

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA

FILOGEOGRAFIA DE *Trichechus inunguis* NATTERER, 1883  
(MAMMALIA:SIRENIA) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

ANDRÉA MARTINS CANTANHEDE

**VEDADO  
EMPRÉSTIMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/FUA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior

MANAUS-AM

2002

**BIBLIOTECA DO INPA**

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA

FILOGEOGRAFIA DE *Trichechus inunguis* NATTERER, 1883  
(MAMMALIA:SIRENIA) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

ANDRÉA MARTINS CANTANHEDE

Orientadora: Dra VERA MARIA FERREIRA DA SILVA

Co-orientador: Dr. JOSÉ ALVES-GOMES

Apoio financeiro: CNPq-130079/2000-6; PPI-3190; PPG 7- 1154/99

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/FUA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior

MANAUS-AM

2002

BIBLIOTECA DO INPA

T  
59955  
C229f

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cantanhede, Andréa Martins

Filogeografia de *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia) da Amazônia Brasileira.

Manaus: INPA, 2002

XV + 83p.

Dissertação de mestrado

1. Peixe-boi amazônico 2. Filogeografia 3. Região controle 4. Evolução 5.

Conservação

### **Sinopse**

Um fragmento de 364 pb da região controle do DNA mitocondrial foi sequenciado para o peixe-boi amazônico. As análises populacionais e filogenéticas sugerem que existe uma população homogênea ao longo de toda área de ocorrência dessa espécie. Isso tem importantes implicações no manejo e conservação do peixe-boi amazônico, principalmente para futuros programas de reintrodução dos animais de cativeiro.

Palavras-chave: Peixe-boi amazônico, Filogeografia, Evolução, Manejo e Conservação.

Dedico esta dissertação aos meus pais



E também aos peixes-bois

Auden, W.H.: "Como organismos biológicos, feitos de matéria, somos sujeitos às leis da física e da biologia; como pessoas conscientes, que criam nossa própria história, somos livres para decidir como esta história deve ser. Sem a ciência, não teríamos noção de igualdade; sem a arte, nenhuma idéia de liberdade." Citação encontrada no livro *Mundos Imaginados*, escrito por Freeman J. Dyson e editado pela Companhia das Letras, 1998 - São Paulo, SP.

## AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que me apoiaram ao longo de todo o mestrado, a quem devo expressar meus sinceros agradecimentos:

À Deus, pela força espiritual que me mantém viva;

À minha família, em especial aos meus pais Rosário e Raimundo Nonato, meus irmãos André Rogério e Aurélio e as minhas sobrinhas Andressa e Andreyana;

Aos meus orientadores Dra. Vera da Silva e Dr. José Gomes, sempre atenciosos e dispostos a ajudar, e com quem aprendi lições acadêmicas, e principalmente lições de vida;

Ao Dr. Fernando Rosas, pela amizade e pelas críticas e sugestões ao trabalho;

Ao Dr. Jorge Porto, pela ajuda nas análises dos resultados;

À Dr. Eliana Feldberg pelo incentivo e ajuda nas análises cariotípicas e ao “pessoal” do laboratório de citogenética;

À Maristerra Lemes e Joselita Santos pelas correções feitas para versão final da dissertação;

À Dr. Izeni, pela valiosa contribuição na redação do plano de dissertação;

Ao professor Paulo Andrade por disponibilizar uma amostra de peixe-boi amazônico;

À Stella e Márcia Picanço, por terem disponibilizado as amostras e terem ajudado nas coletas de tecido dos peixes-bois do CPMA-Balbina;

Ao Keid pela ajuda no mapeamento das áreas amostradas;

À minha amiga Carminha, que sempre esteve disposta a me ouvir e que nesses 2 anos foi uma “mãezona”.

Meus companheiros do Laboratório de mamíferos aquáticos: Fernanda Rodrigues, Yara Camargo, Renata Santoro, Gália de Matos e o técnico Nildon; e do laboratório de Biologia Molecular: Sandra, Carmen, Maryelen, Estevão, Kyara, Jaqueline, Fábio, Audrey, Alexandre, Marcos e o técnico Franco;

O veterinário Anselmo d’Affonseca e sua equipe (Raimundo, Marcelo, Nazaré e, Daniel e Chemerson), que contribuíram nas coletas das amostras dos animais do INPA;

Ao Régis Pinto, por ter dado oportunidade de fazer o meu primeiro estágio com peixe-boi e por ter disponibilizado amostras do peixe-boi marinho;

Aos meus colegas de turma: Cileny, Fernandinha, Guillermo, Reinaldo, Bruno, Daniel, Zeca, Rojão, Bactéria, Charles, Emerson, Lígia, com quem dividi muitos momentos bons, e muitas noites mal dormidas...;

A amiga Muzenilha que tanto me ajudou na aula de qualificação;

Àos amigos que conquistei durante esses dois anos, que foram muitos... (em especial a Sandrinha, Carmecita, Nívia do Carmo, Rejane Simões) e aos amigos do Maranhão (em especial ao Kenny, Clara, Lane, Day, Rômulo, Ana Paula e Jaqueline Carneiro, Leila) que sempre me encorajaram;

Ao Hádamo pela disposição em me ouvir nos momentos que mais precisei;

As pessoas da república “casa dos artistas” (Heitor, Guilherme, Alexandre, Leandro, Hádamo) pelos momentos de descontração;

Aos professores do curso de Biologia Aquática e Pesca Interior por terem contribuído na minha formação

À todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela oportunidade de realizar o mestrado e de conhecer a Amazônia;

Ao CNPq, pela bolsa que garantiu minha sobrevivência em Manaus durante dois anos;

**MUITO OBRIGADA!!!!**

**Andréa Martins Cantanhede**



## RESUMO

O peixe-boi amazônico é endêmico da região amazônica, onde é encontrado desde a Ilha de Marajó (Brasil) até as nascentes do Rio Amazonas, na Colômbia, Peru e Equador. Historicamente, essa espécie vem sofrendo uma grande pressão de caça que ocasionou sua redução populacional. O objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética dessa espécie e verificar sua associação com a distribuição geográfica utilizando a região controle do DNA mitocondrial. Sessenta e oito indivíduos foram amostrados provenientes de 6 áreas da bacia amazônica (Negro, Japurá, Solimões, Madeira, Amazonas-AM e amostras do estado do Pará). Um total de 364 pares de bases foram sequenciados e 37 haplótipos encontrados. A diversidade haplotípica foi relativamente alta ( $h = 0.909$ ) ao contrário da nucleotídica  $Pi$  (JC) = 0.00836. Isso ocorreu porque a maioria desses haplótipos (31) estão representados por *singletons*. Os valores de  $k$  (número médio de diferenças nucleotídicas/par de seqüência) e de  $D_{xy}$  (número médio de substituições nucleotídicas/sítio) indicam uma distinção dos haplótipos da área do Pará que apresentaram maior variabilidade comparados com os das outras áreas. A AMOVA mostrou que 93.86% da variabilidade genética é explicada por variações dos haplótipos dentro das áreas. A estimativa de fluxo gênico é alta, com  $M$ , migrantes/geração, variando de 3.00 a 13.133. A ausência de segregação geográfica demonstrada pelas análises filogenéticas tem implicações na conservação dessa espécie. As populações parecem ser panmíticas e a área de origem não limitaria futuros programas de reintrodução dos animais de cativeiro.

## Abstract

The Amazonian manatee is endemic to the Amazon River basin, occurring from Marajó Island (Brazil) up to the heads of that river in Colombia, Peru and Equator. Historically, this species has suffered from extensive hunting pressure leading to a reduced population size. The goal of this study was to estimate the genetic variability of this species, verifying if there was any association between the geographic distribution and the genetic variation using the mitochondrial DNA control region. Sixty-eight individuals from six areas of the Amazon basin (Negro, Japurá, Solimões, Madeira and Amazon, in the Amazonas State and from Pará State) were sampled. A total of 364 base pairs were sequenced and 37 haplotypes were found. The haplotype diversity was relatively high ( $h = 0.909$ ), despite the low nucleotide diversity  $Pi(JC) = 0.00836$ . This can be explained by the large number of singletons (31) in the sample. The  $k$  values (average number of nucleotide differences per sequence pair) and  $D_{xy}$  values (average number of substitutions per site) discriminate haplotypes from the Pará area that are more variable compared to the other areas. The AMOVA shows that 93.86% of the genetic variability was explained by haplotype variation within the areas, and that the gene flow estimate is high (migrants per generation,  $M$ , varies from 3 to 13.133). The absence of geographic segregation demonstrated by the phylogenetic analyses has ultimate implication on the species conservation. The Amazonian manatee population seems to be panmitic, therefore, guidelines for future reintroduction programs of captive manatees will not be limited by the area of origin of the animal to be released.

## ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	III
DEDICATÓRIA.....	IV
EPÍGRAFE.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A Ordem Sirenia.....	1
1.2 Peixe-boi amazônico.....	5
1.3 Uso de DNA em estudos populacionais.....	7
1.4 Genoma mitocondrial.....	9
1.5 Filogeografia.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Geral.....	18
3.2 Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Tratamento das amostras.....	19
4.1.1 Extração.....	20
4.1.2 Digestão.....	20
4.1.3 Purificação.....	20

4.1.4	Quantificação do DNA.....	21
4.2	Amplificação <i>in vitro</i> -PCR.....	21
4.3	Purificação do produto amplificado.....	23
4.4	Reação de sequenciamento.....	24
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICAS E FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS</b>		
<b>NUCLEOTÍDICAS.....</b>		
5.1	Análises das sequências nucleotídicas.....	25
5.2	Análise populacional.....	26
5.3	Análises filogenéticas.....	27
5.3.1	Distância genética.....	28
5.3.2	Máxima Verossimilhança.....	29
5.3.3	Método Network.....	30
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		
<b>31</b>		
6.1	Análises das sequências nucleotídicas.....	31
6.2	Análise populacional.....	34
6.3	Análises filogenéticas.....	39
6.3.1	Distância genética.....	39
6.3.2	Máxima Verossimilhança.....	41
6.3.3	Método Network.....	43
6.4	Paleogeografia do ecossistema amazônico durante o Cenozóico e uma inferência sobre o evolução do peixe-boi amazônico.....	49
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>		
<b>51</b>		
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		
<b>53</b>		

9. ANEXOS.....	67
Anexo 1: Amostras de tecido de <i>Trichechus inunguis</i> coletadas e suas respectivas procedência, sexo e local da biópsia.....	67
Anexo 2: Número e frequência total dos haplótipos (incluindo os sem procedência) das 68 amostras de <i>Trichechus inunguis</i> analisadas.....	69
Anexo 3: Matriz de distância genética corrigida, segundo o modelo HKY mais gamma, dos 37 haplótipos de <i>Trichechus inunguis</i> e dos 14 haplótipos de <i>Trichechus manatus</i> incluídos nas análises como grupo externo.....	78
Anexo 4: : Cariótipo do indivíduo B14-Mojú. O número de cromossomos corresponde ao de <i>Trichechus inunguis</i> , ou seja 56 cromossomos.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Perfil de temperatura utilizado nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	22
Tabela 02 – Estimativa da diversidade genética encontrada na região controle do DNA mitocondrial dos peixes-bois ( <i>Trichechus inunguis</i> ) dentro das seis áreas da Bacia Amazônica amostradas.....	33
Tabela 03 – Estimativa da diversidade genética encontrada na região controle do DNA mitocondrial dos peixes-bois ( <i>Trichechus inunguis</i> ) entre as seis áreas da Bacia Amazônica amostradas.....	34
Tabela 04 - Freqüência dos 37 haplótipos de <i>Trichechus inunguis</i> nas seis áreas da Bacia Amazônica amostradas.....	35
Tabela 05 - Análise de variância molecular (AMOVA) para os 36 haplótipos de <i>Trichechus inunguis</i> analisados.....	36
Tabela 06 – Índice de diferenciação genética <i>Fst</i> (Índice de fixação) ( $p$ = nível de significância) e <i>M</i> (número de migrantes por geração) analisados entre pares de populações de <i>Trichechus inunguis</i> .....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Relação filogenética entre os mamíferos.....	2
Figura 02 - Distribuição das espécies <i>Trichechus inunguis</i> e <i>Trichechus manatus</i> .....	4
Figura 03 - Peixe-boi amazônico ( <i>Trichechus inunguis</i> ).....	5
Figura 4: Mapa do genoma mitocondrial de mamíferos.....	13
Figura 5: Resultado de um único dia de caçada de peixe-boi no Lago Aiapuá, Rio Purus, 1940.....	15
Figura 6: Distribuição das amostras de <i>Trichechus inunguis</i> coletados na Bacia Amazônica e usadas nesse estudo.....	18
Figura 7: Histograma representativo da composição média total de bases, em porcentagem, entre as sequências nucleotídicas dos 68 indivíduos de <i>Trichechus inunguis</i> analisados.....	33
Figura 8: Árvore de distância com os 37 haplótipos de <i>T. inunguis</i> , obtida pelo agrupamento dos vizinhos, corrigida pelo modelo HKY + Gamma.....	45
Figura 9: Árvore obtida por Máxima Verossimilhança ( Ln = -1144.94667) dos 37 haplótipos de <i>T. inunguis</i> , corrigida pelo modelo HKY + Gamma.....	46
Figura 10: Árvore obtida por Máxima Verossimilhança ( Ln = -1144.94667) dos 37 haplótipos de <i>T. inunguis</i> , corrigida pelo modelo HKY + Gamma.....	47
Figura 11: Network das sequências da região controle do DNA mitocondrial estimada com o método da estatística da parcimônia de Templeton <i>et al.</i> (1992).	48

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A ORDEM SIRENIA

A evolução da ordem Sirenia não é completamente entendida, mas sabe-se que esta se originou no velho mundo (Eurásia e/ou África) (Reynolds & Odell, 1991), surgindo no médio Eoceno, por volta de 45 a 50 milhões de anos atrás (Domning, 1978). A grande diversidade dos sirênios, provavelmente, ocorreu durante o Mioceno (Domning, 1982; 2001) e atualmente, existem apenas 2 gêneros e 4 espécies.

Esta ordem é proximamente relacionada com as ordens Proboscidea (elefantes) e Hyracoidea (hyrax) (Figura 1). Essa proximidade filogenética entre os membros da super-ordem Paenungulata (proboscídeos, sirênios e hyraxes) foi sugerida pela análise das seqüências de aminoácidos da proteína  $\alpha$  A do cristalino dos olhos destes animais (de Jong & Zweers, 1980), por dados morfológicos (Novarek *et al.*, 1988), pela comparação de seqüência de aminoácidos (Miyamoto & Goodman, 1986) e por seqüências nucleotídicas (Springer & Kirsch, 1993; Lavergne *et al.*, 1996; de Jong, 1998; Shoshani & McKenna, 1998).



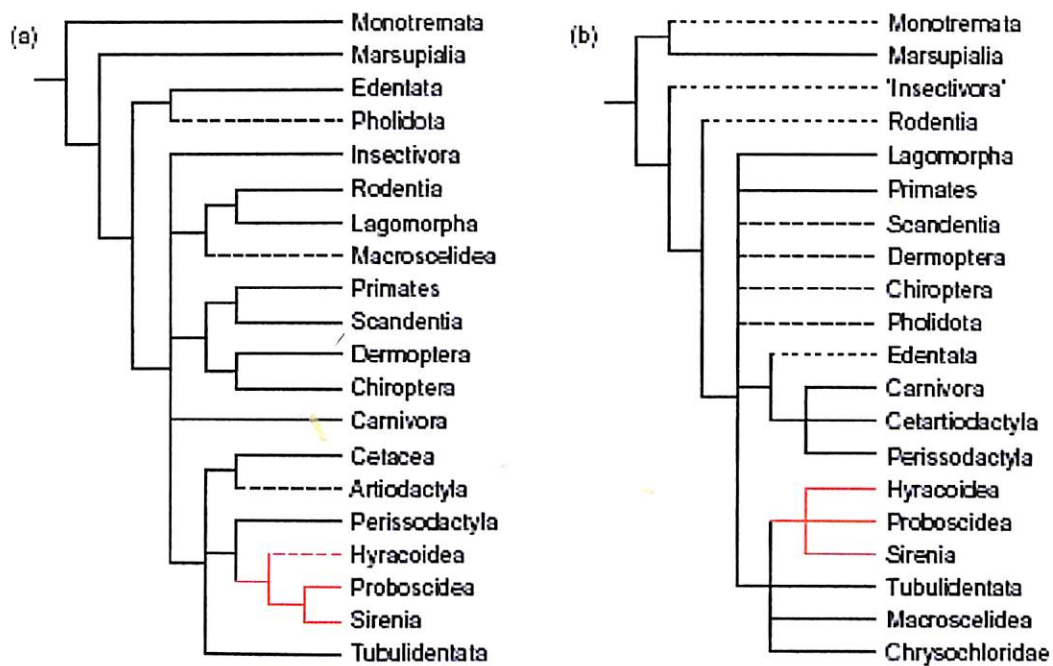


Figura 1: Relação filogenética entre os mamíferos. a) árvore filogenética baseada em evidências morfológicas (redesenhado de Novarek, *et al.* 1988; b) Filogenia molecular dos mamíferos. As linhas sólidas são suportadas por análise de DNA nuclear e mitocondrial e pela combinação de ambas, as tracejadas representam propostas baseadas por 12 de 13 seqüências de DNA mitocondrial codificadores de proteínas (de Jong, 1998). A super-ordem Paenungulata está em destaque (vermelho)

A ordem Sirenia inclui duas famílias com espécies viventes: Dugongidae, constituída por uma única espécie o *Dugong dugon*, e Trichechidae com 3 espécies: *Trichechus senegalensis*, *T. manatus* e *T. inunguis*

O dugongo, *Dugong dugon*, ocorre nos litorais tropical e subtropical do Oceano Índico e oeste do Pacífico. O peixe-boi africano, *T. senegalensis*, ocorre em habitats de água doce, estuário e regiões costeiras desde o Senegal até a Angola, no oeste da África. O peixe-boi marinho, *T. manatus*, distribui-se nos rios, estuários e áreas costeiras tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico, assim como em muitos rios da Flórida, Antilhas, leste do México, América Central e nordeste e leste da América do Sul. Baseadas em análises morfométricas do crânio, duas subespécies de peixe-boi marinho foram

*inunguis* na desembocadura do Rio Amazonas não são conhecidos (Domning, 1981; 1982).

