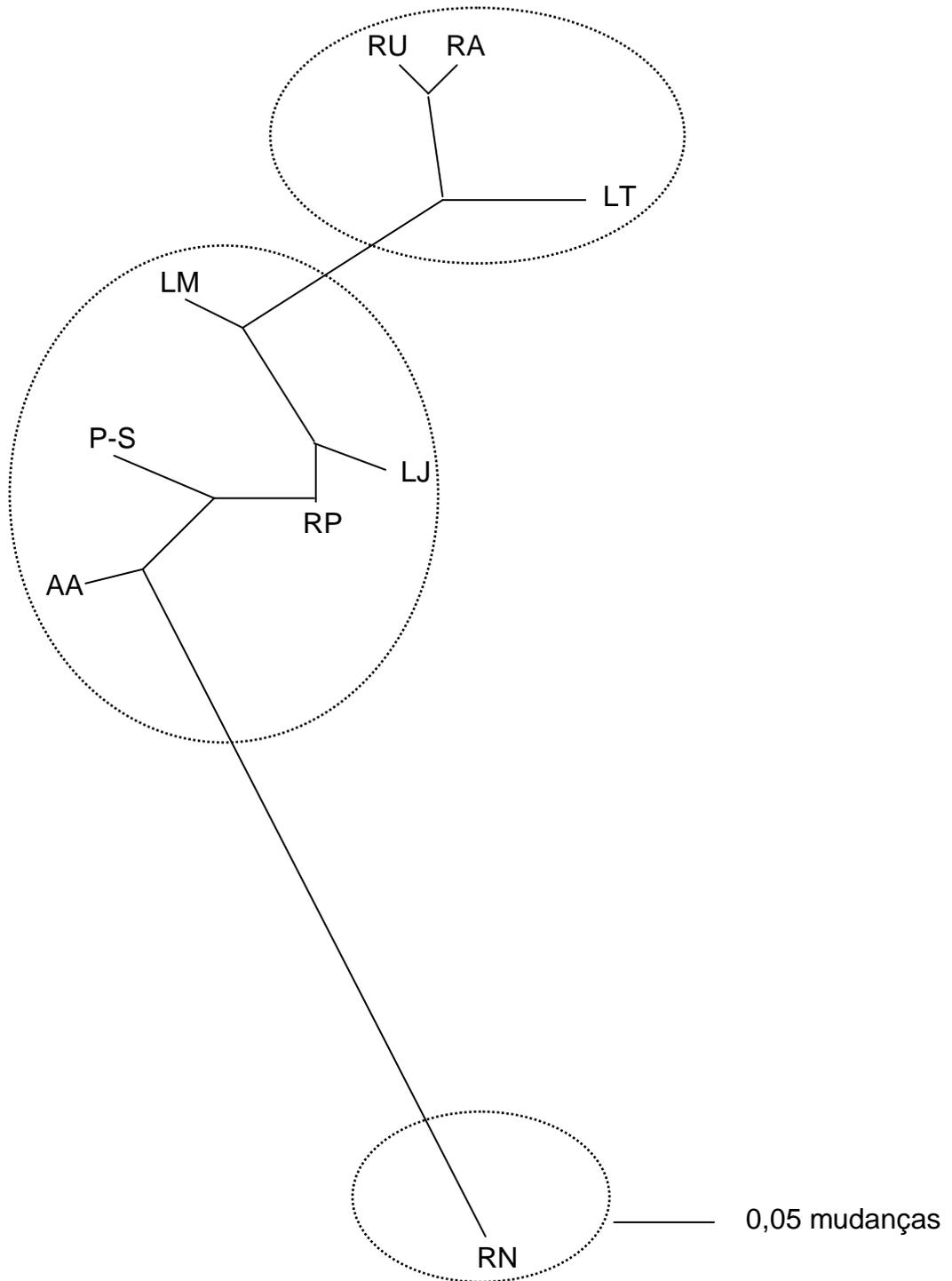


Figura 15- Árvore filogenética de *Neighbor Joining* sem raiz baseada nos valores de *pairwise* F_{st} das populações de *Melanosuchus niger*. Nota: AA= Arquipélago das Anavilhanas; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; RA= Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; LT= Lago Txipok; P-S= Pacaya-Samíria; LM= Lago Mamirauá; RN= Rio Napo.

Tabela. 08 - Sumário com os principais índices de diversidade genética populacional em *M. niger* e valores dos testes de neutralidade. Onde N= N° amostral, S= N° de sítios polimórficos, *h*= diversidade gênica, π = diversidade nucleotídica.

População	N	S	<i>h</i>	π	Teste <i>D</i> de Tajima	Teste <i>F_s</i> de Fu
AA	20	10	0,7316+/-0,0940	0,0022 +/- 0,0013	-0,728	-1,817
RP	9	3	0,7778+/-0,1100	0,0009 +/- 0,0008	-0,359	-1,038
LJ	8	3	0,7500+/-0,1391	0,0009 +/-0,0007	-0,812	-1,387
RA	15	3	0,5429+/-0,1327	0,0006 +/-0,0006	-0,763	-1,161
RU	18	10	0,7582+/-0,1056	0,0014 +/-0,0010	-1,755	-5,054*
LT	26	20	0,8154+/-0,0627	0,0020 +/-0,0013	-2,160*	-5,924*
P-S	6	3	0,8000+/-0,1721	0,0009 +/-0,0008	-1,233	-1,812
LM	13	3	0,6538+/-0,1060	0,0007 +/- 0,0006	-0,478	-0,940
RN	15	6	0,4762+/-0,1545	0,0009 +/- 0,0007	-1,766	-1,753
total	132	5,16%	82+/-2,4%	0,178+/-0,017%	-2,527*	-27,622*

Nota: * indica o nível de significância $P < 0,0056$ e AA= Arquipélago das Anavilhanas; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; RA= Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; LT= Lago Txipok; P-S= Pacaya-Samíria; LM= Lago Mamirauá; RN= Rio Napo.

4- DISCUSSÃO

4.1- *Caiman crocodilus*

4.1.1- Polimorfismo da região do citocromo *b* em *C. crocodilus* e testes de neutralidade

Trabalhos em genética populacional de crocodilianos são relativamente raros, principalmente utilizando DNAm. A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura utilizando como ferramenta algum segmento do DNAm enfocam problemas sistemáticos, enquanto que microssatélites são mais freqüentemente utilizados em estudos populacionais.

Os valores de h encontrados nas três populações de *C. crocodilus* analisadas por Farias *et al.* (2004) foram bem mais elevados ($h = 0.692$; 1142 pb) do que os encontrados em *Alligator mississippiensis* ($h = 0.153$; 1352 pb) (Glenn *et al.*, 2002). No presente trabalho o valor de diversidade haplotípica foi $h = 0.733$; 1085 pb. Em *Alligator mississippiensis* o valor de π foi de 0,017%, assim ambos h e π apresentaram baixos valores, o que indica um declínio populacional (*bottleneck*) recente (Glenn *et al.*, 2002). Contudo, em *C. crocodilus*, valores de h foram elevados em relação aos baixos valores de π ($\pi = 0,00106$). Este padrão de diversidade é atribuído a expansão populacional após um período de baixo tamanho efetivo de população (número de indivíduos em intercruzamento) (Gran e Bowen 1998; Avise, 2000), considerando que um rápido crescimento promove a retenção de novas mutações (Avise, 1984).

Este crescimento populacional se reflete no grande número de haplótipos únicos observados, que propiciou a rejeição da hipótese neutra do equilíbrio genético. Entretanto, o teste D de Tajima não identificou crescimento populacional após a

correção de Bonferroni. A diferença entre o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças entre os nucleotídeos de uma amostragem de DNA (teste D de Tajima) revelou que a hipótese de crescimento populacional poderia ser rejeitada para as populações amostradas de *C. crocodilus*, mas não para todas as populações quando analisadas como um todo.

O teste F_s de F_u , que possui propriedades estatísticas para detectar excesso de alelos raros foi significativamente negativo para três populações analisadas: a do arquipélago de Anavilhanas, do lago Mamirauá e da comunidade do Tapará. Este teste foi feito neste trabalho porque é o mais promissor para detectar crescimento populacional, e o fez para três das nove populações pesquisadas. Juntando as seqüências em uma única população de *C. crocodilus* os valores dos testes D de Tajima e F_s de F_u foram significativamente negativos, mostrando que pode estar havendo um crescimento populacional destes animais ao longo da Amazônia.

4.1.2- Análise Filogeográfica do Agrupamento de Clados (ou NCPA) e estrutura genética entre populações de *C. crocodilus*

Padrões demográficos históricos envolvidos na dinâmica populacional de jacaré-tinga foram identificados e interpretados por NCPA. Em Farias *et al.* (2004), três populações (rio Purus, lago Janauacá e rio Approuague) foram analisadas e não obtiveram resolução estatística suficiente para diferenciar entre isolamento por distância, fragmentação histórica ou expansão. Enquanto que entre as duas populações amostradas da bacia Amazônica (rio Purus e lago Janauacá) não apresentaram valores significativos para rejeitar a hipótese nula da não correlação entre variação genética e distribuição geográfica. No presente trabalho, as populações coletadas nas drenagens da bacia Amazônica (nível 2-2 e 3-1 do cladograma),

apresentaram valores significativos de D_c e D_n , os quais foram interpretados pela chave de inferência de Templeton (Templeton, 2004) indicando que o esquema de amostragem inadequado para diferenciar entre expansão, colonização a longa distância e fragmentação no passado.

Quando uma mutação ocorre e cria um novo haplótipo, este novo haplótipo reside inicialmente dentro da distribuição geográfica de seu haplótipo ancestral, entretanto, se há fluxo gênico restrito, resultante do movimento limitado de indivíduos ou por qualquer fenômeno de vicariância, este haplótipo novo ficará por mais tempo restrito a apenas uma área geográfica (Templeton, 1998). Quando apenas os clados da bacia Amazônica foram analisados, a inferência ao nível 2-2 foi expansão populacional. Este resultado condiz com o crescimento populacional de Caimans na Amazônia brasileira. Entretanto, nosso esquema de amostragem foi insuficiente para diferenciar entre expansão, colonização a longa distância ou fragmentação no passado, quando todas as populações foram analisadas.

A correlação espacial da variação genética detectada por NCPA ganhou novos argumentos com os resultados de AMOVA. Tais resultados corroboraram que existe subdivisão genética entre populações de *C. crocodylus* da bacia Amazônica em relação às populações do Amapá e da Guiana Francesa (drenagens do Atlântico). Esta hipótese já havia sido afirmada anteriormente em Farias *et al.* (2004), e no presente trabalho a ampliação da amostragem e a inclusão de populações do Estado do Amapá e do Pará confirmaram este padrão, dando mais consistência a estes resultados. Esta subdivisão genética foi detectada por dois diferentes testes, AMOVA e F_{st} . Existem duas hipóteses que podem explicar tal padrão. A primeira inclui um panorama de vicariância, uma vez que os sistemas de drenagens onde habitam as duas populações são os únicos na amostragem que não tem conexão com a bacia Amazônica, possuem conexão com o oceano Atlântico. Os membros modernos da família Alligatoridae são

menos tolerantes ao sal do que outros crocodilianos porque eles não possuem glândula lingual de excreção de sal e complexo renal-cloacal adaptado para excreção de sal e conservação de água (Taplin e Grigg, 1989). Por esta razão, água salgada têm sido vista como uma maior barreira para dispersão de Alligatoridae do que de Gavialidae e Crocodylidae (Brochu, 2001). A segunda hipótese é a do isolamento por distância, identificado nos valores significativos do teste de Mantel. O rio Uaçá dista da comunidade do Tapará em $\cong 1220$ Km, dos quais $\cong 450$ km são via oceano Atlântico. Estes dois fatores, fisiológicos e geográficos não são mutuamente exclusivos, podendo estar combinados com a fragmentação no passado indicada por NCPA, produzindo o padrão atual de diferenciação genética.

Fazendo uma correlação temporal na genealogia obtida de *C. crocodilus*, foi observado que o haplótipo mais freqüente, mais amplamente distribuído e, provavelmente, mais ancestral, não ocorre no rio Uaçá e no rio Approuague. Assim, é possível inferir que a diferenciação genética (talvez por dispersão, ou por qualquer outro fenômeno) ocorreu no sentido da bacia Amazônica para as drenagens dos rios Uaçá e Approuague, uma vez que, no passado, as populações ancestrais destas populações atuais encontravam-se em uma única população (de acordo com a teoria da coalescência).

Quando apenas as populações coletadas nas drenagens da bacia Amazônica foram analisadas, através de AMOVA, encontrou-se que grande parte da variação genética encontra-se dentro das populações. Entretanto, o valor de F_{st} foi significativo entre algumas populações, indicando que a hipótese nula da panmixia, nestes casos, poderia ser rejeitada. A população da comunidade do Tapará, em Santarém, apresentou valores de F_{st} significativos quando comparada com as populações do lago Mamirauá e Pacaya-Samiria, que foram as duas populações mais à oeste da amostragem, distando da comunidade do Tapará cerca de 1250 Km e 2300 Km,

respectivamente. Neste caso, isolamento por distância poderia ser rejeitado como um fator em potencial para explicar tal padrão, uma vez que os valores significativos do teste de Mantel foram obtidos apenas quando as populações da Guiana Francesa e do estado do Amapá foram incluídas. Quando estas foram excluídas da análise, permanecendo apenas as populações da bacia Amazônica, não houve nenhum indício de correlação geográfica sugerido. Assim outras forças evolutivas podem estar atuando nesta diferenciação genética.