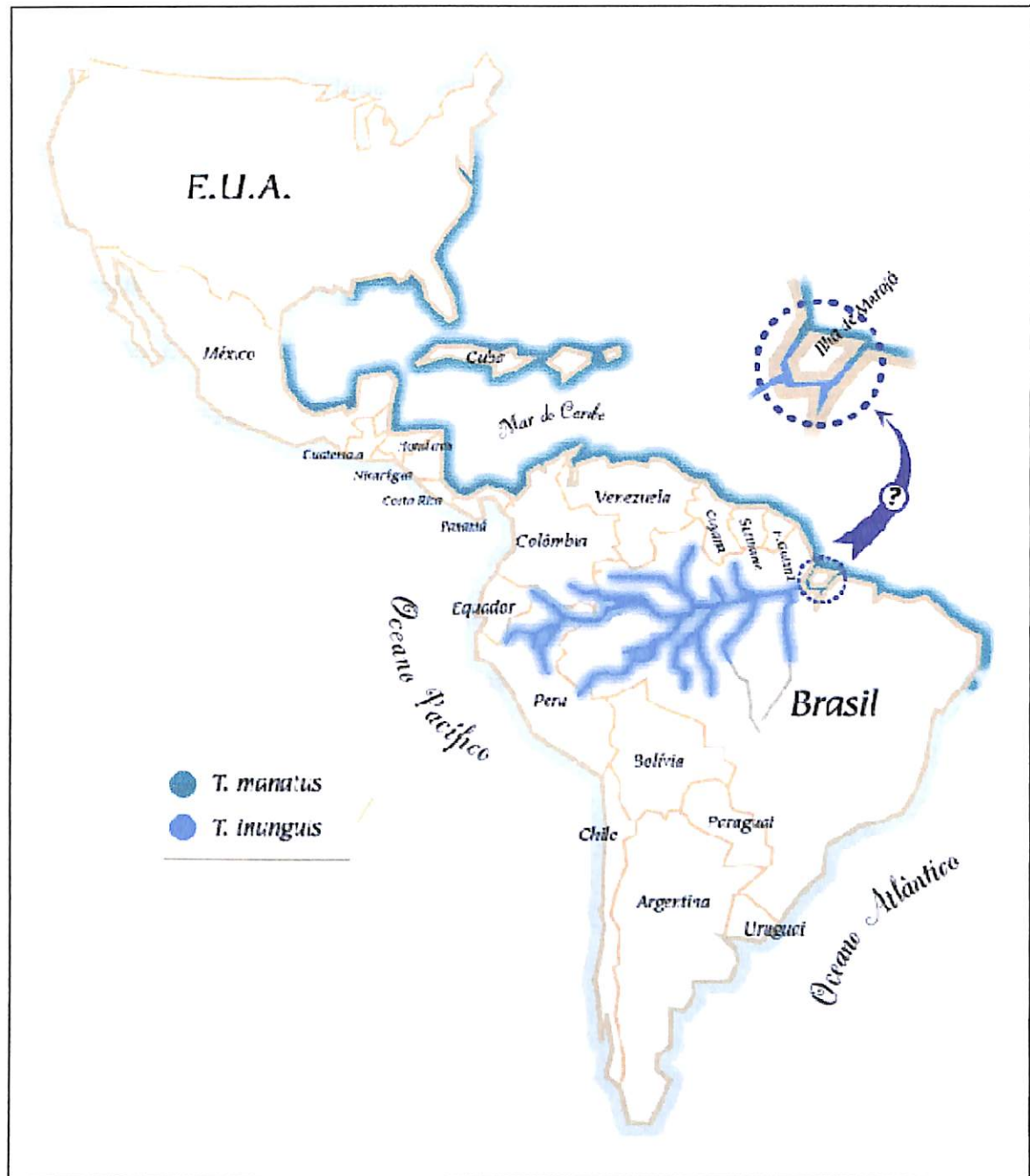


Figura 2: Distribuição das espécies *Trichechus inunguis* e *Trichechus manatus*, o detalhe da Ilha de Marajó indica a suposta área de simpatria entre as duas espécies no Brasil (modificado de Sousa-Lima, 1999).

## 1.2. PEIXE-BOI AMAZÔNICO (*Trichechus inunguis*)

O peixe-boi amazônico está presente em todos os maiores tributários do sistema de drenagem do Rio Amazonas, mas sua ocorrência está preferencialmente associada a ambientes de águas calmas e/ou lagos com vegetação aquática (Best, 1984). Esta espécie se diferencia dos demais peixes-bois por não apresentar unhas (há normalmente três ou quatro nas nadadeiras peitorais dos demais peixes-bois) (Caldwell & Caldwell, 1985); pela diminuição e maior complexidade dos molares e pelo supraoccipital espesso (Domning & Hayek, 1986). São menores tanto no tamanho corporal quanto no peso; o tamanho máximo atingido por esta espécie é cerca de 3 m de comprimento, com 400 a 450 kg de peso. Possui uma coloração mais escura, variando de cinza-escuro a quase negro, com manchas claras na região ventral (Figura 3) (Ayres & Best, 1979; Best & da Silva, 1979; Caldwell & Caldwell, 1985; Rosas, 1991).



(Foto: Doug Perrine)

Figura 3: Peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*).

Não se tem informação sobre tamanho de grupo e estrutura social do peixe-boi amazônico. São considerados animais relativamente solitários, apresentando pouca interação com outros animais na mesma área (Rosas,

1994). A única estrutura social duradoura é entre mãe e filhote, que pode durar mais de dois anos (Best, 1982; da Silva *et al.*, 2000). Agregações temporárias podem ocorrer durante o período reprodutivo e durante a seca, quando permanecem nas áreas mais profundas dos corpos d'água onde ocorrem (Best, 1982).

Os peixes-bois amazônicos se movimentam entre lagos e rio, retornando para a mesma área de várzea durante a enchente e a cheia, evidenciando um suposto grau de fidelidade por uma determinada área. Durante a vazante deslocam-se para os lagos mais profundos onde permanecem protegidos durante toda a estação seca (Best, 1983). O peixe-boi mostra uma nítida preferência por áreas com vegetação flutuante onde permanecem a maior parte do tempo alimentando-se. Utiliza também as áreas de igapó onde já foi registrado alimentando-se a 1-2 m de profundidade (Best, 1981).

Segundo Best (1982; 1983; 1984), o marcante ciclo sazonal das cheias no sistema de drenagem do Amazonas tem um profundo efeito na produção de macrófitas aquáticas, conseqüentemente na alimentação dos peixes-bois. Com o aumento do nível da água dos rios (dezembro a março), há um aumento na produção de macrófitas aquáticas na várzea e igapó e os peixes-bois dispersam-se nessas áreas de alimentação. Durante a estação seca (julho a novembro), com a diminuição do nível dos rios, essas áreas ficam inacessíveis para os peixes-bois, que então durante a vazante iniciam uma migração para os locais mais profundos (Best, 1983).

A sazonalidade da alimentação, aparentemente, restringe a reprodução. A cópula e os nascimentos ocorrem quando a água inicia a subida (dezembro-junho), com a maioria dos nascimentos ocorrendo entre fevereiro e maio. Neste

período as plantas estão abundantes, permitindo a fêmea recuperar suas condições fisiológicas (Best, 1982). A gestação desta espécie dura entre 12 e 14 meses, sugerindo sincronização entre o estro da fêmea e a disponibilidade de alimento (Best, 1982; Junk & da Silva, 1997).

Observações do movimento, padrões de dispersão e atividade do peixe-boi na natureza são extremamente difíceis, devido ao seu comportamento arisco, pelo mergulho discreto, e pela turbidez das águas dos rios e lagos que habitam (Best, 1981; 1982; 1983; Rosas, 1994; da Silva, 1996). A dificuldade de observação na natureza contribui para carência de informações sobre a biogeografia desta espécie.

Nas últimas duas décadas, com a utilização cada vez maior de técnicas moleculares, tornou-se possível observar a existência de variações em caracteres genéticos e quantificá-las diretamente através do DNA (ácido desoxirribonucléico). Tais informações contribuem para o conhecimento de estrutura populacional e têm sido intensivamente usados como alternativa para investigar questões sobre viabilidade de espécies ou populações.

### 1.3.USO DE DNA EM ESTUDOS POPULACIONAIS

Exceto em vírus de RNA (ácido ribonucléico), o material genético de todos os organismos é constituído de moléculas de DNA cuja função é carregar a informação genética. Nas células animais, podem ser encontradas tanto nos cromossomos (DNA nuclear) como nas mitocôndrias (DNA mitocondrial) e (Strachan & Read, 1996).

Técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para identificar relações genéticas entre indivíduos de origem geográfica conhecida, discernir

freqüências dos genes em escala regional, resultado do hábito migratório dessa espécie. Essas informações têm fornecido base para implementação de programas de manejo e conservação da espécie (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000).

#### 1.4.GENOMA MITOCONDRIAL

De acordo com a Teoria Endossimbiótica proposta por Margulis (1981), as mitocôndrias evoluíram de bactérias endocitadas. As células eucarióticas iniciaram sua existência como organismos anaeróbios, sem mitocôndrias, e então estabeleceram uma relação endossimbiótica com uma bactéria, cujo sistema de fosforilação oxidativa foi subvertido pelas células para seu próprio uso (Margulis, 1981; Yang *et al.* 1985; Alberts *et al.*, 1997). A mitocôndria possui muitas características similares com a maioria dos procariotos que dão suporte a essa teoria, já que, ambas possuem tamanho pequeno, dupla membrana, DNA circular e a divisão mitocondrial semelhante à reprodução bacteriana (Strachan & Read, 1996).

As mitocôndrias possuem genoma próprio, replicação independente e sintetizam somente parte das proteínas e RNAs necessários à sua função, enquanto que a outra parte é sintetizada por genes do núcleo (Brown *et al.*, 1979; Alberts *et al.*, 1997). Em mamíferos, por exemplo, o genoma mitocondrial é um DNA circular de cerca 16.500 pares de bases, correspondendo a pouco menos que 1% do DNA total (Alberts *et al.*, 1997). O genoma mitocondrial possui fita dupla, é pequeno e contido em múltiplas cópias na célula. Sua organização inclui 13 genes codificadores de proteína (90% do genoma), 22 de RNA transferidor, 2 RNAs ribossômicos (12 S e 16 S RNAr) e uma região não

codificadora chamada região controle, alça-D, ou *D-loop* (Brown, 1981; 1983; 1985; Hoebel & Dover, 1991; Alberts *et al.*, 1997).

O DNA mitocondrial, em relação ao DNA nuclear, é geneticamente mais eficiente, pois além de raramente conter seqüências duplicadas e não codificadoras, não possui íntrons (seqüência de DNA que não codifica proteína), o que lhes confere uma organização intacta. Os genes geralmente são separados por menos de 10 pb (Wolstenholme & Clary, 1985).

As comparações entre as seqüências de DNA de diferentes organismos revelam que a razão das substituições dos nucleotídeos, durante a evolução, é de aproximadamente 10 vezes maior em genomas mitocondriais do que em genomas nucleares. Várias possíveis razões explicariam essa alta taxa de mutação:

- 1- a exposição do DNA mitocondrial ao alto fluxo de radicais de oxigênio na cadeia respiratória, que tem efeito mutagênico, o que não acontece no DNA nuclear por ser protegido por histonas (pequenas proteínas presentes em grande quantidades, ricas em arginina e lisina, que são associadas ao DNA de eucariotos) (Cann *et al.*, 1984; Li, 1997);
- 2- a falta de mecanismos de excisão-reparo, que pode ser encontrado no DNA nuclear (Alberts *et al.*, 1997);
- 3- o número de replicações é muito maior no DNA mitocondrial em relação ao nuclear, durante a vida da célula (Li, 1997).

O DNA mitocondrial também é muito usado em estudos genéticos pela facilidade em isolá-lo, pelo grande número de cópias por célula, por seu tamanho pequeno, sua organização simples e por não ser recombinante (Avice *et al.* 1984; Hayashi *et al.*, 1985). A alta taxa de mutação permite ainda que o

DNA mitocondrial seja utilizado para inferir relações filogenéticas entre populações ou entre espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (Brown *et al.*, 1979).

As propriedades do DNA mitocondrial listadas anteriormente facilitam a reconstrução das relações evolutivas entre haplótipos mitocondriais de organismos proximamente relacionados, e com isso pode-se comparar a distribuição geográfica atual para avaliar a importância relativa de processos históricos e contemporâneos que governam a estrutura populacional (Awise *et al.*, 1987).

A herança do DNA mitocondrial é estritamente materna (a mitocôndria paterna parece ser ativamente degradada durante a fertilização) e uniclonal (Meyer *et al.*, 1996). Dessa maneira, o DNA é transmitido intacto (exceto pelas mutações), o que facilita os estudos das genealogias, ao contrário do DNA nuclear, que pode sofrer alterações genóticas pela segregação ou recombinação durante o processo reprodutivo (Awise *et al.*, 1984). A herança materna gera hipóteses que refletem a filogenia das fêmeas em populações naturais de uma espécie (Awise *et al.*, 1984). Além do mais, as fêmeas de uma população são demograficamente mais importantes e as análises sobre a dispersão de fêmeas com este marcador é indiscutivelmente relevante para definição de estoques, avaliar o nível de parentesco entre populações, padrões de dispersão e sistemas de acasalamento (Dizon *et al.*, 1997). Numa perspectiva funcional, o DNA mitocondrial animal compreende 37 genes, mas numa perspectiva filogenética, a molécula toda comporta-se como uma unidade genealógica não recombinante representada por múltiplos alelos (Awise, 1994).



No genoma mitocondrial, a região controle é muito usada em estudos de relacionamento entre populações por possuírem taxas evolutivas maiores do que as regiões codificadoras de proteínas. Por não estar sujeita às restrições funcionais, essa região não sofre pressão da seleção natural, razão pela qual apresenta alta taxa de mutação (Li & Graur, 1991).

A região controle, em mamíferos, possui aproximadamente 900 pb. Localiza-se entre as regiões codificadoras de 2 RNAs transportadores, o RNA transportador da prolina e o RNA da fenilalanina (Brown *et al.*, 1986; Strachan & Read, 1996). Esta região é chamada *D-loop* (Displacement loop) porque nela estão contidos os sítios de iniciação da replicação da fita pesada ( $O_H$ ) e os promotores de transcrição das fitas leve e pesada (Figura 4) (Brown *et al.*, 1986).

Em mamíferos, a região controle pode ser dividida em três domínios: o domínio da direita, próximo ao gene do RNA transportador da fenilalanina; o domínio central; e o domínio da esquerda, próximo à região do RNA transportador da prolina (Saccone *et al.*, 1991). O domínio da direita contém a região  $O_H$ , os promotores de transcrição das cadeias leve e pesada. É pobre em guaninas, possui comprimento variável e é bastante divergente entre as espécies. O domínio central exibe grandes similaridades nucleotídicas, apresenta mais guaninas e menos adeninas que a região da direita e da esquerda. O domínio esquerdo é pobre em guaninas e é altamente divergente, estando relacionado com o sítio de parada de síntese da fita da alça D (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1991).