A população da ilha São Miguel-Pará, tipo de água branca (rio Amazonas), também se mostrou estruturada geneticamente em relação à população do arquipélago das Anavilhanas, tipo de água preta (rio Negro) (Sioli, 1984). Anavilhanas constitui o único local amostrado em água preta e se apresentou também fracamente estruturada em relação à população do lago Janauacá e do rio Purus, que são relativamente próximas geograficamente. Esta diferenciação genética pode ser resultado de adaptações às condições ambientais, tais como pH, densidade, dentre outros parâmetros físico-químicos da água, que são diferentes nos diferentes tipos de água da Amazônia (Sioli, 1984).

4.2 – *Melanosuchus niger*

4.2.1 - Diversidade genética e neutralidade de mutações em *M. niger*

Estudos em genética populacional de crocodilianos com base em microssatélites de DNA mostraram elevados índices de diversidade genética em *Crocodyllus moreletii* (Dever *et al.*, 2002) e no crocodilo *Osteolaemus tetrapis* (Ray *et al.*, 2000). Entretanto, em estudos com DNAmT em *Alligator mississippiensis*, Glenn *et al.* (2002) obtiveram apenas quatro haplótipos, analisando 25 indivíduos no litoral dos Estados Unidos, e concluíram que as populações de *A. mississippiensis* passaram por um *bottleneck* histórico. Estes autores sugeriram que o aumento do número amostral revelaria haplótipos raros dando mais consistência aos padrões genéticos encontrados. Entretanto, a hipótese de *bottleneck* (“efeito gargalo de garrafa”) não foi corroborada em estudos com populações de *Crocodyllus moreletii* (Dever *et al.*, 2002); os autores não encontraram redução na diversidade genética estudando nove *loci* microssatélites em Belize durante os anos 1940 a 1960. No presente trabalho, índices elevados de diversidade genética foram encontrados em populações de *M. niger*, quando comparados com os de outros crocodilianos anteriormente estudados e são semelhantes aos resultados de Dever *et al.* (2002) para *Crocodyllus moreletii* e Farias *et al.* (2004) para *C. crocodilus* e *M. niger*. Estes padrões de polimorfismo foram muito similares aos encontrados em populações de *C. crocodilus* deste trabalho: elevada diversidade gênica e baixa diversidade nucleotídica.

Em estudos com organismos planctônicos amplamente distribuídos pelo planeta, Grant e Bowen (1998) pesquisaram o que padrões de diversidade genética poderiam nos informar a respeito da demografia histórica e da divergência genética superficial em populações. Althoff e Pellmyr (2002) expandiram as interpretações de Grant e

Bowen (1998) para o inseto *Prodoxus decipiens*. No presente trabalho, o padrão encontrado de diversidade genética foi semelhante para as duas espécies analisadas, as quais se apresentaram dentro da segunda categoria, que consiste de pequenos valores de π e elevados valores de h . Esta categoria é consistente com uma recente redução populacional seguida por rápido crescimento e acúmulo de mutações (Grant e Bowen, 1998).

A rejeição da hipótese neutra do equilíbrio genético reforça os argumentos do parágrafo anterior fornecendo uma perspectiva freqüentemente observada em populações que estão passando ou passaram recentemente por um crescimento populacional. O teste D de Tajima mostrou valores significativos apenas na população do lago Txipok. Enquanto que as populações do lago Janauacá e do rio Uaçá, apresentaram valores significativos para o teste F_s de Fu.

Todas as populações juntas mostram valores de diversidade genética elevada, baixos valores de diversidade nucleotídica e significativos desvios da expectativa neutra das mutações. Com estes padrões genéticos é possível afirmar que o aumento das populações naturais de *M. niger* e o acúmulo de novas mutações geraram haplótipos raros, com distribuição geográfica restrita, o que provavelmente elevou os índices de diversidade gênica.

4.2.2 – Análise Filogeográfica de Clados Agrupados ou NCPA e estrutura genética entre populações de *M. niger*

Nas análises dos clados agrupados apenas dois níveis apresentaram índices estatisticamente significativos, o 2-3 e o 4-1. No nível 2-3 do agrupamento a hipótese nula da não associação entre a genealogia e a geografia foi rejeitada, porém o resultado não conclusivo apenas nos fornece a confirmação que a divergência genética

desta espécie obedece a um padrão espacial de distribuição. Vale lembrar que no nível 2-3 encontram-se haplótipos oriundos da bacia Amazônica e que a diferenciação genética identificada via NCPA ocorre entre a população do rio Napo e as outras mais a leste. O clado 4-1, que incluiu todas as populações amostradas, apresentou resultados que também não foram conclusivos para o esquema de amostragem disponível no escopo deste trabalho. Assim, NCPA indicou correlações entre divergência genética e distância geográfica no nível mais elevado (4-1) do agrupamento, o qual inclui todas as populações analisadas, e entre os cladogramas 1-3 e 1-4, neste último encontram-se apenas haplótipos da população do rio Napo.

Os resultados de AMOVA indicaram que existe variação significativa entre bacia Amazônica X drenagens não interligadas à bacia Amazônica, embora os valores de F_{st} indiquem fraca diferenciação. A população do rio Approuague, na Guiana Francesa, apresenta-se geneticamente mais próxima das duas populações do Estado do Amapá-Brasil (rio Uaçá e lago Txipok), que também são provenientes de drenagens não ligadas à bacia Amazônica. O fato de que os membros da família Alligatoridae não possuem adaptações para sobreviver em ambientes de água salgada pode ter sido fundamental para o isolamento genético parcial destas populações. F_{st} e AMOVA indicaram uma diferenciação genética entre a população do rio Napo e as demais da bacia Amazônica. Esta diferenciação pode estar relacionada ao isolamento por distância, uma vez que os índices de correlação do teste de Mantel foram significativos dentro da bacia Amazônica.

O índice de fixação (F_{st}) identificou que a população do Equador (rio Napo) está diferenciada das demais e o isolamento por distância pode ser um fator importante para explicar este padrão. Por outro lado, a distância geográfica da amostragem do Equador não é tão grande em relação ao Peru e a Mamirauá-Tefé, contudo há diferenças na composição nucleotídica entre estas duas populações e a

população do Equador, que constitui uma subpopulação diferenciada geneticamente. Para identificar um possível evento histórico demográfico envolvido nesta diferenciação genética da população do rio Napo, novas amostragens seguindo o curso do rio Solimões no Peru, seguindo até o Equador seriam fundamentais. Os dados apenas revelam que o rio Napo abriga uma subpopulação diferenciada de todas as outras amostradas.

A estrutura genética destas populações pode ser explicada também pelo fato de que se trata de uma espécie mais seletiva quanto ao uso do habitat e com dispersão relativamente baixa. Alguns dados de fragmentação genética semelhantes aos encontrados neste trabalho foram previamente identificadas em populações de *M. niger* por Farias *et al.* (2004), os quais foram corroborados pelo presente estudo.