A extrema variabilidade encontrada na região controle, em termos de substituições de bases, quando comparadas a outras regiões do DNA

mitocondrial e do DNA nuclear (Aquadro & Greenberg, 1983), foi observada há mais de duas décadas e tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais. Sua taxa de evolução está entre duas a cinco vezes maior que a dos genes mitocondriais codificadores de proteínas (Meyer, 1993).

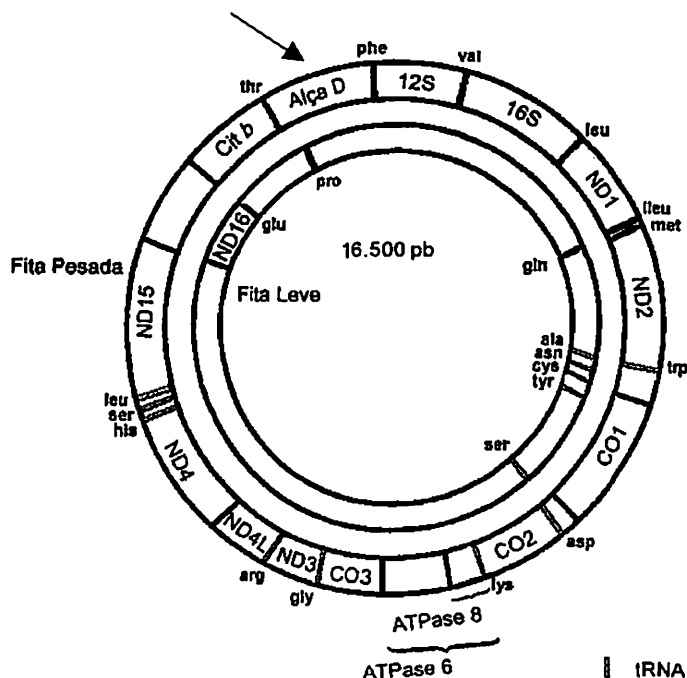


Figura 4: Mapa do genoma mitocondrial de mamíferos (Tagliaro, 1997).

## 1. 5. FILOGEOGRAFIA

O termo filogeografia foi introduzido por Avise *et al.*, (1987), para denominar os “princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente no nível de espécies”. Tal termo foi conseqüência de estudos recentes com DNA mitocondrial, os quais têm mostrado que: 1- indivíduos, melhor que populações, podem ser tratados como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) em estudos de genética de populações; 2- os conceitos filogenéticos podem ser aplicados no nível

intraespecífico e 3- dentro de espécies, linhagens de DNA mitocondrial são geograficamente estruturadas.

Segundo Cruzan & Templeton (2000), a distribuição da variação genética entre populações é determinada por processos históricos e contemporâneos de deriva genética, fluxo gênico e migrações. Análises utilizando frequência gênica, integrando genealogias com informações de distribuição geográfica, possibilitam fazer inferências sobre padrões históricos de fluxo gênico, e fornecem também informações importantes para a interpretação da variação geográfica intraespecífica.

A filogeografia permite traçar uma ponte de ligação entre estudos macro e microevolutivos usando como ferramenta o DNA mitocondrial, sugerindo genealogias, que vem impulsionando estudos populacionais, de espécies e níveis taxonômicos mais altos (Bermingham & Moritz, 1998). Certamente um sucesso empírico baseado em filogeografia de DNA mitocondrial tem sido aperfeiçoado mediante a descrição da distribuição geográfica, relações filogenéticas e distância genética entre linhagens evolutivas de animais, principalmente, para melhor entendimento da biogeografia regional e áreas de endemismo. Esses estudos demonstram a importância de combinar evidências moleculares filogeográficas com informações independentes sobre história de paisagem obtidas da geologia, paleopalinologia, geomorfologia, paleontologia.

Assim, a filogeografia procura testar a congruência entre histórias evolutivas, demográficas e de distribuição geográfica dos taxa, e os cenários geológico e ecológico das regiões, determinando a cronologia da diversificação evolutiva (Bermingham & Moritz, 1998). E a filogeografia comparativa descreve a evolução da paisagem e permite análises dos efeitos da história e da

geografia sobre a estrutura da comunidade de organismos a níveis local e regional (Bermingham & Moritz, 1998).

Awise (1998) documentou o crescimento nos estudos de filogeografia desde a última década, e notou que muitos forneceram ligações empíricas e conceituais entre sistemática e genética de populações. Dentre eles, comparações de divergência entre taxa irmãs de aves da América do Norte (Bermingham *et al.*, 1992), com roedores e marsupiais na América do Sul (da Silva & Patton, 1998), e entre répteis e anfíbios do trópico úmido australiano (Schneider *et al.*, 1998).

## 2.JUSTIFICATIVA

Os primeiros registros sobre a exploração dos peixes-bois amazônicos são de 1542, sendo antes disso, eram utilizados como alimento pelos índios. Porém, entre 1935-54 começou a ser intensivamente caçado, com o advento da indústria do couro (Figura 5). Nesse período, cerca de 4000-7000 peixes-bois eram mortos por ano para serem usados na fabricação de correias de máquinas, polias e mangueiras, e para obtenção de óleo e carne (Best, 1984).



Figura 5: Resultado de um único dia de caçada de peixe-boi no Lago Aiapuá, Rio Purus, 1940 (foto: anônima) (Best, 1984).

Embora protegida oficialmente no Brasil, como espécie em perigo de extinção desde 1967 (Lei de proteção da fauna, nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967; portaria 3.481 de 31 de maio de 1973 e portaria nº 011, de 21 de fevereiro de 1986) ainda persiste a caça comercial e de subsistência em toda Amazônia (Colares, 1991; Rosas, 1994; IBAMA, 1997).

A captura em grande escala para o uso comercial é, sem dúvida, a principal razão da redução populacional de *Trichechus inunguis* na Amazônia (Rosas, 1991; 1994). A baixa taxa reprodutiva limita a habilidade desta espécie de se restabelecer rapidamente. Uma outra possível causa para o declínio das populações de peixes-bois amazônicos seria a destruição de seus habitats pela ocupação e uso desordenado do espaço na Bacia Amazônica (como o lançamento indiscriminado de mercúrio nos rios da bacia), colocando em risco toda a fauna aquática dessa região. A liberação de agrotóxicos, a exploração de gás e petróleo, o tráfego intensivo de barcos, também contribuem para a degradação ambiental, além disso, a construção de hidrelétricas põe em risco a variabilidade genética desta espécie, funcionando como barreiras e isolando populações (Rosas, 1994).

Os peixes-bois são muito importantes no equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. Contribuem para fertilização das águas, já que suas fezes servem de nutrientes para o fitoplâncton, alimento da maioria do zooplâncton, que por sua vez serve de alimento para os peixes (Junk & da Silva, 1997). Encarar os peixes-bois como importantes controladores biológicos de gramíneas e plantas aquáticas é importante, mas é necessário valorizá-los, principalmente como integrantes milenares e preciosos da ecologia e da biodiversidade das Américas, bem como um patrimônio genético.

O conhecimento de fatores que afetam as características genéticas e demográficas de uma população é de importância fundamental para o desenvolvimento de estratégias de conservação (Primack & Rodrigues, 2001). Variações genéticas entre e dentro de populações têm mostrado serem influenciadas por várias características populacionais (e.g. fluxo gênico, endogamia e o tamanho efetivo da população) que estão diretamente relacionadas com a conservação. A preservação da variação genética influencia na viabilidade de populações de tamanho pequeno, bem como na manutenção da adaptabilidade a mudanças no habitat (Futuyma, 1992; Rosel & Revees, 2000).

Vários estudos já foram realizados com *Trichechus inunguis*, sobre visão, audição, comunicação, anatomia, nutrição, comportamento e fisiologia, além de levantamentos da distribuição e biologia nos rios Solimões, Negro, e Tapajós e alguns de seus afluentes (Best, 1981; Domning, 1981; Best, 1982; Best & da Silva, 1983; Colares, 1991, Sousa-Lima, 1999; Chacón, 2001). Porém, o conhecimento sobre a biologia, "status", distribuição e utilização do peixe-boi é ainda insuficiente e o conhecimento da diversidade genética e entendimento das relações geográficas entre populações se tornam essenciais para estabelecer um programa efetivo de proteção.

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1 GERAL:

Este trabalho teve como objetivo estimar a variação genética em indivíduos de peixe-boi amazônico coletados em diferentes áreas da Bacia Amazônica e verificar a associação desta variabilidade com a distribuição geográfica utilizando a região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*). Os resultados poderão ser usados no manejo e conservação desta espécie, especialmente na introdução de indivíduos cativos no ambiente natural.

#### 3.2. ESPECÍFICOS:

- Caracterizar geneticamente indivíduos de peixe-boi oriundos de diferentes áreas geográficas na Amazônia;
- Verificar se existe variabilidade genética entre os indivíduos de peixes-bois associadas à distribuição geográfica e se isto é suficiente para definir populações;
- Verificar o grau de diferenciação genética intraespecífica;
- Identificar se existem populações reprodutivamente isoladas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. COLETA E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Um total de 68 indivíduos provenientes da Bacia Amazônica foram amostrados (Figura 6). Essas amostras foram coletadas de indivíduos mantidos em cativeiro, geralmente filhotes órfãos ou animais apreendidos devido a caça ilegal que são trazidos para o Laboratório de Mamíferos Aquáticos (INPA, Manaus-AM) ou levados para o Centro de Preservação e Pesquisa da Eletronorte (Balbina-AM). Foram coletados de uma a quatro gramas de tecido de *Trichechus inunguis*. As amostras (Anexo 1) foram estocadas em frascos devidamente etiquetados contendo solução saturada com sal (NaCl) de dimetil sulfóxido (DMSO) a 20%, para evitar a obrigatoriedade de congelamento do tecido.

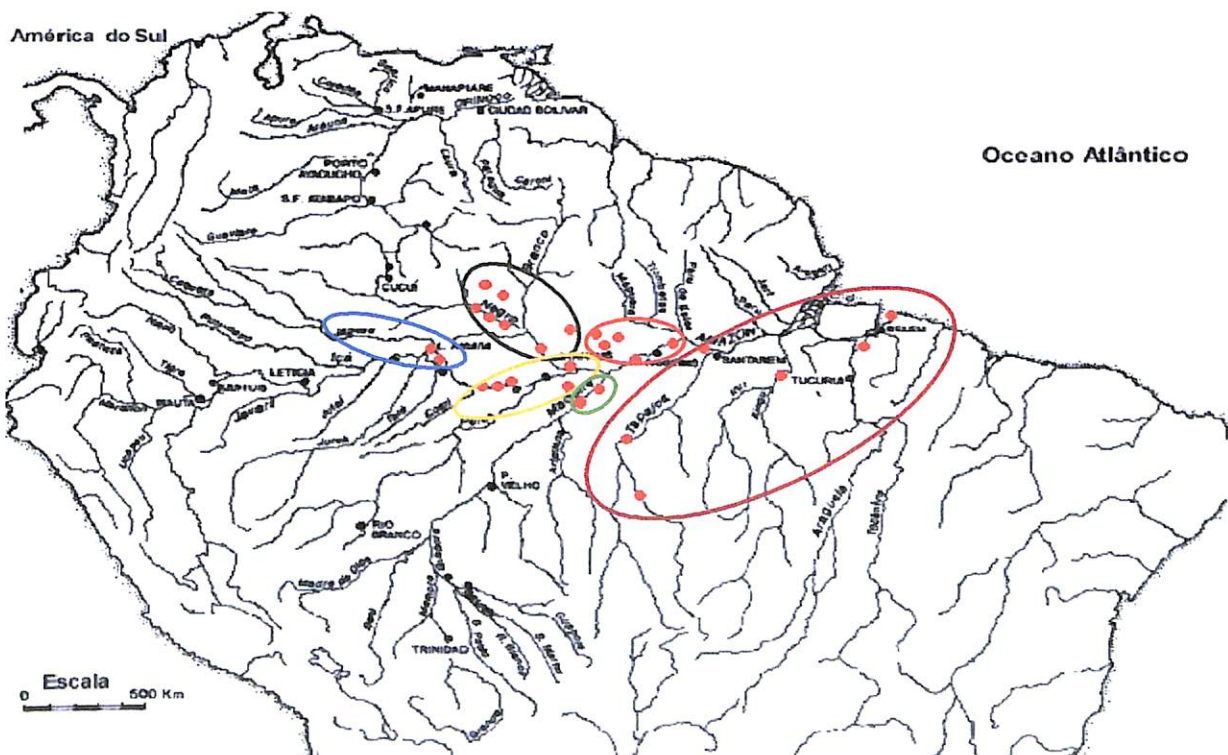


Figura 6: Distribuição das amostras de *Trichechus inunguis* coletados na Bacia Amazônica e usadas nesse estudo, os locais circundados correspondem áreas que foram definidas para posteriores análises, são elas: Negro (círculo preto), Japurá (círculo azul), Solimões (círculo amarelo), Amazonas (círculo vermelho), Madeira (círculo verde) (estado de Amazonas), e as amostras do estado do Pará (círculo marrom).



#### 4.1.1. Extração

O DNA total foi obtido segundo protocolo otimizado por Alves-Gomes *et al.*, (1995), conforme descrito abaixo.

#### 4.1.2. Digestão

Colocou-se em um tubo do tipo Eppendorf subamostras de aproximadamente 1 grama de pele macerada, adicionados a 500 µl de solução tampão para extração (1 ml de NaCl 5M; 10 ml SDS 20%; 86 ml ddH<sub>2</sub>O; 1 ml Tris, pH 8; 2ml EDTA 0.5M), 10 µl de proteinase K 10 mg/ml e 20 µl de DTT 1M. Esse tubo foi encubado à 50° C por 24 horas (podendo ficar até por 48 horas).

#### 4.1.3. Purificação

Adicionou-se 0.5 ml de fenol ao tubo com tecido digerido, agitou-se por cinco minutos e centrifugou-se também por 5 minutos a 3000g. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo. Esse processo foi realizado por duas vezes.

Depois, retirou-se o sobrenadante, adicionou-se 0.5 ml de solução Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), agitou-se por cinco minutos, e centrifugou-se por outros cinco minutos à 3000 g. Transferiu-se a camada sobrenadante para um tubo limpo. Essa operação também foi repetida por duas vezes.

Novamente, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 0.5 ml de solução Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) agitou-se por cinco minutos, e centrifugou-se por cinco minutos a 3000 g. A camada sobrenadante foi transferida para um tubo limpo, e repetiu-se a operação.

Retirou-se o sobrenadante, e em um novo tubo, adicionou-se 1 ml de etanol 100%, e depois encubou-se a – 20 °C por doze horas (ou a – 80°C por 1 hora). Centrifugou-se o tubo por 30 minutos a 14000g. Lavou-se com Etanol 70%, e deixou-se secar; ressuspendeu-se com 200 µl de água pura.

#### 4.1.4 Quantificação do DNA

A quantidade e a qualidade do DNA extraído foi avaliada em comparação a um padrão de peso molecular conhecido em gel agarose 0.8% corado com EtBr (brometo de etídio). Posteriormente o DNA foi diluído numa concentração final que variou entre 10-100ng/µl de DNA.

#### 4.2. AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO*-PCR

A técnica de PCR envolve 3 etapas: Desnaturação da dupla fita de DNA pela elevação da temperatura à 94°; Anelamento do par de iniciadores (primers) à região adjacente da seqüência alvo após redução da temperatura; e Síntese ou extensão da cadeia complementar do DNA alvo na temperatura ótima de trabalho da DNA polimerase.

Os primers utilizados nesse trabalho foram os mesmos utilizados para *Trichechus manatus*, o peixe-boi marinho e obtidos em Garcia-Rodrigues *et al.* (1998), onde, o primer da fita pesada foi desenhado a partir da seqüência consenso do RNA transportador da prolina para golfinhos, vacas e ratos (Southern *et al.*, 1988; Palumbi *et al.*, 1991). O primer da fita leve foi desenhado a partir do segmento conservado da região controle baseado em 100% de homologia entre vacas e golfinhos (Southern *et al.*, 1988 & Garcia-Rodrigues *et al.*, 1998). Foram eles:

Fita pesada: CR-5: 5'- TCACCATCAACACCCCAAAGC-3'

Fita leve: CR-4: 5'- AGATGTCTTATTTAAGAGGAA-3'

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador (Master cycler gradient/ eppendorf) cada reação continha: 15.85  $\mu$ l de água milli-q; 3  $\mu$ l de tampão 10x com cloreto de magnésio; 4  $\mu$ l de dNTPs 1 mM; 6.0 $\mu$ l de primers (iniciadores) específicos (3.0 $\mu$ l de cada), 0.15 $\mu$ l de DNA Taq polimerase à 5 U/ $\mu$ l; 1.0  $\mu$ l do DNA genômico do espécimen em questão com a concentração entre 10-100 ng/  $\mu$ l, em uma volume final de 30 $\mu$ l .