4.3 – BENEFÍCIOS PARA A TOMADA DE DECISÕES QUANTO AO MANEJO E A CONSERVAÇÃO DE CROCODILIANOS AMAZÔNICOS

Apesar da caça comercial de crocodilianos ainda persistir no Brasil, esta se tornou menos evidente pela falta de mercado para as peles, que atualmente terminam rejeitadas na maioria das vezes. Apenas a carne é aproveitada para alimentação ou para servir de isca na pesca de peixes necrófagos, como ocorre no alto Solimões (Da Silveira, *observação pessoal*).

O aumento da população humana na Amazônia tem trazido muitas consequências para a fauna local, principalmente através da perda ou fragmentação de habitats e sobre-exploração. Contudo, estes impactos diminuíram com a criação da lei de proteção à fauna silvestre do Brasil (Lei N° 5.197/67) na década de 60, época em que o jacaré-açú estava na lista de animais em perigo de extinção. Atualmente, consta na categoria baixo risco, mas dependente de conservação táxon-específico ou habitat-

específico (IUCN). Nossos dados corroboram este *status*.

Os crocodilianos em geral não são animais bem vindos pelas populações humanas, associa-se a eles o papel de fera perigosa e as pessoas preferem vê-los mortos e o fazem muitas vezes por questão de defesa. Entretanto, vale ressaltar, que eles fazem parte de um sistema ecológico integrado, como consumidores de topo de cadeia, portanto, são importantes para o equilíbrio dinâmico da biota regional, além da importância econômica a eles atribuída.

Em algumas regiões, as populações de jacaré-açú continuam restritas a alguns indivíduos, em outras se argumenta que ocorre alta densidade populacional, como na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, local em que um plano de manejo para crocodilianos está em vias de execução. Apesar de se relatarem muitos indivíduos em Mamirauá, os índices genéticos não demonstram qualquer desequilíbrio com relação aos haplótipos do DNAmT em *M. niger*. Os testes *D* de Tajima e *F_s* de Fu não detectaram valores significativos que demonstrem desvio das expectativas neutras de mutações para as populações de Mamirauá e da Guiana Francesa, as quais apresentaram baixos índices de polimorfismo genético. No caso específico de Mamirauá, estes resultados podem ser artifício de amostragem, uma vez que as coletas foram feitas em apenas um lago, o que torna a possibilidade de estarmos coletando indivíduos aparentados não rejeitável.

No caso de *C. crocodilus*, a população da Terra Indígena Uaçá, no extremo Norte do Brasil, apresenta-se bem menor do que a população de *M. niger* (Ruffeil, 2004). O autor sustenta, com base em poucas informações disponíveis (45 jacarés abatidos no período da seca), que a caça de subsistência praticada pelos indígenas é a principal causa da baixa densidade de *C. crocodilus* naquela região. Os indígenas não apreciam a carne de *M. niger* (Ruffeil, 2004), o que explica a diferença nos valores de diversidade genética e expansão populacional de *C. crocodilus* em relação a *M.*

niger encontrados neste trabalho. Os resultados aqui apresentados indicam que planos de translocação de indivíduos de *C. crocodilus* da bacia Amazônica para os rios do extremo Norte do Brasil (Amapá) não seria uma boa estratégia para conservar as populações naturais daquela região. O que, infelizmente, constitui um problema. O mesmo vale para *M. niger*, porém neste caso, não há, ainda, necessidade de se cogitar tal prática, uma vez que as populações de *M. niger* daquele local não se encontram em situação de risco.

Dentro da bacia Amazônica os planos de manejo podem ser cogitados mantendo pontos estratégicos para o uso do recurso, com a possibilidade de se agir de maneira itinerante, ou mesmo em um único local, translocando matrizes pertencentes a drenagens próximas, respeitando o grau de similaridade genética entre as populações.

Com base nestes resultados pode-se inferir que, no geral, as populações de *C. crocodilus* e *M. niger* da Amazônia estão atualmente se recuperando e que ambas as espécies apresentam padrões evolutivos muito semelhantes quanto ao gene mitocondrial citocromo *b*. Isto pode ser relevante na tomada de decisões sobre o manejo e a conservação deste recurso, quando o objetivo de um planejamento estratégico, sob o argumento do desenvolvimento sustentável, for a utilização do recurso de maneira a conservá-lo com o intuito de manter as relações ecológicas e evolutivas naturais de ecossistemas aquáticos amazônicos.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Althoff, D. M., and Pellmur, O. 2002. Examining genetic structure in a bogus yucca moth: a sequential approach to phylogeography. *Evolution* 56: 1632-1613.
- Avise, J.C.; Neigel, J.E.; Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J. Mol. Evol.*, (20): 99-105.
- Avise, J.C.; Helfman, G.S.; Saunders, N.C.; Stanton, L.H. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in north atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (83): 4350-4354.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, M. A: *Harvad University Press*.
- Ballard, J. W. O.; Whitlock, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13, 729-744.
- Berg, D.J.; Guttman, S.I.; Cantonwine, E.G. 1996. Geographic variation in unionid genetic structure: Do management unit exist? *J. Shellfish Res.* 15:484.
- Brazaitis, P.; Rebêlo, G.H.; Yamashita, C. 1996. The status of *Caiman crocodilus crocodilus* and *Melanosuchus Níger* populations in the Amazonian regions of Brazil. *The Wildlife Conservation Society*, 830 Fith Ave., New York, NY 1002, USA.
- Brisbin, I. L. 1988. *Growth curve analyses and their application to the conservation and captive management of crocodilians*. P. 116-145. In: Proceeding of the Nith Working Meeting of the IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. F. W. King (Ed). IUCN, Gland, Swtzerland.
- Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, (18) 225-239.
- Brochu, C.A. 2001. Congruence between physiology, phylogenetics, and the fossil

- record on crocodylian historical biogeography. pp. 9-28 in G. Grigg, F. Seebacher and C.E. Franklin (eds.), *Crocodylian Biology and Evolution*, Surrey Beatty and Sons, Sydney.
- Bocourt, F. 1976. Note sur quelques reptiles de l'Isthme de Tehuantepec (Mexique) donnees par M. Sumichrast au museum. *Journal de Zoologie*. Paris. 5(5-6): 386-411.
- Busack, S.; Pandya S. 2001. Geographic variation in *Caiman crocodilus* and *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae): systematic and legal implications. *Herpetologica* 57(3):294-312.
- Carvalho, A. L. 1951. Os Jacarés do Brasil. *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro*, 42: 127-152.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K. A. 2000 TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Crandall, K. A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Mace, G.M.; Wayne, R.K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree*, 15 -7.
- Cockerham, C.C.; Weir, B.S. 1993. Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution*, 47, 855-863.
- Cope, E.D. 1868. On the Crocodylian Genus Perosuchus. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Pennsylvania* 1868: 203.
- Da Silveira, R.; Thorbjarnarson, J. 1999. Conservation Implications of Commercial Hunting of Black and Spectacled Caiman in the Mamiraua Sustainable Development Reserve, Brazil. *Biological Conservation*, Estados Unidos, v. 88, p. 103-109.
- Davis, L.M.; Glenn, T.C.; Strickland, D.C.; Guillette, L.J.; Elsey, R.M.; Rhodes, W.E.; Dessauer, H.C.; Sawyer, R.H. 2002. Microsatellite DNA analysis support an east-west phylogeographic split of American alligator population. *J. Exp. Zool.*, 294, 352-372.

- Daudin, F.M. 1802. *Histoire Naturelle, Generale et Particuliere des Reptiles*. Paris.
[cited in Mook and Mook 1940].
- Dessauer, H. C.; Glenn, T.C.; Densmore, L.D. 2002. Studies on the Molecular Evolution of the Crocodylia: Footprints in the Sand of Time. *Mol. Dev. Evol.* 294:302-311.
- Dever, J.A.; Straus, R.E.; Rainswater, T.R.; McMurry, S.T.; Densmore, L.D. 2002. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central América. *Copeia*, pp 1078-1091.
- Epperson, B.K. 1995. Spatial structure of two-locus genotypes under isolation by distance. *Genetics* 140: 365-375.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial 22 DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491. 23.
- Farias, I.P.; Hrbek, T.; Da Silveira, R.; Monjeló, L.A.S.; Thoisy, B.; Thorbjarnarson, J. 2002. *Population genetic structure of Amazonian Crocodilians: preliminary results*. In: 16th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, 2002, Gainesville.
- Farias, I.P.; Da Silveira, R.; Thoisy, B.; Monjeló, L.A.S.; Thorbjarnarson, J.; Hrbek, T. 2004. Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodilians. *Animal Conservation* 7, 265-272.
- Ferguson, M.W. J. 1985. The reproductive biology and embryology of crocodilians. Pp. 329-491. In: C. Gans, F. S. Billet and P. F. A. Maderson (Eds), *Biology of the Reptilia*, vol. 14: Development A. Jonh Wiley and Sons, New York, New York.
- Fetzner, J. W., Jr.; Crandall, K. A. 2003. Linear habitats and the nested clade analysis: An empirical evaluation of geographic vs. river distances using an Ozark crayfish (Decapoda: Cambaridae). *Evolution*. 57(9):2101-2118

- Fittkau, E.J.1970. Role of caimans of the nutrient regime of mouth-lake of Amazon affluents *Biotropical*. 2:138-142.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. *Cambridge University Press*.
- Fu, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447: 915-925.
- Gatesy, J., DeSalle, R.; Wheeler, W. 1993. Alignment-ambiguous nucleotide sites and the exclusion of systematic data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2(2): 152-157.
- Gatesy, J.; Amato, G.; Norell, M.; DeSalle, R.; Hayashi, C. 2003. Combined support for wholesale taxic atavism in Gavialine crocodilians. *Syst. Biol.* 52(3)-403-422.
- Glenn, T.C.; Stanton, J.L.; Davis, L.M.; Bremer, J.R.A.; Rhodes, W.E.; Brisbin Jr., I. L.; Sawyer, R. H. 2002. Low mitochondrial DNA variation among American Alligators and a novel non-coding region in crocodilians. *Mol. Dev. Evol.* 294:312-324.
- Grant, W.A.S.; Bowen, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89, 415-426.
- Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleics Acids. Symp Ser* 41:95-98.
- Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. Oxford Surveys in *Evolutionary Biology*. 7: 1-44.
- Janke, A.; Arnason, U. 1997.The complete mitochondrial genome of Alligator mississippiensis and the separation between recent archosauria (birds and crocodiles) *Journal Mol. Biol. Evol.* 14 (12), 1266-1272.
- Janke, A.; Erpenbeck, D.; Nilson, M.; Arnason, U. 2001. The mitochondrial genome of

- the iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodilus*): implications for amniote phylogeny. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268:623-631.
- Kimura, M. 1968. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genetical Research*, 11, 247-269.
- Kimura, M. 1969. The number of heterozygous nucleotides sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. *Genetics* 61: 893-903.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution* Cambridge University Press, Cambridge, England.
- King, F.W.; Burke, R.L. 1989. *Crocodylian, Tuatara and Turtle Species of the World. A taxonomic and geographic reference.* Assoc. Systematics Collections, Washington, D.C. xxii + 216pp.
- Li, W-H. 1997. *Molecular Evolution.* Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland. 284p.
- Li, W.-H. 1976. Effect of migration on genetic distance. *Amer. Nat.* 110:841-847.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae.* 10th ed. [cited in Mook and Mook 1940].
- Magnusson, W.E. 1985. Habitat Selection, Parasites and Injures in Amazonian Crocodylians. *Amazoniana IX.* 193-204.
- Magnusson, W.E., Veira da Silva, E., Lima, A.P. 1987. Diets of Amazonian crocodylians. *Journal of Herpetology*, 21, 85-89.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- Medem, F. 1955. A New Subspecies of Caiman sclerops from Colombia. *Fieldiana Zoology* 37: 339-344.
- Mullis, K.B.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

- Nedbal, M.A.; Flynn, J.J. 1998. Do the combined effects of the asymmetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produces a mutation rate signature in the mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 15:219-223.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York
- Plotkin, M.J.; Medem, F.; Mittermeier, R.A.; Constable, I.D. 1983. Distribution and conservation of the Black Caiman (*Melanosuchus niger*). *In: Rodin, A. G. J. and Miyata, K (Eds), Advances in Herpetology and Evolutionary Biology*, Harvard University, Cambridge, p.p. 695-705 (Museum of Comparative Zoology).
- Poe, S. 1996. Data Set Incongruence and the Phylogeny of Crocodylians. *Systematic Biology* 45: 393-414.
- Posada, D.; Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9, 487-488.
- Ray, D. A.; Densmore, L. 2002. The Crocodylian Mitochondrial Control Region: General Structure, Conserved Sequences, and Evolutionary Implications. *Mol. Dev. Evol.* 294:334-345.
- Ray, D.A.; White, P.S.; Duong, H.V.; Cullen, T.; Densmore, L. 2000. *Crocodylian Biology and Evolution* ed by Gordon C. Grigg, Frank Seebacher and Craig E. Franklin. Surrey Beaty & Sons, Shipping Norton.
- Rebêlo, G.H.; Magnusson, W.E. 1983. An Analysis of the effect of hunting on *Caiman crocodilus* and *Melanosuchus niger* base on the sizes of confiscated skins. *Biol. Conserv.* 26:95-104.
- Rebêlo, G.H.; Lugli, L.D. 2001. Distribution and abundance of four caiman species (Crocodylia: Alligatoridae) in Jaú National Park, Amazonas, Brazil. *Rev. Bio. Trop.* Vol.49. 1095-1109.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing table of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.