O termociclador foi programado para realizar 30 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: os primeiros 5 ciclos constituídos de 1 minuto a 94° C para a desnaturação (dissociação) das fitas complementares do DNA, um minuto a 58° para anelamento (pareamento) dos primers complementares à região estudada e 1 minuto e meio a 72° para a extensão dos segmentos amplificados de DNA. Os demais 25 ciclos foram efetuados com as mesmas condições de temperatura de desnaturação e extensão, porém com 55° de temperatura de anelamento dos primers (Tabela 1).

Tabela 1: Programa utilizado para amplificação de DNA de de *T. inunguis* via PCR (Reação em cadeia da polimerase).

	Temperatura °C	Tempo
Desnaturação	94°	1'
Anelamento	58°	1'
Extensão	72°	1'30"
	Número de ciclos: 5	
Desnaturação	94°	1'
Extensão	55°	1'
	Número de ciclos: 35	

Após a reação, a eficiência da amplificação foi verificada em gel de agarose 0.8% por comparação à padrão de peso molecular conhecido (DNA ladder de 250 pares de base) por cerca de 40 minutos com corrente 70 mA. Por comparação com o marcador, foi verificado se o tamanho do fragmento amplificado correspondia ao desejado.

#### 4.3.PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

A purificação consiste na eliminação de vários tipos de produtos não incorporados na reação de amplificação como DNA polimerase, tampão, primers, dNTPs, sais e outras moléculas de baixo peso molecular. Tal procedimento foi feito utilizando-se kit Concert™ Rapid PCR Purification System (Gibco BRL Products), de acordo com as especificações do fabricante.

The Concert™ Rapid PCR Purification System é destinado para purificação rápida do produto de PCR. Consiste dos seguintes componentes: solução de ligação (H1); tampão de lavagem contendo etanol (H2); tampão TE e tubos tipo Eppendorf.

Em um tubo, foram adicionados 400 µl de solução de ligação junto com o produto do PCR. Esta solução adere-se ao DNA amplificado e a mistura é colocada em um outro tubo que possui uma membrana de sílica onde o DNA de fita dupla é seletivamente adsorvido. A adsorção à membrana é influenciada pela composição do tampão e pela temperatura. DNA polimerase, tampão, os primers e dNTPs não incorporados durante a PCR, são removidos com o tampão de lavagem contendo álcool. Após esse processo, o DNA é dissociado da membrana em altas concentrações para o tampão de TE numa temperatura

de aproximadamente 65-70°C, temperatura ideal onde os poros da membrana se dilatam.

#### 4.4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O DNA das amostras foi sequenciado utilizando-se o kit de sequenciamento DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit para sequenciador MegaBACE (Amersham Pharmacia Biotech), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada através da técnica de PCR na qual o volume final de cada reação foi de 10 µl. Tal volume foi obtido com os seguintes componentes: 4 µl de pré-mix DYEnamic ET terminator; 1µl de primer (2.5 µM), 3 a 5 µl de DNA e 2 µl água milli-q autoclavada (o volume da água variou dependendo do volume de cada amostra de DNA amplificado).

Em seguida procedeu-se à reação de precipitação em acetato de amônia e etanol com a finalidade de eliminar os deoxinucleotídeos não incorporados na reação de amplificação, e o DNA foi ressuspensão em tampão com 70% de formamida e 1mM de EDTA. O produto obtido da precipitação foi sequenciado em sequenciador automático Mega bace™ (Amersham Pharmacia Biotech).

O sequenciamento dos fragmentos foi feito duas vezes (verso e reverso) e o alinhamento das seqüências levado a efeito de forma a conciliar as seqüências obtidas nos dois sentidos. As seqüências foram conferidas, editadas e alinhadas utilizando o programa Clustal W, inserido no Bioedit (Hall, 1999). Com este programa obteve-se uma matriz de dados contendo as seqüências nucleotídicas dos indivíduos amostrados. O processo de

alinhamento permite comparar duas seqüências homólogas e identificar os locais de deleções ou inserções que possam ter ocorrido dentro de cada uma das linhagens desde sua divergência de um ancestral comum (Li, 1997). Através do alinhamento de seqüências pode-se compensar essas inserções ou deleções de uma seqüência em relação a outra, para que a posição de cada base que esteja sendo comparada entre as seqüências seja homóloga, introduzindo espaços (gaps) (Pereira *et al.*, 2001). A inclusão de "gaps" mantém, em registro, seqüências similares, o que não seria possível com alinhamento direto, sem "gaps". Subseqüentemente foram feitas as análises estatísticas e filogenéticas necessárias.

Todo procedimento descrito acima referentes a extração, amplificação, purificação do produto amplificado e sequenciamento foi repetido para a amostra B14, proveniente de Mojú-Pa, com o objetivo de confirmar o resultado obtido. Todas as atividades citadas foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular do INPA.

## 5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E FILOGENÉTICAS DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA

### 5.1 ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

O padrão de variação das seqüências de DNA foi inicialmente obtido com a definição das seqüências nucleotídicas e dos haplótipos. A diversidade dentro das populações foi medida pelo número de haplótipos, diversidade haplotípica e nucleotídica, calculadas pelo método de Nei (1987) e número de sítios polimórficos. A variabilidade entre as populações foi medida pelo número médio das diferenças nucleotídicas ( $k$ ; Tajima, 1983) e número médio de

substituições nucleotídicas por sítio ( $D_{xy}$ ; Nei, 1987) foram feitas utilizando-se o programa DNAsp (Rozas & Rozas, 1999), que analisa os polimorfismos nucleotídicos para matriz de dados de seqüência de DNA alinhados. No DNAsp além de se poder estimar variações de seqüência de DNA dentro e entre populações, pode-se verificar também o número de sítios com gaps, números de sítios informativos para parcimônia, número total de mutações ( $Eta$ ), e substituição líquida por sítio ( $Da$ ).

Utilizando o programa COLAPSE 1.1 ([http://www.bioag.byu.edu/zooology/crandall\\_lab/programs.html](http://www.bioag.byu.edu/zooology/crandall_lab/programs.html)), foi possível retirar os haplótipos redundantes obtendo-se assim o número e as seqüências desses haplótipos.

## 5.2 ANÁLISE POPULACIONAL

A significância do grau de variabilidade genética intra e inter populacional foi estimada por meio de análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), implementada no programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 1997). A AMOVA é uma análise baseada em modelagem linear que combina análise discriminante e análise de variância, na qual os resultados são proporções de componentes de variância, onde a variância total (ou diversidade genética) ( $Vt$ ) é dividida em componentes covariantes em função do número de mutações entre os haplótipos dentro de cada população ( $Vc$ ) e entre diferentes populações ( $Vb$ ).

Foram arbitrariamente definidas 6 populações em função da área geográfica: Solimões, Japurá, Negro, Amazonas, Madeira (Estado do Amazonas) e os indivíduos provenientes do Estado do Pará. Para cada população foram determinados todos os haplótipos presentes e suas

freqüências. Para essa análise, foi necessário construir uma matriz de distância não corrigida (sem utilizar o modelo de evolução definido) entre os haplótipos. A significância dos componentes de variância e o F- estatístico (índice de fixação), foram testados por múltiplas permutações (x1000) dos dados originais. Com isso foi possível verificar se a variabilidade molecular estimada dentro e entre as populações de *Trichechus inunguis* era significativa.

A estimativa do fluxo gênico (migração:  $M$ ) baseada na distribuição dos haplótipos e na distância entre esse haplótipos foi gerada a partir do F estatístico usando-se a equação:

$$M = 1 - F_{st} / 2F_{st} \text{ (Wright, 1931), onde:}$$

$M$ : número de migrantes para populações haplóides

$F_{st}$ : índice de fixação

### 5.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A estimativa das relações filogenéticas entre as seqüências nucleotídicas foi realizada utilizando-se o programa PAUP 4.0 (Swofford, 1999). As comparações das seqüências foram feitas por reconstrução filogenética baseada na distância genética, máxima parcimônia e máxima verossimilhança.

Como grupo externo, foram incluídas nas análises 13 haplótipos de peixe-boi marinho, *T. manatus*, (Garcia-Rodrigues *et al*, 1998), para interpretar a variabilidade intraespecífica em *T. inunguis*.

A comparação entre seqüências homólogas de DNA permite o estabelecimento dos padrões de similaridade entre elas. De um modo geral, as diferenças observadas nessas comparações fornecem informações a respeito



da história evolutiva dessas seqüências. Hipóteses inconsistentes podem ocorrer caso a divergência gênica tenha ocorrido antes da separação das espécies ou em caso de hibridização entre espécies separadas a muito tempo, o que resulta na introgressão de um genoma não recombinante, como o mitocondrial (Hillis *et al.* 1996).

### 5.3.1 DISTÂNCIA GENÉTICA

A partir da comparação de seqüências atuais não é possível resgatar todas as substituições que realmente ocorreram durante a evolução das seqüências pelo fato de que em uma única posição, pode ter havido mais que uma substituição (Li & Graur, 1991; Meyer *et al.*, 1996). Portanto, é necessário que as distâncias sejam corrigidas, de acordo com algum modelo de evolução. Com os modelos pretende-se saber qual é o valor de distância mais adequado para a reconstrução da árvore genealógica. As árvores geradas pelo princípio da distância (dendrogramas) são calculadas através das similaridades entre as seqüências (método fenético), porém não necessariamente refletem as relações evolutivas entre elas (Li & Graur, 1991).

A distância genética possui um modelo de evolução que define como as diferenças entre as seqüências se acumulam, inferindo o número de mutações ocorridas entre o par de seqüências desde sua separação. A partir de comparações entre as seqüências é possível definir uma medida de quanto dois fragmentos são distantes (Meyer *et al.*, 1996). Neste caso, define-se para cada par de táxon um valor que tenha como significado uma distância evolutiva (número real). Valores maiores significam distâncias maiores.

Nesse estudo, o modelo de evolução molecular utilizado foi definido através do programa MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall, 1998). Os parâmetros definidos a partir da matriz de dados das seqüências nucleotídicas foram: proporção de sítios invariáveis, freqüência empírica das bases nucleotídicas, razão transição/transversão e o parâmetro Gamma.

A matriz de distância foi gerada no programa PAUP 4.0 aplicando o modelo selecionado no MODELTEST 3.0. A topologia para os táxons estudados foi observada usando *Neighbour Joining* NJ (agrupamento dos vizinhos) como algoritmo de união.

### 5.3.2 MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA

Análise de máxima verossimilhança apresenta a vantagem de possuir uma base estatística clara e um modelo evolutivo explícito (Meyer *et al.*, 1996). Essa análise vem aumentando sua popularidade nos últimos anos em função da habilidade de acomodar diferenças conhecidas ou suspeitas nos dados pelo uso do modelo de substituições explícitas (Steel & Penny, 2000). A árvore da máxima verossimilhança escolhida é aquela que tem a maior probabilidade de explicar as freqüências gênicas observadas, assumindo-se que estas se originaram a partir de um táxon ancestral único que se subdividiu em novas populações.

O princípio da Máxima Verossimilhança para inferências filogenéticas é verificar a probabilidade que um determinado modelo de mudanças evolutivas possa explicar a origem dos dados observados (Felsenstein, 1981), o objetivo é inferir a história ou o conjunto de histórias evolutivas que seja o mais consistentes em relação aos dados estudados. Nessa avaliação, os modelos

estabelecem valores de verossimilhança e aquele que apresentar o melhor valor é o que será utilizado para se inferir a árvore filogenética.

Para a aplicação da Máxima Verossimilhança, é necessário que um modelo concreto de mudanças evolutivas que leve à conversão de uma seqüência em outra seja especificado, o modelo utilizado foi o mesmo da análise de distância, obtido através do programa MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall, 1998).

O nível de confiança de cada nó das árvores *Neighbour-joining* foi obtido usando bootstrapping baseado em 100 réplicas. O bootstrapping é um método não paramétrico que testa o nível de confiança das topologias. A base do método consiste de uma simples reamostragem com reposição aleatória dos dados (Russo *et al.*, 2001)

Tentativas de inferências das relações evolutivas entre os haplótipos também foram feitas usando análise de máxima parcimônia. Porém devido ao baixo número de sítios informativos e a existência de mutações paralelas, seria necessário muito tempo para realizar esta análise, tornando-a inviável, pois inúmeras árvores igualmente parcimoniosas estavam sendo encontradas. Devido a essa limitação, as relações filogenéticas entre as seqüências nucleotídicas foram inferidas através de "networks".

### 5.3.3 MÉTODO NETWORK

Em adição aos métodos filogenéticos, o network dos haplótipos foi construído com base na estatística de parcimônia de Templeton *et al.*, (1992). Esse método obtém uma estimativa do número máximo de diferenças entre os haplótipos como resultado de uma única substituição com a confiança

estatística de 95% (Posada & Crandall, 2001). Essa análise foi feita no programa TCS (Clement *et al.*, 2000), que utiliza como base a teoria da coalescência para calcular a provável raiz e a idade relativa dos haplótipos.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo é pioneiro em utilizar dados moleculares no estudo populacional do peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*). A região controle do DNA mitocondrial foi escolhida para esse estudo porque acumula substituições de bases, inserções e deleções, e tem sido usada com sucesso para análise filogenética de espécies com baixa variabilidade genética devido a taxa microevolutiva reduzida e a divergência recente (Avice *et al.*, 1992).

Os primeiros trabalhos a utilizar filogenética molecular para estudos de genética de populações, especialmente relacionando aos padrões biogeográficos foram de Avice *et al.* (1987); Avice (1989;1994).

### 6.1 ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Fragmentos de 364 pares de base da região controle do DNAm<sub>t</sub> foram alinhados para as 68 amostras de *Trichechus inunguis*, contendo um total de 50 posições variáveis com 18 sítios polimórficos informativos para parcimônia, com razão transição/transversão de 7,7204. Considerando “gaps” como um novo caráter, foram encontrados 37 haplótipos. As seqüências apresentaram 4 eventos de indels (três inserções e uma deleção Anexo 2).

Sabe-se que as substituições nucleotídicas não ocorrem ao acaso (Li, 1997) e que transições são mais freqüentes que transversões no DNA mitocondrial animal (Li *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1982 ). A molécula de DNA

possui algumas características como o número diferencial de pontes de hidrogênio entre os pares de bases ou uma alta concentração de pares Adenina-Timina numa só região, que provocam um relaxamento da dupla hélice.

A diversidade nucleotídica ( $Pi$ ) variou de 0.5% para os animais da área do Amazonas e a maior diversidade nucleotídica encontrada foi 2.2% para os da área do Pará, enquanto que a diversidade haplotípica ( $h$ ) variou de 0.85 na área do Solimões a 1.0 na área do Madeira (Tabela 2). A maior diversidade nucleotídica encontrada na área do Pará deve-se principalmente a presença de um maior número de sítios polimórficos presentes nas seqüências nucleotídicas desses indivíduos, principalmente do indivíduo ParáB14 (oriundo de Mojú). Apenas 2 indivíduos da área do Madeira foram amostrados, e cada um representa um haplótipo diferente daí sua diversidade haplotípica elevada.

A diversidade total dos haplótipos foi relativamente alta ( $h = 0.909$ ) ao contrário da nucleotídica que foi  $Pi$  (JC) = 0.00836 (Tabela 2). Isso ocorreu porque a maioria das seqüências (31 dos 37 haplótipos) se apresentam como "singletons", ou seja, seqüências únicas dentro da amostra, caracterizada por uma baixa divergência, e diferenciando-se por poucos caracteres (bases). Essa baixa divergência entre as seqüências nucleotídicas de *Trichechus inunguis* é consistente, já que a origem dessa espécie é relativamente recente, quando comparada com os outros sirênios, tendo originado-se no Plioceno (Domning, 1982).

Tabela 2: Estimativa da diversidade genética encontrada na região controle do DNA mitocondrial dos peixes-bois (*Trichechus inunguis*) dentro das seis áreas amostradas na Bacia Amazônica.

Áreas	Nº de amostras	Nº de haplótipos	Diversidade haplotípica (H)	Diversidade nucleotídica (%) (Pi)	Nº de sítios polimórficos
Negro	10	8	0.933	1.0	16
Japurá	8	6	0.893	0.7	8
Solimões	17	8	0.850	0.6	14
Amazonas	13	7	0.944	0.5	7
Madeira	2	2	1.000	0.8	3
Pará	9	5	0.960	2.2	29
S/ proced.	9	1	-	-	-
Total	68	37	0.909	0.8	

A composição de bases das seqüências nucleotídicas em média foi: Adenina = 27.9%, Timina = 30.5%, Guanina = 13.1% e Citosina = 28.5% (Figura 7).

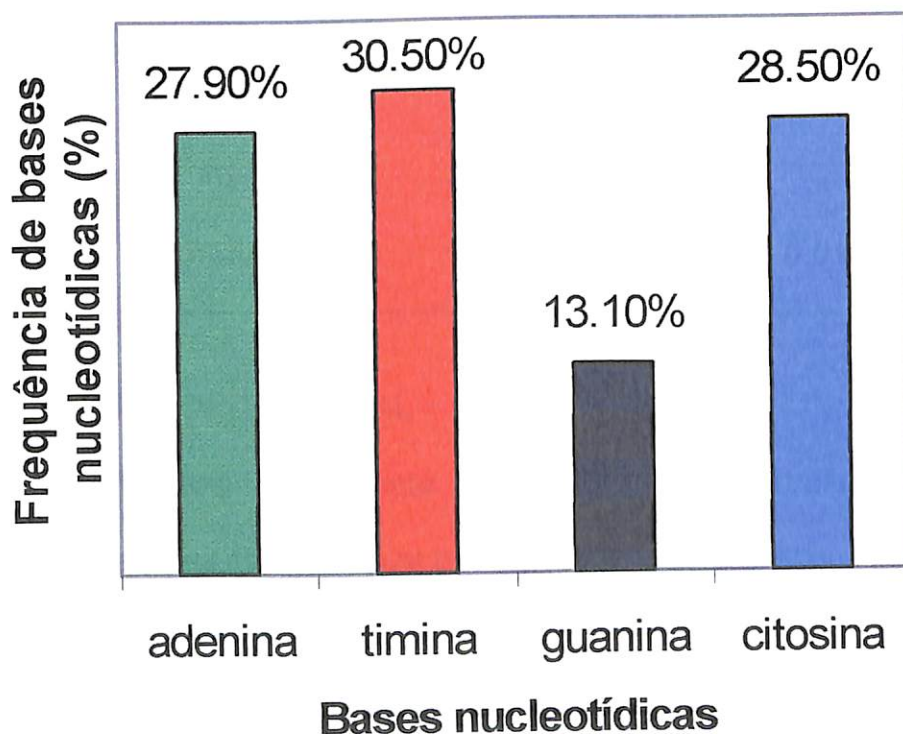


Figura 7: Histograma representativo da composição média total de bases, em porcentagem, entre as seqüências nucleotídicas dos 68 indivíduos de *Trichechus inunguis* analisados.

O número total de mutação ( $E_{ta}$ ) foi 55, a média das diferenças nucleotídicas entre todos os pares de indivíduos ( $K$ ) foi três. O número médio de diferenças nucleotídicas por sítio e o número médio de substituições nucleotídicas por sítio entre as seis áreas, indicam uma distinção dos haplótipos da área do Pará (Tabela 3) que apresentaram maior variabilidade quando comparados com das outras áreas.

Tabela 3: Estimativa da diversidade genética encontrada na região controle do DNA mitocondrial dos peixes-bois (*Trichechus inunguis*) entre as seis áreas da Bacia Amazônica amostradas; número médio de diferenças nucleotídicas por par de seqüência ( $k$ ) na diagonal acima e número médio de substituições nucleotídicas por sítio ( $D_{xy}$ ) na diagonal abaixo.

	Negro	Japurá	Solimões	Madeira	Amazonas	Pará
Negro	-	3.59	2.92	4.31	3.17	6.26
Japurá	0.010	-	2.40	2.86	2.41	5.38
Solimões	0.009	0.007	-	2.34	2.15	4.08
Madeira	0.011	0.009	0.007	-	2.14	7.28
Amazonas	0.009	0.007	0.005	0.006	-	4.94
Pará	0.017	0.015	0.014	0.016	0.014	-

## 6.2 ANÁLISE POPULACIONAL

A análise genética entre populações caracterizou-se por apresentar poucos haplótipos comuns e um grande número de haplótipos raros (Tabela 4). Dentre os 37 haplótipos detectados, apenas 3 foram encontrados em mais de uma área e os restantes (33) ocorreram uma única vez em apenas em uma localidade. Com relação aos indivíduos sem sem procedência (7), apenas um representa um haplótipo (Shiva), os demais indivíduos se agruparam com outros haplótipos com procedência.

Existe uma relação direta entre a frequência e a idade dos haplótipos (Excoffier & Langaney, 1989). Então, haplótipos com alta frequência, têm provavelmente estado presente na população por um longo tempo. Nesse estudo os haplótipos mais comuns foram o “29-solimões23” e “21-negrob11” (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência dos 37 haplótipos de *Trichechus inunguis* nas seis áreas da Bacia Amazônica amostradas.

Haplótipo	Negro	Japurá	Solimões	Amazonas	Madeira	Pará
1- Amazonas13	-	-	-	1	-	-
2- Amazonas29	-	-	-	1	-	-
3- Amazonas80	-	-	-	2	-	-
4- Amazonas95	-	-	-	1	-	-
5- Amazonasb12	-	-	-	1	-	-
6- Amazonasb16	-	-	-	1	-	-
7- Amazonasb17	-	-	-	1	-	-
8- Japurá35	-	1	-	-	-	-
9- Japurá46	-	1	-	-	-	-
10- Japurá59	-	1	-	-	-	-
11- Japurái1	-	1	-	-	-	-
12- Japurái2	-	1	-	-	-	-
13- Japurái6	-	1	-	-	-	-
14- Madeira66	-	-	-	-	1	-
15- Madeira67	-	-	-	-	1	-
16- Negro37	1	-	-	-	-	-
17- Negro72	1	-	-	-	-	-
18- Negro76	1	-	-	-	-	-
19- Negro77	1	-	-	-	-	-
20- Negro78	1	-	-	-	-	-
21- Negrob11	3	1	2	1	-	2
22- Negrob7	1	-	-	-	-	-
23- Negroi4	1	-	1	-	-	-
24- Pará81	-	-	-	-	-	1
25- Paráb1	-	-	-	-	-	1
26- Paráb14	-	-	-	-	-	1
27- Paráb2	-	-	-	-	-	1
28- Paráb4	-	-	-	-	-	1
29- Solimões23	-	1	7	3	-	-
30- Solimões87	-	-	2	-	-	1
31- Solimões92	-	-	1	-	-	-
32- Solimõesb13	-	-	1	-	-	-
33- Solimõesb3	-	-	1	-	-	-
34- Solimõesf2	-	-	1	-	-	-
35- Solimõesf7	-	-	1	-	-	-
36- Solimõesi7	-	-	1	-	-	-
37-Shiva			sem procedência			



O haplótipo 37-shiva foi excluído da Análise de Variância Molecular (AMOVA) devido à ausência de procedência. Os resultados da AMOVA indicam que 6.14% da variância observada ocorreu entre populações, sendo que 93.86% foi devido a diferenças dentro das populações (Tabela 5). Isso pode ser considerado como uma primeira indicação de ocorrência de fluxo gênico entre as populações, ou seja, não existem populações geneticamente isoladas. A variância total ou diversidade genética encontrada foi de 1,70249 (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) para os 36 haplótipos de *Trichechus inunguis* analisados.

VARIAÇÃO	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre as populações	5	12.854	0.10460 Vb	6.14
Dentro das populações	53	84.688	1.59789 Vc	93.86
Total	58	97.542	1.70249 Vt	

Índice de fixação ( $F_{st}$ ): 0.06144 p (0.05474)

Vb = variância em cada população

Vc = variância entre as populações

Vt = variância total

Teste de significância: 1000 permutações

Existe diferença significativa ao se comparar a variabilidade genética dos haplótipos da área do Japurá com os haplótipos da área do Amazonas ( $F_{st}$  = 0.104; p = 0.022), do Solimões ( $F_{st}$  = 0.106; p = 0.005) e do Pará ( $F_{st}$  = 0.103; p = 0.04) e comparando também os haplótipos da área do Pará com a do Solimões ( $F_{st}$  = 0.142; p = 0.021) (Tabela 6).

De um total de oito indivíduos considerados da área do Japurá, seis são procedentes do lago Amanã. Esse lago é de extrema importância biológica, pois está localizado entre as bacias de um rio de água preta (Rio Negro) e de águas brancas (Rio Japurá e Solimões), e abriga durante a seca um grande

número de peixes-bois, concentrando um grande “pool” genético na área Japurá.

As populações de peixes-bois da área do Amanã são relativamente grandes, mas não residem o ano inteiro, eles ficam nessa área principalmente durante o período de seca. A medida que os rios vão enchendo, esses animais deixam a área e se deslocam para áreas de várzea onde sua alimentação é abundante (IPAAM, 1997).

Hrbek *et al.*, (no prelo) analisando seqüências de DNAm de pirarucu, *Arapaima gigas*, provenientes de oito localidades da Bacia Amazônica, coletados entre o Iquitos (Peru) e Macapá (Brasil), encontraram alta diversidade genética no lago Mamirauá.

Estes resultados reforçam a importância dos lagos no ecossistema amazônico, que são utilizados como abrigo por diferentes espécies principalmente durante o período de seca, bem como a necessidade de implementação de bases para manejo e conservação de sua biodiversidade .

O haplótipo mais comum na amostra, 29-solimões23, é proveniente da área do Solimões. Esse haplótipo não é compartilhado com o Pará, o que explicaria a diferença da variabilidade genética entre essas duas áreas.

A variância entre os haplótipos das 6 áreas consideradas conjuntamente não foi estatisticamente significativa ( $F_{st} = 0.06144$ ;  $p = 0.05474$ ). Valores não significativos de  $F_{st}$ , revelam que a hipótese nula da panmixia não pode ser rejeitada e indicam a necessidade de outros estudos para verificação da homogeneidade das populações (Pereira *et al.*, 2001). O nível de significância de  $F_{st}$  encontrado nesse estudo foi muito próximo de 0.05, o que reforça ainda mais a necessidade de estudos, com maior número de amostras por áreas.

Considerando o modelo de ilhas de Wright (1951), torna-se possível estimar a quantidade mínima de migração entre subpopulações de modo a evitar que divergências genéticas substanciais sejam atribuídas unicamente à deriva genética. As migrações entre as localidades foram expressas por  $M$ , que representa o número de migrantes por geração. Em geral, as populações são profundamente diferenciadas geneticamente quando  $M$  assume valores menores que um. Valores maiores que quatro indicam que existe um fluxo gênico suficiente para homogeneizar as frequências dos haplótipos entre as localidades (Kimura & Maruyama, 1971; Li, 1997). Neste estudo,  $M$  variou de 3.00 a 13.133 (Tabela 6).

Populações que ocupam lagos isolados ou rios com barreiras são relativamente fáceis para se definir. Porém, as populações de peixes-bois ocupam ambientes similares que se mantêm interconectados, aumentando a possibilidade de ocorrência de migrações e fluxo gênico, podem então se homogeneizar fenotípica e geneticamente.

A existência de alto fluxo gênico entre as sub-bacias da Bacia Amazônica foi encontrada também para peixes como dourada, *Brachyplatystoma flavicans* (Batista, 2001) e pirarucu, *Arapaima gigas* (Hrbek *et al.*, no prelo).

O nível de diversidade genética e diferenciação entre populações é influenciado por fatores como deriva genética, endocruzamento, fluxo gênico e sistema de cruzamento (Wright, 1931, 1943). E dessa maneira, a estimativa da diversidade genética, e sua distribuição intra e interpopulacional, é fundamental para traçar medidas de conservação de espécies.

Tabela 6: Índice de diferenciação genética  $F_{st}$ , ( $p$ =nível de significância) e  $M$  (número de migrantes por geração) analisados entre pares de populações de *Trichechus inunguis*.

	Amazonas	Japurá	Madeira	Negro	Solimões	Pará
Amazonas	0					
Japurá	$F_{st} = 0.104$ ( $p 0.02$ ) $M = 4.294$	0				
Madeira	$F_{st} = 0.048$ ( $p 0.46$ ) $M = 9.714$	$F_{st} = 0.142$ ( $p 0.31$ ) $M = 3.016$	0			
Negro	$F_{st} = 0.055$ ( $p 0.05$ ) $M = 8.435$	$F_{st} = 0.036$ ( $p 0.12$ ) $M = 13.133$	$F_{st} = 0.089$ ( $p 0.31$ ) $M = 5.056$	0		
Solimões	$F_{st} = -0.020$ ( $p 0.77$ ) Inf	$F_{st} = 0.106$ ( $p 0.005$ ) $M = 4.207$	$F_{st} = 0.117$ ( $p 0.20$ ) $M = 3.766$	$F_{st} = 0.046$ ( $p 0.07$ ) $M = 10.226$	0	
Pará	$F_{st} = -0.0083$ ( $p 0.46$ ) Inf	$F_{st} = 0.103$ ( $p 0.04$ ) $M = 4.327$	$F_{st} = -0.033$ ( $p 0.24$ ) Inf	$F_{st} = -0.040$ ( $p 0.32$ ) $M = 11.960$	$F_{st} = -0.142$ ( $p 0.48$ ) $M = 3.000$	0

### 6.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O poder de uma hipótese filogenética é grande quando diferentes métodos de reconstrução indicam conclusões similares. Em contrapartida, obtendo resultados significativamente diferentes por diferentes métodos é necessário discutir suposições particulares para cada um e sua aplicabilidade nos dados (Sullivan, 1997).

#### 6.3.1 DISTÂNCIA GENÉTICA

Foram testados 56 modelos de evolução no programa Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998). O modelo selecionado como medida de distância entre as seqüências foi HKY 85 (Hasegawa-Kishino-Yano) (Hasegawa *et al.*, 1985), mais Gamma com valor de 0,1798, taxa de transição/transversão de

7,7204 e freqüências de bases nucleotídicas A = 0,2788, C = 0,2857, G = 0,1306, T = 0,3050.

O modelo de substituição utilizado (HKY 85 + Gamma) parte da premissa que mudanças ao longo dos diferentes ramos ocorrem independentemente, embora resultantes dos mesmos mecanismos evolutivos, e aceitem reversibilidade/tempo. O modelo HKY 85 combina as diferenças nas taxas de transição e transversão com a frequência desigual de bases em uma única estatística permitindo o estudo de um modelo de evolução mais realista para seqüências de DNA (Pereira *et al.*, 2001).

Grandes distâncias genéticas indicam a possibilidade de saturação dos sítios variáveis (Sullivan, 1997). Nesse estudo, as medidas de distância genética (*d*) calculadas para os haplótipos de *Trichechus inunguis* variaram de 0.2% entre indivíduos da área do Amazonas a 14.8% entre indivíduos da área do Negro e do Pará e a distância entre *T. inunguis* e *T. manatus* variou de 0.5% a 18.4% (Anexo 3).

No trabalho de Garcia-Rodrigues *et al.* (1998), a divergência genética entre *T. inunguis* - *T. manatus* e *T. manatus* - *T. manatus* foi equivalente, variando de 0.04 a 0.08, ou seja, a distinção entre as duas espécies não foi suportada utilizando dados de DNA mitocondrial. Frequentemente existem dificuldades para distinguir variações encontrada em uma única espécie das variações entre as espécies que são aparentadas. Os fatores complicadores são a possibilidade de espécies distintas poderem ocasionalmente cruzar e produzir híbrido ou formas intermediárias que confundem as diferenças entre as espécies (Primack & Rodrigues, 2001).

O nível de divergência genética entre espécies de mamíferos aquáticos congêneros é bem variável. Estudos de polimorfismos de comprimento em fragmentos de restrição (RFLPs) de genoma mitocondrial completo observaram valores de 4% de distância genética entre *Stenella attenuata* e *S. longirostris* (Dizon *et al.*, 1991) e 1.09% entre *Delphinus delphis* e *D. capensis* (Rosel *et al.*, 1994). No gênero *Tursiops* foram observadas diferenças de 4.1% ao sequenciar a região D-loop do DNA mitocondrial para comparar indivíduos de *T. truncatus* e *T. aduncus* do sul da China e Taiwan (Wang *et al.*, 1999). Moller & Beheregaray (2001) utilizando o mesmo marcador, encontraram divergência de 7.1%, trabalhando com as mesmas espécies de *Tursiops* no sudeste da Austrália.