- Ross, J.P. 1998. *Crocodiles. Status survey and Conservation Action Plan. 2 nd ED.*
IUCN – SSC. Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and
Cambridge, UK.
- Rozas, J.; Rozas, R. 1999. DnaSP Version 3: an integrated program for molecular
population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.
- Ryberg, W.A.; Fitzgerald, L.A.; Honeycutt, R.L.; Cathey, J. C. 2002. Genetic
Relationships of American Alligator Populations Distributed Across Different
Ecological and Geographic Scales. *Mol. Dev. Evol.* 294:325-333.
- Ruffeil, L.A.A.S. 2004. *Abundância, reprodução, caça de subsistência e conservação
de jacarés na Terra Indígena Uaçá, Amapá, Brasil.* Dissertação de Mestrado.
Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) – Universidade Federal do Pará. Belém.
57p.
- Sambrook, J.; Fritsch; T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual,*
second edition. Cold. Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, N Y.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 2000. *Arlequin Version 2.000: A software for
population genetic data analysis.* Laboratório de genética e biometria.
Universidade de Geneva, Suíça. Adquirido de: [http:// anthropologie.
Unige.ch/arlequin](http://anthropologie.unige.ch/arlequin).
- Slatkin, M. 1989. Population structure and evolutionary progress. *Genome*, 31, 196-
202.
- Slatkin, M.; Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods of methods of
estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43, 1349-1368.
- Smith, N.J.H. 1980. Caimans, capybaras, otters, manatees, and man in Amazônia.
Biol. Conserv. 19:177-187.
- Smouse, P. E.; Long, J. C.; Sokal, R. R. 1986. Multiple regression and correlation
extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*

- 35:627-632.
- Solé-Cava. 2001. *In*. *Biologia Molecular e Evolução*. Matioli, S. R. Ribeirão Preto: Holos Editora, pg 172-190.
- Staton, M.A.; Dixon, J.R. 1977. Studies on dry season biology of *Caiman crocodilus* from the Venezuelan llanos. *Caracas: Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* 35:237-265.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types, p. 127-165. *In*: H. SIOLI (Ed.). *The Amazon: Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*, Monographiae biologicae. Dordrecht, W. Junk Publishers, 763p.
- Spix, J. B. 1825. *Species novae Lacertarum*: 4, t.3
- Steel, R. 1973. Crocodylia. *In* Kuhn (Ed), *Handbuch der Paleoherpetologie* 16: 116. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. *In: Crocodylian Biology and Evolution* ed by Gordon C. Grigg, Frank Seebacher and Craig E. Franklin. Surrey Beaty e Sons, Shipping Norton.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123- 585-595.
- Tajima, F. 1993. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics*, 135, 599-607.
- Taplin, L.E.; Grigg, G.G. 1989. Historical zoogeography of the eusuchian crocodylians: a physiological perspective. *American Zoology* 29: 885-901.
- Templeton, A.R.; Boerwinkle, E.; Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*.

- Genetics* 117, 343-351.
- Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.
- Templeton, A.R.; Sing, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping: IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134, 659-669.
- Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* 10:779-791.
- Templeton, A.R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol. Ecol.* Vol. 13, Issue 4: 789-809.
- Verdade, L.M.; Zucoloto, R.B.; Coutinho, L. L. 2002. Microgeographic Variation in *Caiman Latirostris*. *Mol. Dev. Evol.* 294:387-396.
- Wells, J.V.; Richmond, M.E. 1995. Populations, Metapopulations, and species populations: what are they and who should care? *Wildlife Society Bulletin*, 23(3):458-462.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-70.
- Wilson, A.C.; Cann, R.L.; George, M.Jr.; Gyllensten, K.M.; Helm Bychowiski, V.B.; Higuchi, R.G.; Palumbi, S.R.; Prager, E.M.; Sage, R.D.; Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.
- White, P.; Densmore L. 2001. DNA sequence alignments and data analysis methods: Their effect on the recovery of crocodylian relationships. Pages 29-37 in *Crocodylian biology and evolution* (G. Grigg, F. seebacher, and C. Franklin). Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, New South Wales.

- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics* 6:111. Wright, S. 1922a. Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Naturalist* 56:330
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.
- Xia, X.; Xie, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92, 371-373.
- Zucoloto, R.B.; Verdade, L.M.; Coutinho, L.L. 2002. Microsatellite DNA Library for *Caiman Latirostris*. *Mol. Dev. Evol.* 294:346-351.

Fontes financiadoras: The Nature Conservancy do Brasil (TNC) e Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM).