A árvore filogenética construída com os haplótipos de *T. inunguis* e *T. manatus* como grupo externo, utilizando o modelo proposto (HKY 85 + Gamma), com o algoritmo *Neighbour-joining* não demonstrou um agrupamento por área entre os haplótipos, evidenciando ausência de estruturação geográfica (Figura 8).

### 6.3.2 MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA

Usando o modelo proposto de distância HKY + Gamma, foi obtido o maior valor de máxima verossimilhança de onde as árvores propostas foram construídas. A análise resultou em duas árvores, e a diferença entre elas resume-se na posição dos haplótipos japurá1 e japurá I2, devido a presença de um “missing”, ou seja, de uma base não identificada (Figura 9 e 10). O “score” encontrado foi de Ln likelihood = -114494667. As árvores mostraram

uma topologia similar à apresentada pela árvore de *Neighbour-joining* (Figura 8).

No método da máxima verossimilhança, cada sítio de uma seqüência é considerado separadamente e a verossimilhança de ocorrência de um dado resíduo em um determinado sítio é inferida a partir de uma topologia específica baseada num modelo probabilístico particular (Felsenstein, 1981).

A máxima verossimilhança apresenta menor variância que os métodos geométricos e de parcimônia, já que é menos afetado por erros de amostragem, mesmo com seqüências curtas. Além disso, esse método tende a ser mais robusto a violações do modelo evolutivo, já que os processos evolutivos atuantes em um determinado sítio ocorrem de maneira semelhante em muitos outros. Com base em simulações computacionais, Kuhner & Felsenstein (1994) e Huesenbeck (1995) demonstraram que, comparado com outros métodos, o de Máxima Verossimilhança é o mais acurado e robusto para inferências filogenéticas, além de fornecer os meios necessários para os testes de hipóteses.

Um resultado interessante observado nas análises filogenéticas foi a proximidade do haplótipo 26 (ParáB14) (Figuras 8, 9 e 10), proveniente do Rio Mojú (próximo a estuário do Rio Amazonas) com haplótipos de *T. manatus* procedentes do Brasil e da Guiana (obtido do trabalho de Garcia-Rodrigues *et al.* (1998)). Esse resultado tem importantes implicações evolutivas, sugerindo que esse haplótipo poderia ser um haplótipo ancestral mantido dentro da população desde a separação *T. manatus-T. inunguis*, ou poderia indicar uma possível zona de hibridização no estuário do Amazonas.

A hipótese do híbrido foi refutada por meio de exame cariotípico realizado nesse indivíduo, feito no laboratório de citogenética da Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, cuja responsável é a Dr. Eliana Feldberg. O número de cromossomos encontrado foi igual ao de *T. inunguis*, que segundo Assis, *et al.* (1988) corresponde a 56 cromossomos (Anexo 4). Assim, a hipótese mais provável para esse caso é a do haplótipo ancestral, haja visto que esse indivíduo (Pará B14) encontra-se num rio muito próximo ao estuário, onde a pressão ambiental sobre as características genéticas é minimizada, possibilitando que ele mantenha um haplótipo muito semelhante com o ancestral marinho.

### 6.3.3 MÉTODO NETWORK

O cladograma network revela que o ancestral comum mais recente segundo o critério da parcimônia é o haplótipo 29-Soli23 (Figura 11), mais freqüente dentro da amostra.

Os dois haplótipos mais freqüentes (29-Soli23 e o 21-NegroB11) originaram os demais haplótipos presentes dentro da amostra, corroborando com a teoria da coalescência (Figura 11). Essa teoria parte da premissa que um haplótipo com alta freqüência provavelmente está presente dentro da população há muito tempo e os novos mutantes são derivados dos haplótipos comuns (Posada & Crandall, 2001), ou seja, a maioria dos novos mutantes são derivados de haplótipos comuns, implicando que variantes mais raras representam mutações mais recentes e são mais propícios a estarem



relacionados a haplótipos comuns do que a outros variantes raros (Excoffier & Langaney, 1989).

Os “loops” encontrados são produtos de homoplasias e precisamente indicam a ocorrência de reversão ou mutações paralelas (Posada e Crandall, 2001). O haplótipo Pará-b14 conectou-se com os haplótipos de *T. manatus* procedentes da Guiana e Brasil (Figura 11).

Nessa análise, o haplótipo Pará-81 proveniente do Rio São Manoel (Tribo Mundurucu) não conectou-se a nenhum dos haplótipos (Figura 11). Esse haplótipo apresenta diferença em uma única base (na posição 60) ausente em todos os outros haplótipos. Além disso, o haplótipo Japurá-I2 foi considerado igual ao haplótipo Japurá-I1 (ambos provenientes do Lago Amanã), pois a diferença entre eles está em um base não identificada (“missing”).

De um modo geral, as diferenças observadas nas comparações entre os haplótipos contém informações a respeito da história evolutiva dessas seqüências (Hudson, 1990). Dentre essas informações destacam-se aquelas que evidenciam quais as seqüências mais relacionadas entre si e aquelas que fornecem dados a respeito do ponto em que, no tempo, as seqüências coalescem, isto é, onde se localiza sua seqüência ancestral comum mais recente.

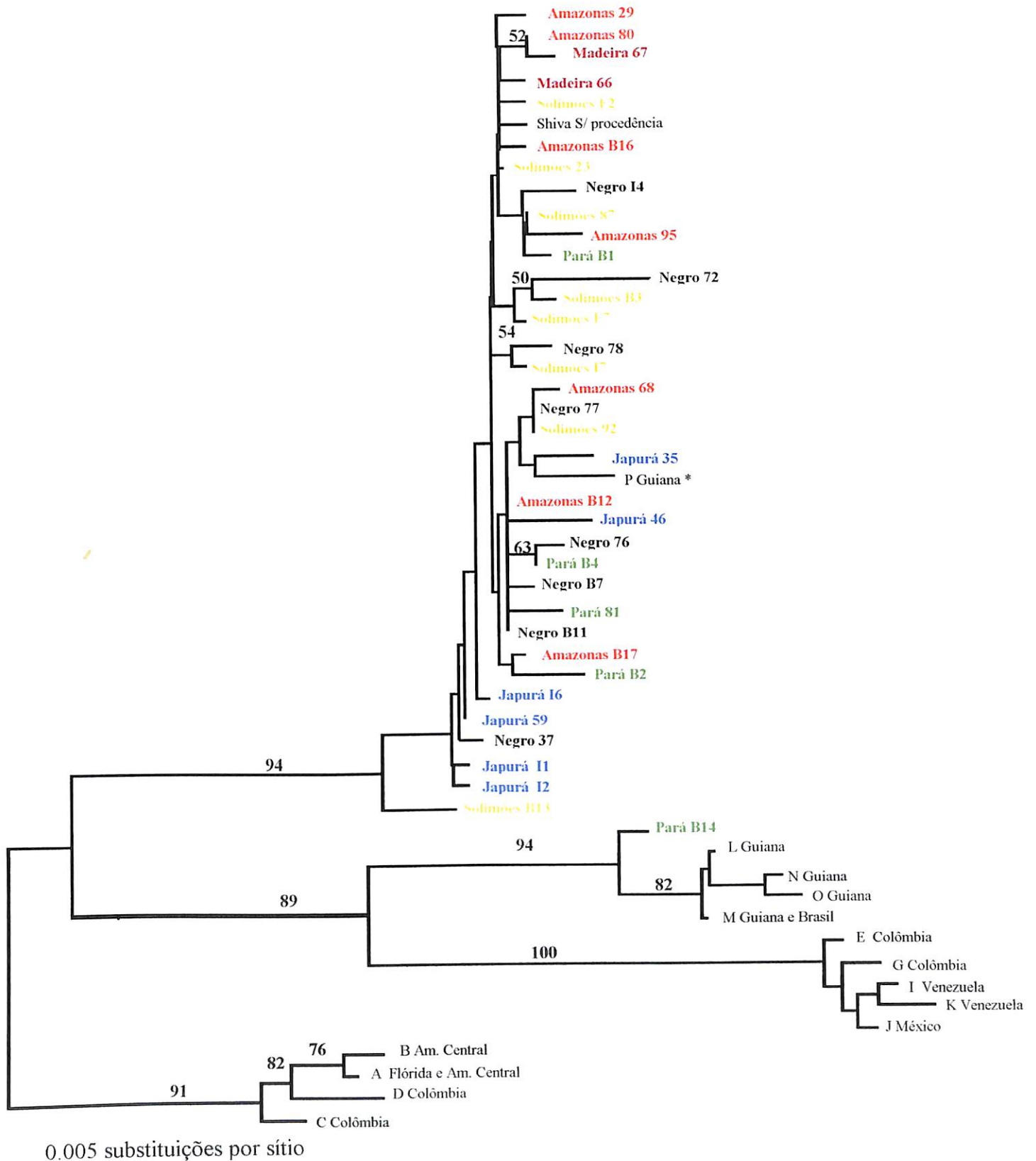
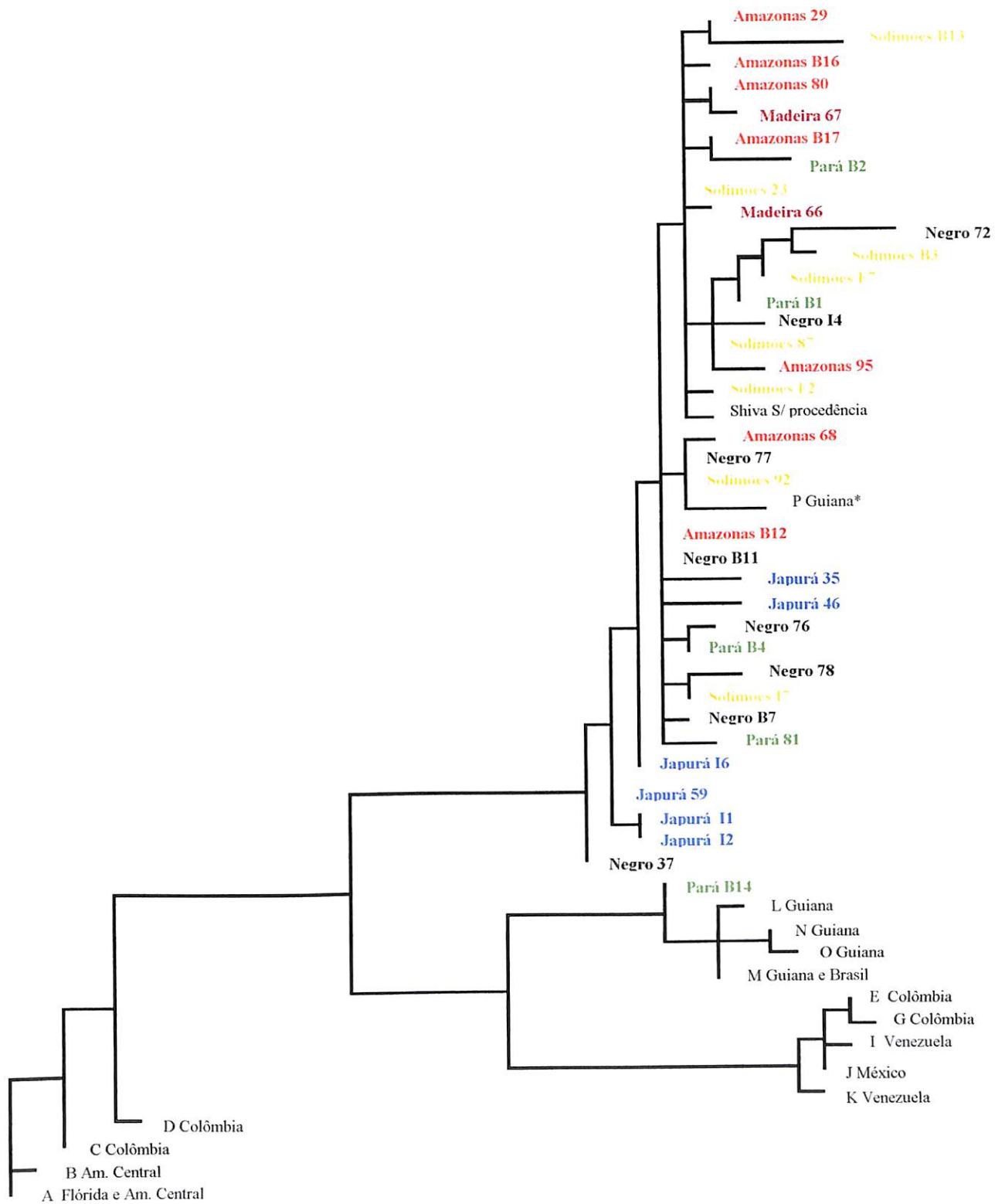


Figura 8: Árvore de distância com os 37 haplótipos de *T. inunguis*, obtida pelo agrupamento dos vizinhos, corrigida pelo modelo HKY + Gamma. Os haplótipos de *T. inunguis* estão distribuídos de acordo com a procedência e os de *T. manatus* com as letras do alfabeto. Os números nos ramos da árvore correspondem aos valores do bootstrap.

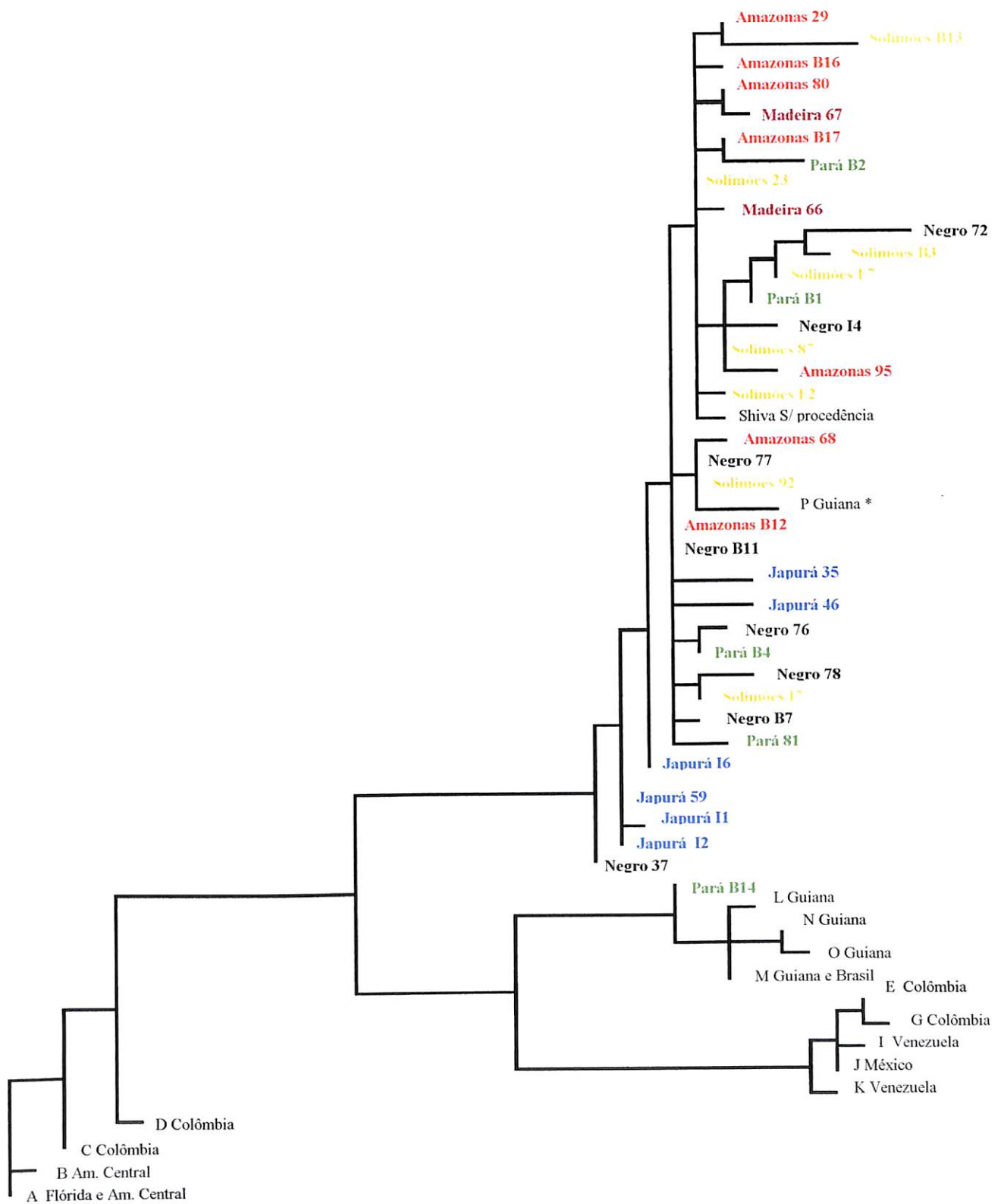
\* O haplótipo "P" da Guiana é de *T. manatus*, porém filogeneticamente está mais próximo de *T. inunguis* (Garcia-Rodrigues *et al.*, 1998).



1 mudança

Figura 9: Árvore obtida por Máxima Verossimilhança ( $Ln = -1144.94667$ ) dos 37 haplótipos de *T. inunguis*, corrigida pelo modelo HKY + Gamma. Os haplótipos de *T. inunguis* estão distribuídos de acordo com a procedência e os de *T. manatus* com as letras do alfabeto.

\* O haplótipo "P" da Guiana é de *T. manatus*, porém filogeneticamente está mais próximo de *T. inunguis* (Garcia-Rodrigues *et al.*, 1998).



1 mudança

Figura 10: Árvore obtida por Máxima Verossimilhança ( $Ln = -1144.94667$ ) dos 37 haplótipos de *T. inunguis*, corrigida pelo modelo HKY + Gamma. Os haplótipos de *T. inunguis* estão distribuídos de acordo com a procedência e os de *T. manatus* com as letras do alfabeto.

\* O haplótipo "P" da Guiana é de *T. manatus*, porém filogeneticamente está mais próximo de *T. inunguis* (Garcia-Rodrigues *et al.*, 1998).

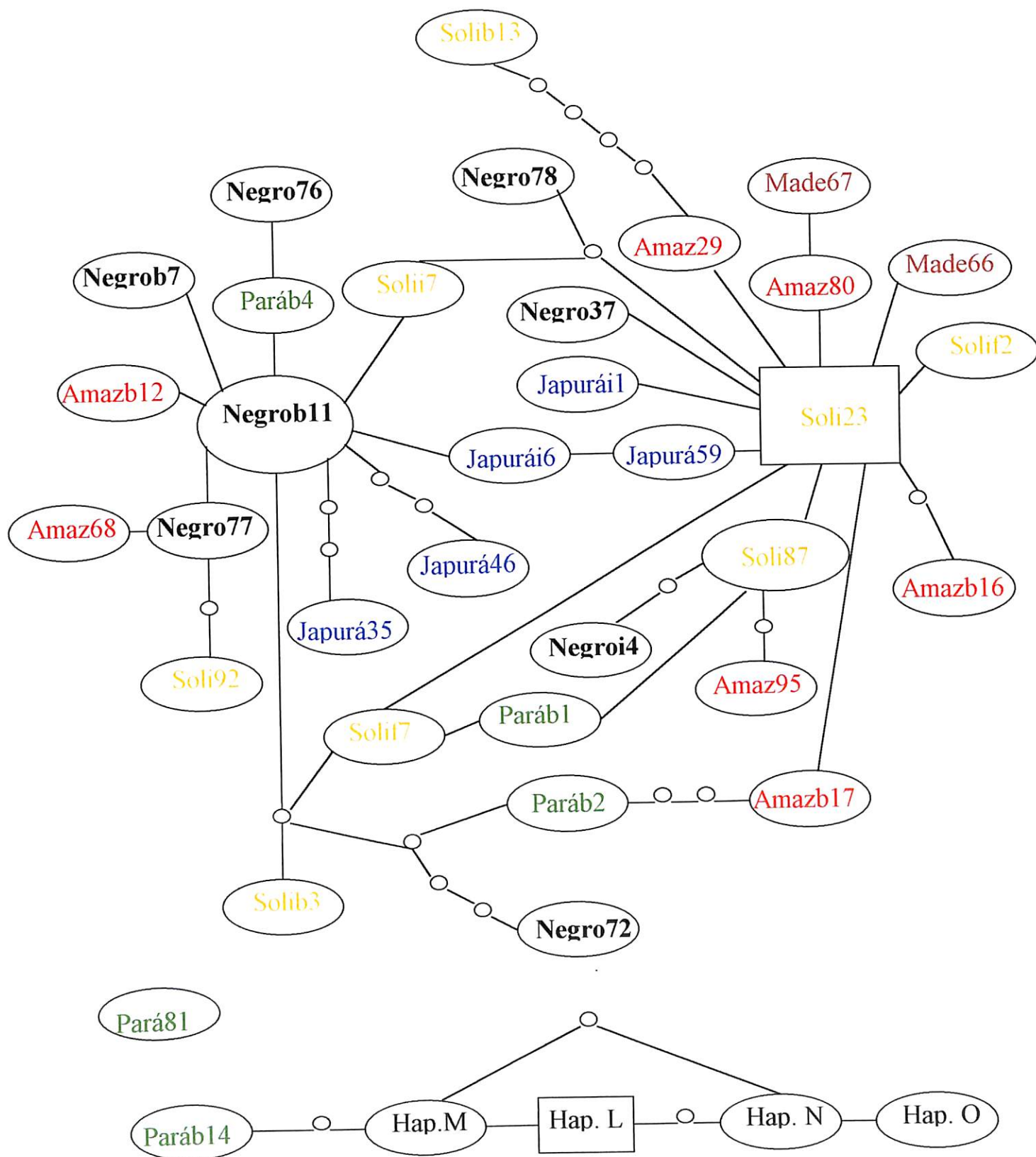


Figura 11: Network das seqüências da região controle do DNA mitocondrial estimada com o método da estatística da parcimônia de Templeton *et al.* (1992). O tamanho dos círculos é proporcional a freqüência dos haplótipos. Cada linha indica uma mutação entre os haplótipos e os círculos menores representam haplótipos hipotéticos que existem (ou já existiram), porém não foram amostrados.

#### 6.4 PALEOGEOGRAFIA DO ECOSSISTEMA AMAZÔNICO DURANTE O CENOZÓICO E UMA INFERÊNCIA SOBRE A EVOLUÇÃO DO PEIXE-BOI AMAZÔNICO.

Os processos naturais que deram origem a biota amazônica podem ser reconstruídos através de dados paleontológicos e geológicos, com fósseis de vertebrados e rochas sedimentares.

A fisionomia atual da Bacia Amazônica iniciou a ser moldada há cerca de 20 milhões de anos atrás, com sua geomorfologia sendo grandemente influenciada pelas transformações durante o final do Terciário e Quaternário (Ayres, 1996). Três eventos exerceram um importante papel sobre a fisionomia da região durante esses períodos: as mudanças no nível do mar, a distribuição das chuvas e os processos de sedimentação da bacia (Ayres, 1996).

No Cenozóico, grandes áreas da Amazônia foram alagadas (Rosseti & Toledo, 1998). Uma região estuarina foi criada com a mistura das águas dos rios e das incursões marinhas, suportando uma diversidade de recursos alimentares, particularmente para animais aquáticos com tolerância a diferenças osmótica entre sistemas de água doce e salgada (Hamilton *et al.*, 2001). A grande disponibilidade de alimento foi um dos fatores primordiais para a irradiação dos mamíferos aquáticos na Amazônia nesse período (Domning, 1982; Hamilton *et al.*, 2001).

Depósitos marinhos do Mioceno inferior, na formação do Pirabas (costa do Pará), registram uma variedade de animais como bivalves, gastrópodes, corais, crustáceos e nessa mesma formação, Couto (1956) descreveu um fóssil de um sirênio, o *Sirenotherium pirabensis*. Durante o médio Mioceno grandes depósitos de areia e lama estavam embutidos em regiões estuarinas na

Amazônia oriental. Nesse período foi encontrado o fóssil de *Potamosiren magdalensis*, Reinhart 1951, descoberto na fauna de La Venta na Bacia do rio Magdalena na Colômbia (Domning, 1982). Porém, a grande diversificação dos trichechídeos do novo Mundo provavelmente ocorreu no final do Plioceno e Pleistoceno, período onde foram encontrados o *Ribodon* na Bacia de La Plata e Carolina do Norte e seu descendente *Trichechus* sp (“primitivo”) na América do Norte, já caracterizados pela reposição dos dentes molares (Domning, 2001).

Domning (1982), propõe que trichechídeos “primitivos” podem ter entrado na Amazônia ou pelo Pacífico, ou por conexões intermitentes (incursões) ou através de correntes em outros lados da Bacia. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que possivelmente esses trichechídeos entraram pela costa norte do Oceano Atlântico na América do Sul (provavelmente pela Guiana e Venezuela e pela foz do Amazonas), durante a incursão do médio Mioceno .

Depois das incursões do médio Mioceno, o influxo marinho foi muito reduzido no oeste da Amazônia devido o levantamento da Cordilheira Leste, cortando a conexão com o Pacífico através dos Andes (Hoorn, 1994; 1996). Nesse período houve a formação do grande lago amazônico onde provavelmente uma população ancestral de *Trichechus* ficou isolada das populações da costa, e esse pool genético por alopatria originou o peixe-boi amazônico (Domning, 1982).

Para adaptar-se a esse novo ambiente da Bacia Amazônica, *T. inunguis* desenvolveu-se mais rapidamente que as populações remanescentes da costa, apresentando mais caracteres derivados (Domning, 1982).

Hoje, o Novo Mundo possui duas espécies de trichechídeos, o peixe-boi da amazônia e o peixe-boi marinho, sendo que o peixe-boi da Flórida é reconhecido como uma subespécie (*T. manatus latirostris* (Harlan)) distinta do peixe-boi das Antilhas (*T. manatus manatus* Linnaeus) (Domnig, 2001). Com base nos resultados filogenéticos obtidos nesse trabalho pode-se inferir a existência de um ancestral comum que originou a espécie *T. inunguis* e *T. manatus* da Antilhas, já que filogeneticamente estas duas espécies estão tão próximas a ponto de compartilharem polimorfismo ancestral.

## 7. CONCLUSÕES

- 1- A utilização do *D-loop* como marcador molecular permitiu o conhecimento de parte da variabilidade genética dos peixes-bois amazônico. *T. inunguis* apresenta variabilidade genética relevante comparada com *T. manatus* e os haplótipos da área do Pará apresentaram maior diversidade genética dentre as seis áreas da Bacia Amazônica amostradas;
- 2- Medidas indiretas sugerem a existência de fluxo gênico entre as populações de *T. inunguis* na Amazônia Brasileira. Entretanto, a confirmação de populações reprodutivamente isoladas necessitam de investigação que ateste de forma direta a ocorrência de migrantes entre as populações.



- 3- O grau de isolamento e diferenciação entre as populações são muito importantes no contexto evolutivo e ecológico e altamente relevante para o manejo e conservação de populações naturais. A ausência de estruturação genética associada a geografia dos haplótipos de *T. inunguis* observadas nas análises filogenéticas, indicam que podem ocorrer migrações a longa distância, isso diminuiria o risco de eventuais translocações para manejo de indivíduos.
  
- 4- Na região estuarina do Amazonas (área do Pará) foi encontrado um indivíduo da espécie *Trichechus inunguis* proximamente relacionada com haplótipos de *T. manatus*, sugerindo a manutenção de polimorfismo ancestral.

Estudos sobre a variabilidade genética de organismos e/ou populações proporcionam importantes ferramentas de investigação em diversos ramos da ecologia, sistemática, entre outros, tais como verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo em análise forense visando a identificação de espécies ameaçadas de extinção em produtos industrializados (Pereira *et al.*, 2001).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. 1997. *Biologia molecular da célula*. 3.ed. Porto Alegre. 1292p.
- Alves-Gomes, J. A.; Orti, G.; Haygood, M.; Heiligenberg, W. & Meyer, A. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their eletrogenic system: a synthesis based on morphology, eletrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12 (2): 298-318.
- Aquadro, C. F. & Greenberg, B. D. 1983. Human Mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287-312.
- Assis, M. F. L.; Best, R. C.; Barros, R. M. S.; Yonenaga-Yassuda, Y. 1988. Cytogenetic study of *Trichechus inunguis* (Amazonian manatee). *Revista Brasileira de Genética*, 11: 41-50.
- Avise, J. C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43: 1192-1208.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, USA. 511p.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.
- Avise, J. C.; Neigel, J. E. & Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal. Molecular. Evolution*, 20: 99-105.

- Avise, J. C.; Arnold, J. & Ball, R. M. ., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecological Systematics*, 18: 489-522.
- Avise, J. C.; Quattro, J. M.; Wrijenhoek, R. C. 1992. Molecular clones within organismal clones: mitochondrial DNA phylogenies and evolutionary histories of unisexual vertebrates. *Evolutionary biology*, 26: 225-246.
- Ayres, J. M. 1996. *As matas de várzea do Mamirauá: médio Solimões*. Brasília-DF: CNPq: Sociedade Civil Mamirauá.123p.
- Ayres, J. M. & Best, R. C. 1979. Estratégias para a conservação da fauna amazônica. *Suplemento Acta Amazônica*, 9 (4): 81-101.
- Batista, J. S. 2001. *Estimativa da variabilidade genética intra-específica da dourada – Brachyplatystoma flavicans Castelnau 1855 (Pimelodidae – Siluriformes) no Sistema Estuário- Amazonas –Solimões*. Dissertação de mestrado. INPA/FUA. 97p.
- Baker, C. S.; Cipriano, F. & Palumbi, S. R. 1996. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology*, 5: 671-685.
- Bermingham, E.; Rohwer, S.; Freeman, S. & Wood, C. 1992. Vicariance biogeography in the Pleistocene and speciation in North American wood warblers, a test of Mengel's model. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, (89): 6624-6628.
- Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology.*, 7: 367-369.

- Best, R. C. 1981. Foods and feeding habits of wild and captive Sirenia. *Mammal Review*, 11: 3-29.
- Best, R. C. 1982. Seasonal breeding in the Amazonian Manatee, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Biotropica*, 14 (1): 76-78.
- Best, R. C. 1983. Apparent dry-season fasting in Amazonian Manatees (Mammalia: Sirenia). *Biotropica*, 15 (1): 76-78.
- Best, R. C. 1984. The aquatic mammals and reptiles of the amazon. *In The Amazon Limnology and Landscape Ecology of A Mighty Tropical River and Its Basins*. (Sioli, H. ed.). Dr. W. Junk Publisher, Dordrecht. p. 371-412.
- Best, R. C. & da Silva, V. M. F. 1979. Peixe-boi, uma sereia na represa? *Cespaquista*, 16, (3): 25-29.
- Best, R. C. & da Silva, V. M. F. 1983. Distribution of freshwater dolphins and manatees in the upper Rios Negro and Orinoco. *Abstracts of the biennial conference on the biology of marine mammals*, Boston, p.9.
- Brandley, J. L.; Wrigth, S. D. & McGuire, P. M. 1993. The Florida manatee: cytochrome *b* DNA sequences. *Marine Mammal Science*, 3: 313-202.
- Brown, W. M.; George, M. Jr. & Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 503-511.
- Brown, W. M. 1981. Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 361:119-134.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of mitochondrial DNA. *In: Evolution of Genes and Proteins*. (M. Nei & R. K. Koehn eds.). Sinauer, Sunderland, MA. p. 62-88.
- Brown, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. *In: Molecular Evolutionary Genetics*. (R. J. MacIntyre eds.). Plenum Press, New York. p. 95-130.

- Brown, W. M.; Prager, E. M.; Wang, A. & Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo mode of evolution. *Journal Molecular Evolution*, 18:225-239.
- Brown, W. M.; Gadaleta, G.; Pepe, G.; Saccone, C. & Sbiza, E. 1986. Structural conservation and variation in the *D-loop* containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal Molecular Evolution*, 192: 503-511.
- Caldwell, D. K. & Caldwell, M. C. 1985. Manatees *Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758; *Trichechus senegalensis* Link, 1795 and *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883). In *Handbook of Marine Mammals*. (Ridgway, S. H. & Harrison, R. eds), vol. 3. *The Sirenians and Baleen Whales*, p. 33-66. Academic press, London.
- Cann, R. I.; Brown, W. M. & Wilson, A. C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, (106): 479-499.
- Chacón, Z. M. R. 2001. *Características alimentares e nutricionais do peixe-boi da amazônia Trichechus inunguis (Mammalia: Sirenia) em condições de cativeiro*. Tese de doutorado. INPA/FUA. 170p.
- Clement, M.; Posada, D. & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Evolution*, 9: 1657-1659.
- Colares, I. G. 1991. *Hábitos alimentares do peixe-boi do Amazonas (Trichechus inunguis, Mammalia; Sirenia)*. Tese de mestrado. Inpa/Fua. 119p.
- Cruzan, M. B. & Templeton, A. R. 2000. Paleogeography and coalescence: Phylogeographic analysis of hypothesis from the fossil record. *Tree.*, 15: 491-496.