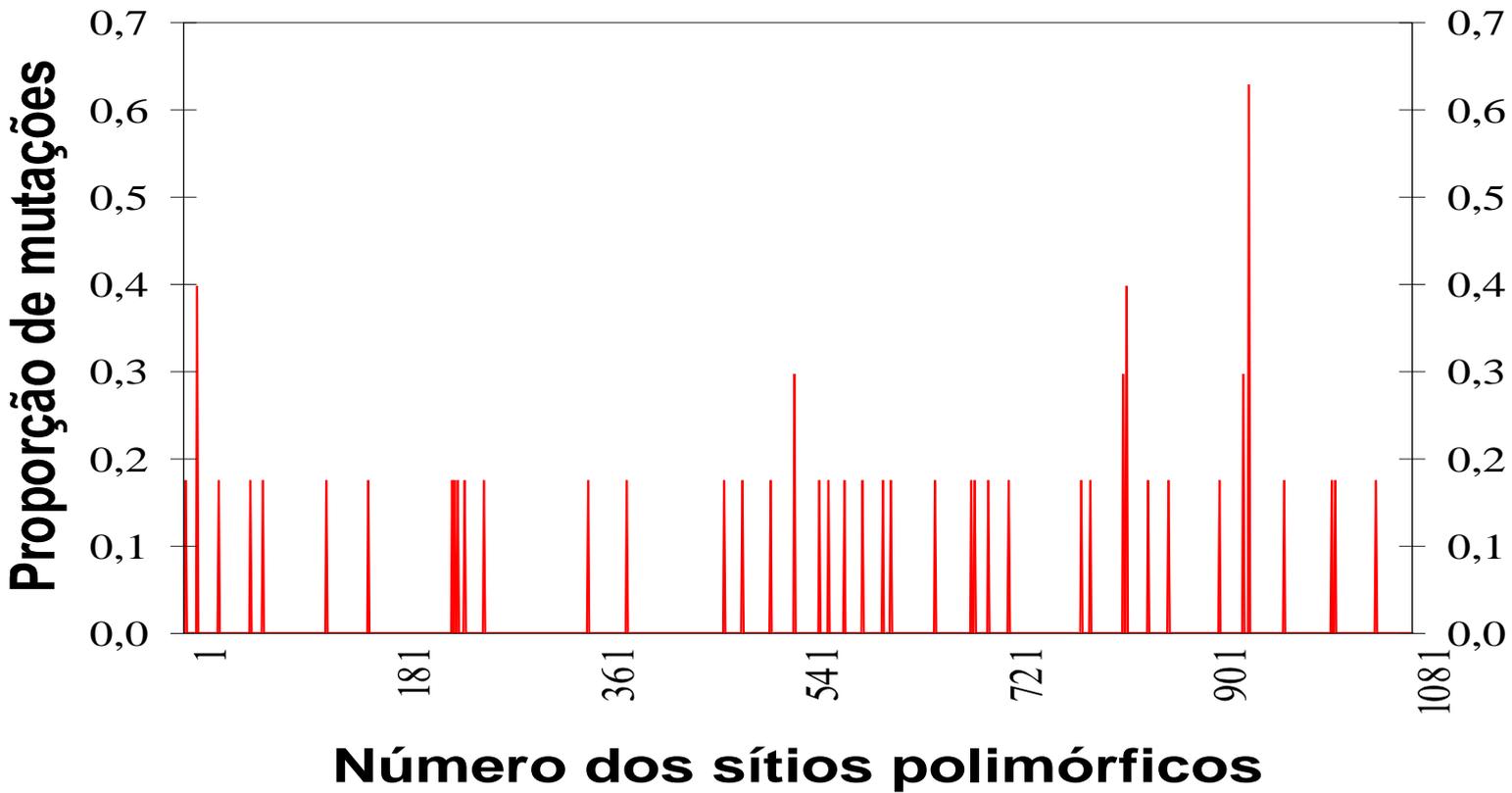


Figura A - Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de *C. crocodilus*.

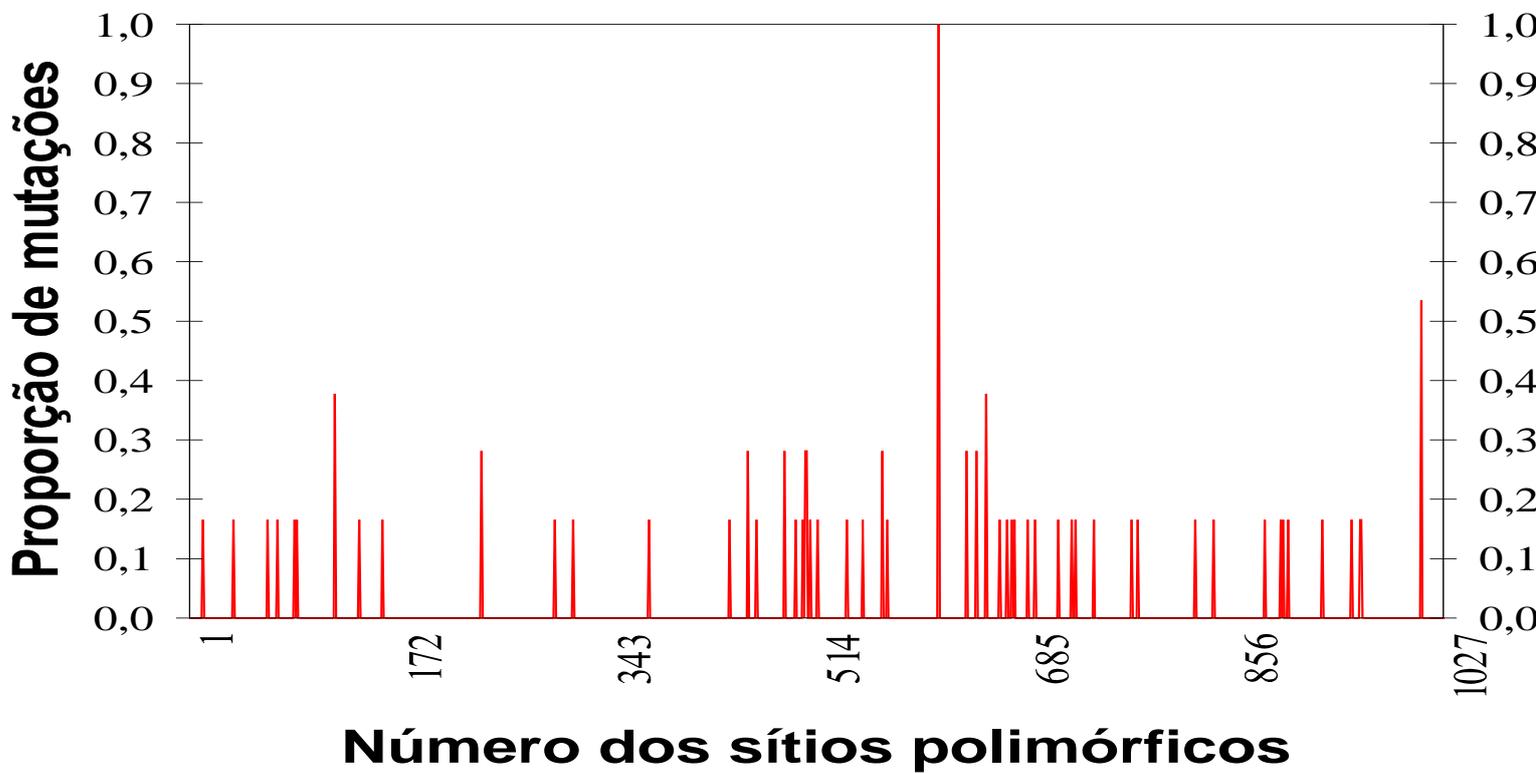


Figura B - Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de *M. niger*.

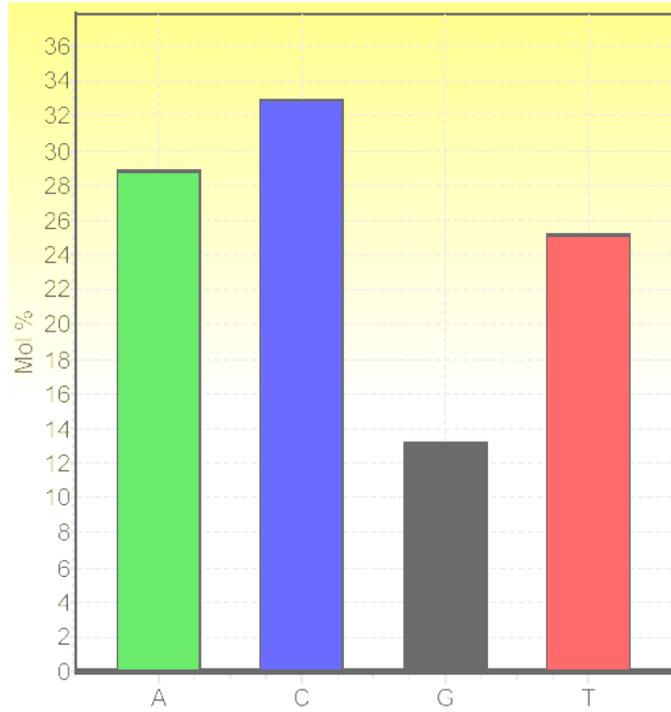


Figura C- Composição da frequência nucleotídica da região do citocromo *b* de *C. crocodilus*.

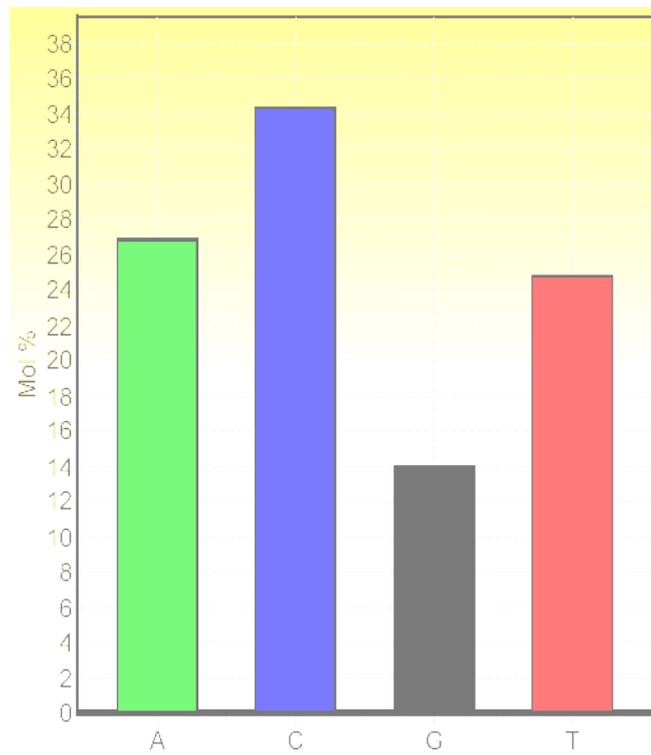


Figura D- Composição da frequência nucleotídica da região do citocromo *b* de *M. niger*.

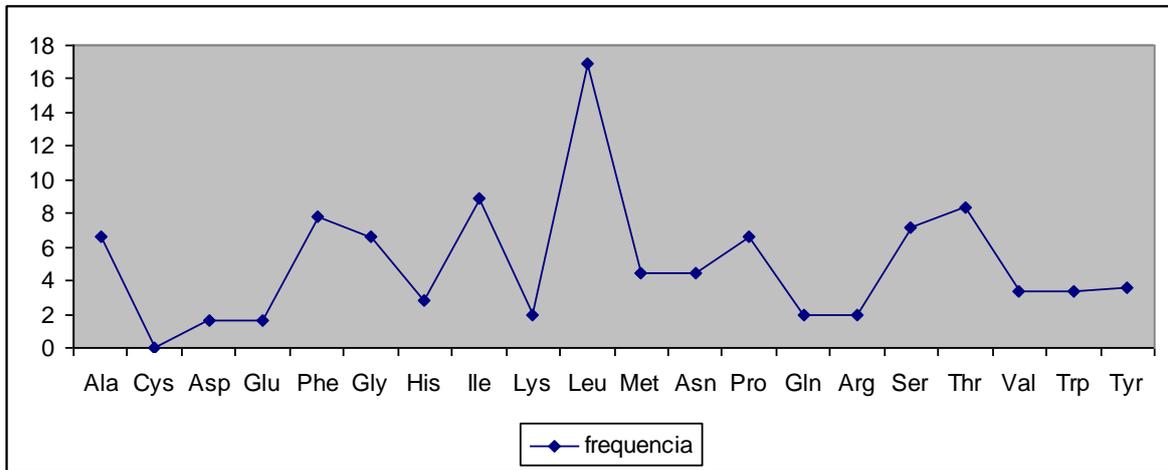


Figura E- Frequência dos aminoácidos nas seqüências de *C. crocodilus*.

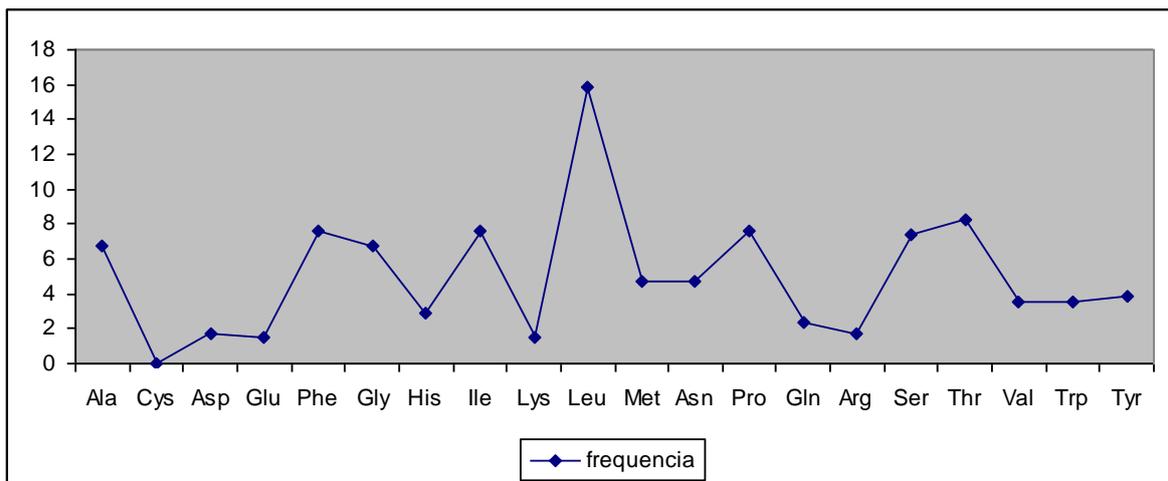


Figura F- Frequência dos aminoácidos nas seqüências de *M. niger*.

Tabela C- Matriz de distâncias de rios em Km utilizada nas análises de agrupamento de clados (NCPA) e no teste de Mantel.

Populações de <i>Melanosuchus niger</i> e <i>Caiman crocodilus</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 AA										
2 RP	255.00									
3 LJ	105.00	250.00								
4 RA	1970.00	2050.00	1750.00							
5 RU	1800.00	720.00	1700.00	170.00						
6 LT	1850.00	1750.00	1750.00	220.00	50.00					
7 P-S	1655.00	1450.00	1670.00	3070.00	3340.00	3390.00				
8 LM	605.00	450.00	590.00	2450.00	2290.00	2340.00	1050.00			
9 RN	1835.00	1680.00	820.00	3680.00	3520.00	3550.00	350.00	1230.00		
10 CT	715.00	830.00	620.00	1220.00	1080.00	1130.00	2300.00	1250.00	2480.00	
11 RM	950.00	1250.00	820.00	3035.00	2520.00	2550.00	2870.00	1820.00	3060.00	1815.00

Nota: AA= Arquipélago das Anavilhanas; RP= Rio Purus; LJ= Lago Janauacá; RA= Rio Approuague; RU= Rio Uaçá; LT= Lago Txipok; P-S= Pacaya-Samíria; LM= Lago Mamirauá; RN= Rio Napo; CT= Comunidade do Tapará e RM= Rio Madeira. A população da Ilha São Miguel não foi incluída na tabela acima porque dista apenas cerca de 5 Km da Comunidade do tapará (CT) e nas análises de *Caiman crocodilus* foi feita uma soma deste valor à distância de CT em relação às demais localidades.