- da Silva, M. N. F. & Patton, J. L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology*, 7:475-486.
- da Silva, V. M. F. 1996. Os mamíferos aquáticos do Amazonas, sua organização social e comportamento. *Anais de Etologia*, 14: 263-213.
- da Silva, V. M. F.; D’Affonseca Neto., J. A; Matos, G. E. & Sousa Lima, R. S. 2000. Duração da lactação em peixe-boi da amazônia (*Trichechus inunguis*): estudo de caso de filhote nascido em cativeiro. *9º Reunión de Trabajo de Especialistas em Mamíferos Acuáticos da América del Sur*. Buenos Aires. Argentina. p. 39.
- De Jong, W. W. 1998. Molecules remodel the mammalia tree. *Tree*. 13: 270-275.
- De Jong, W. W. & Zweers, A. 1980. Confirmação da relação entre peixes-bois, “hyraxes” e elefantes, por meio do estudo da proteína das lentes dos olhos. *Acta Amazonica*. 10 (4): 897-902.
- Dizon, A. E.; LeDuc, C. A. & LeDuc, R. G. 1991. Molecular analysis of the mitochondrial DNA types in exploited populations of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). Report of the International Whaling commission (special Issue 13): 183-202.
- Dizon, A E.; Perrin, W. F.; Amos, W.; Baker, C. S.; Chivers, S. J.; Costa, A. S.; Curry, B. E.; Gaggiotti, O.; Hoelzel, A. R.; Hofman, R.; Le Duc, R. G.; Loughlin, T. R.; Luz, C. A.; O’Corry-Crowe, G. M.; Rosel, P. E.; Rosemberg, A.; Scribner, K. T.; Taylor, B. L. 1997. Report of the Workshop. In: *Molecular Genetics of Marine Mammals* (Dizon, A E; Chivers S. J.; Perrin W. E. eds). Special publication. The Society of Marine Mammals, 3:3-48.

- Domning, D. P. 1978. The miology of the amazonian manatee, *Trichechus inunguis* (Natterer) (Mammalia: Sirenia). *Acta Amazônica*, 8 (2) Suppl. 1, 81pp
- Domning, D. P. 1981. Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. near the mouth of the Amazon River, Brazil. *Biological Conservation*, 19: 85-97.
- Domning, D. P. 1982. Evolution of manatees. A speculative history. *Journal of Paleontology*, 56:599-619.
- Domning, D. P. 2001. Sirenians, seagrasses, and Cenozoic ecological change in the Caribbean. *Palaeogeog., Palaeoclim., Palaeoecol.*, 16: 27-50.
- Domning, D. P. & Hayek, L. 1986. Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: *Trichechus*). *Mar. Mammal Science*, 2: 87-144.
- Durand, J. D.; Templeton, A. R.; Guinand, B.; Imsiridou, A & Bouvet, Y. 1999. Nested clade and phylogeographic analyses of the chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: Implications for Balkan Peninsula Biogeography. *Mol. Phyl. Evol.*, 13: 566-580.
- Excoffier, L. & Langaney, A. 1989. Origin and differentiation of mitochondrial DNA. *Am. J. Hom. Genet.*, 44:73-85.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Futuyma D. J., 1992. *Biologia evolutiva*. 2 ed. Ribeirão Preto, SBG/CNPq. 646p.

- Garcia-Rodriguez, A. I.; Bowen B. W.; Domning D.; Mignucci-Giannoni A. A.; Marmontel M., Montoya-Ospina R. A.; Morales-Vela B.; Rudin M.; Bonde R. K. & McGuire P. M. 1998. Phylogeography of the West Indian Manatee (*Trichechus manatus*): How Many Populations and How Many Taxa? *Molecular Ecology*, nº 7, p. 1137-1149.
- Garcia-Rodriguez, A. I.; Moraga-Amador, D; Farmerie, W; McGuire, P. & King, L. 2000. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and their application in selected Sirenian species. *Molecular Ecology*., 9: 2155-2234.
- Hall, T. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95-98.
- Hamilton, H.; Caballero, S.; Collins, A. G. & Brownell Jr., R. L. 2001. Evolution of river dolphins. *Proc. R. Soc. Lond.*, 268: 549-558.
- Hasegawa, M.; Kishino, H. & Yano, T.; 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22: 160-174.
- Hayashi, J. L.; Tagashira, Y. & Yoshida, M. C.1985. Absence of extensive recombination between inter and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, 160:387-395.
- Hillis, D. M.; Moritz, C. & Mable, B. K. 1996. *Molecular Systematics* 2<sup>a</sup> ed. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Hoebel, A. R. & Dover, G. A . 1991. Mitochondrial *D-loop* DNA Variation Within And Between Populations Of The Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata*) *In: Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. (A. Rus Hoelzel Ed.). p. 171-182.



- Horn, C. 1994. An environment reconstruction of the paleo-amazon river system (middle-late Miocene, NW Amazonia). *Paleogeog. Paleoclim. Paleoecol.*, 112: 187-238.
- Horn, C. 1996. Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*. p.273.
- Hrbek, T.; Farias, I. P.; Crossa, M.; Sampaio, I. Porto, J. I.; Meyer, A. (no prelo). Population genetics of *Arapaima gigas*, one of the biggest freshwater fishes the Amazon basin: implications for its conservation. *Conservation biology*.
- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Ecol. Biol.*, 7: 1-44.
- Huesenbeck, J. P. 1995. The robustness of two phylogenetic methods: four taxon simulations reveal a slight superiority of a maxima likelihood over neighbor-joining. *Molecular Evolution Biology*, 12:843-849.
- Hussar, S. L. 1977. *Trichechus inunguis*. *Mammalian species*, 72: 1-41.
- IBAMA. 2001. Mamíferos aquáticos do Brasil: Plano de ação. *Brasília*. 96p.
- IPAAM. 1997. Proposta de criação da reserva de desenvolvimento sustentável Amanã.
- Junk, W. J. & da Silva, V. M. 1997. Mammals, Reptiles and Amphibians. In: *Ecological Studies* ( Junk, W. ed), (126): 409-417.
- Kimura, M. & Maruyama, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res.* 18: 123-131.
- Kuhner, M. K. & Felsenstein, J. 1994. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology Evolution* 11: 459-468.

- Lavergne, A.; Douzery, E.; Stichler, T.; Catzeflis, F. M. & Springer, M. S. 1996. Interordinal mammalian relationships: evidence for Paenungulate monophyly is provided by complete mitochondrial 12S rRNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 2 (6): 245-258.
- Li, W. H.; Gojobori, T. & Nei, M. 1981. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature*. 229: 237-239.
- Li, W. H. & Graur, D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. 284p.
- Li, W. H. 1997. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., publishers, Sunderland. 284p.
- Margulis, L. 1981. The origin of plant and animal cells. *Am. Sci.*, 59: 230-235.
- Marsh, H. O'Shea, T. J. & Best, R. C. 1986. *Research on Sirenians*. *AMBIO*, 15 (3), 177-180.
- McClenaghan, L. R. Jr.; & O'Shea, T. J. 1988. Genetic variability in the Florida manatee (*Trichechus manatus*). *Journal of Mammology*, 69: 481-488.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochimistry and Molecular biology of fishes*, 2: 1-38.
- Meyer, D.; Dornelas, M. C. & Vieira, M. L. C. 1996. Série monográfica nº3. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. *Revista Brasileira de Genética*. 210p.
- Miyamoto, M. M. & Goodman, M. 1986. Biomolecular systematics of eutherian mammals: phylogenetic patterns and classification. *Syst. Zool.*, 35:230-140.
- Moller, L. & Beheregaray, L. 2001. Coastal bottlenose dolphins from southeastern Australia are *Tursiops aduncus* according to sequences of the mitochondrial DNA control region. *Mar. Mammal. Science*, 17 (2): 249-263.

- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press. 512p.
- Novarek, M. J.; Wyss, A. R. & McKenna, M. C. 1988. The mayor groups of eutherian mammals. *In: The phylogeny and classification of the tetrapods*. (M. J. Benton ed). Claredon, Oxford. p. 31-71.
- O'Corry-Crowe, G. M.; Sudam, R. S.; Rosenberg, A.; Frost, K. J. & Dizon, A. E. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphynapterus leucas* in the western Nearctic reveled by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 6: 955-970.
- Ozawa, T.; Hayashi, S. & Mikhelson, V. M. 1997. Phylogenetic position of mammoth and Steller's sea cow within tethytheria demonstrated by mitochondrial DNA sequences. *Journal Molecular Evolution.*, 44: 406-413.
- Couto, P. C. 1956. Mamíferos fósseis do Cenozóico da Amazônia. *Bol. Cons. Nac. Pesq. (Brasil)* 3: 1-121.
- Palumbi, S. R.; Martin, A. P.; Kessing, B. & McMillan, W O. 1991. Detecting population structure using DNA mitochondrial. *Report of the International Whaling Commission*, 16:26-50.
- Pereira, S. L., Miyaki, C. Y, Russo, C. A.. 2001. Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos. *In: Biologia molecular e evolução* (Matioli ed.). Holos, Ribeirão preto. P. 117-129.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14(9): 817-818.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies : trees grafting into networks. *Tends in ecology and evolution*, 16: 37-45.

- Primack, R. B.; Rodrigues, E. 2001. *Biologia da conservação*. Midiograf editora. Londrina. 328p.
- Reinhart, R. H. 1951. A new genus of sea cow from the Miocene of Colombia. *Bull. Univ. Calif. Dept. Geol. Sci.* 28 (9): 203-213.
- Reynolds, J. E. & Odell, D. K. 1991. *Manatees and Dugongs*. Facts on File. New York. 192p.
- Rosas, F. C. W. 1991. Peixe-boi da amazônia, *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883). In: *Estado de Conservación de los Mamíferos Marinos Del Atlantico Sudoccidental*. (H.L. Cappozzo & M. Junin eds.), p. 178-181. Informe y estudios del programa de Mares Regionales del PNUMA, nº138, 250p.
- Rosas, F. C. W. 1994. Biology, conservation and status of the Amazonian Manatee *Trichechus inunguis*. *Mammal Rev.*, 2(24): 49-59.
- Rosel, P. E.; Dizon, A. E. & Heyning, J. E. 1994. Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Mar. Biol.*, 119:159-167.
- Rosel, P. E. & Reeves, R. R. 2000. Genetic and demographic considerations for the conservation of Asian River cetaceans. In: *Biology and conservation of freshwater cetaceans in Asia*. Reeves & Smith (eds.). IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, p. 144-152.
- Rosseti, D. F. & Toledo, P. M. 1998. Evolution of ecosystems in Amazonia during the last 25 million years. In: *Amazonia heaven of a new world* (Freitas ed) R. J. Campus. 315p.
- Rozas, J. & Rozas, R. 1999. DnaSP. V.2.5.2. DNA sequences polymorphism analysis. *Bioinformatics*, 15:174-175.

- Russo, C. A. M.; Miyaki, C. Y. & Pereira, S. L. 2001. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. *In: Biologia molecular e evolução* (Matioli ed.). Holos, Ribeirão preto. p. 108-116.
- Saccone, C.; Pesole, G. & Sbisa, E. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J. Mol. Evol.*, 33: 83-91.
- Schneider, C. J.; Cunningham, M.; Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the wet Tropics rainforests of Australia. *Molecular Ecology*, 7: 487-498.
- Schneider, S. Keuffer, J.M., Roessli D., & Excoffier, L. 1997. Arlequin ver 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Shoshani, J. & McKenna, M. C. 1998. Higher taxonomic relationships among extant mammals based on morphology with selected comparisons of results from molecular data. *Mol. Phyl. Evol.* 3 (9): 572-584.
- Sousa-Lima, R. S. 1999. *Comunicação acústica em peixe-boi (Sirenia: Trichechidae): repertório, discriminação vocal e aplicações no manejo e conservação das espécies no Brasil*. Dissertação de mestrado. UFMG. 74p.
- Southern, S. O.; Southern, P. J. Dizon, A. E. 1988. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 28: 32-42.
- Springer, M. S. & Kirsch, J. A. W. 1993. A molecular perspective on the phylogeny of placental mammals based on mitochondrial 12S rRNA sequences, with special reference to the problem of the Paenungulate. *J. Mammal. Ecol.* 1: 149-166.

- Steel, M. & Penny, D. 2000. Parsimony, likelihood, and role of models in phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 839-850.
- Strachan, T. & Read, A. P. 1996. *Human molecular genetics*. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd. 610p.
- Sullivan, J. P. 1997. *A phylogenetic study of the neotropical hypopomid electric fishes (Gymnotiformes: Rhamphichthyoidea)*. Tese de doutorado. Universidade de Duke. 336p.
- Swofford, D. L. 1999. Paup: Phylogenetic analysis using parsimony, v. 4.0. Sinauer associates, Sunderland.
- Tagliaro, C. H. 1997. *A filogenia molecular na subfamília Callitrichianae (Platyrrhini (Primates): as relações intergenéricas e intragenéricas de Callithrix (sensu Scheider et al. 1996)*. Tese de doutorado. UFPA. 187p.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in infinite populations. *Genetics*. 105: 437-460.
- 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 sequences data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- Wang, J. Y.; Chou, L. S. & White, B. N. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (Genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Mol. Evol.*, 8: 1603-1612.
- Wolstenholme, D. R. & Clary, D. O. 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, 109: 725-744.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian population. *Genetics*, 16: 97-159.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

Yang, D.; Oyaizy, Y; Oyazy, H.; Olson, G. J. & Woese, C. R. 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 4443-4447.

Anexo 1 : Amostras de tecido de *Trichechus inunguis* coletadas e suas respectivas procedência, sexo e local da biópsia.

Amostra	Nº de campo	Procedência	Área	Sexo	Posição geográfica	Local da biópsia
1.	19	Ilha de Trindade	R. Amazonas	M	3° 19' S e 58° 40' E	Nadadeira caudal
2.	63	Mamori-AM	R. Amazonas	F	3° 38' S e 60° 05' E	Nadadeira caudal
3.	88	Careiro-AM	R. Amazonas	M	3° 10' S e 59° 46' E	Nadadeira caudal
4.	54	Amanã-AM	R. Japurá	M	2° 45' S e 64° 30' E	Nadadeira caudal
5.	23	Manacapuru-AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
6.	43	Am central	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
7.	73	Manacapuru –AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
8.	91	Careiro	R. Solimões	F	3° 10' S e 59° 46' E	Nadadeira caudal
9.	B5	Codajás-AM	R. Solimões	M	3° 50' S e 62° 03' E	Nadadeira caudal
10.	19	Manacapuru-AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
11.	79	R. Tacutu –RR	R. Tacutu –RR	F	3° 07' S e 60° 24' E °	Nadadeira caudal
12.	93	Lago Catalão	R. Negro	F	2° 13' S e 60° 08' E	Nadadeira caudal
13.	51	Doado aviaquário de Manaus	sem procedência	M	sem procedência	Nadadeira caudal
14.	112	sem procedência	sem procedência	F	sem procedência	Nadadeira caudal
15.	13	sem procedência	sem procedência	M	sem procedência	Nadadeira caudal
16.	94	Baré	sem procedência		sem procedência	Nadadeira caudal
17.	29	L. dos Reis-AM	R. Amazonas	F	3° 10' S e 59° 42' E	Nadadeira caudal
18.	68	Silves-AM	R. Amazonas	M	2° 50' S e 58° 11' E	Nadadeira caudal
19.	80	Maués-AM	R. Amazonas	M	3° 17' S e 57° 43' E	Nadadeira caudal
20.	F3 (108)	Maués-AM	R. Amazonas	M	3° 17' S e 57° 43' E	Sem dado
21.	95	Urucara	R. Amazonas	F	3° 31' S e 57° 45' E	Nadadeira caudal
22.	B12	Autazes-AM	R. Amazonas	F	3° 38' S e 59° 08' E	Nadadeira caudal
23.	B16	Maués-AM	R. Amazonas	F	3° 17' S e 57° 43' E	Músculo da 6ª costela
24.	B17	Nhamundá-AM	R. Amazonas	F	1° 54' S e 56° 05' E	Pele do dorso
25.	B6	Rio Preto da Eva-AM	R. Amazonas	M	3° 06' S e 59° 17' E	Nadadeira caudal
26.	F11 (112)	Ressaca Apara	R. Japurá	M	2° 49' S e 64° 34' E	Sem dado
27.	B11	Novo Airão-AM	R. Negro	F	2° 42' S e 63° 00' E	Nadadeira caudal
28.	F6 (110)	R. Preto (Tiririca)-AM	R. Negro	M	3° 03' S e 59° 24' E	Nadadeira caudal
29.	111	R. Ariaú-AM	R. Negro	M	3° 05' S e 60° 27' E	Nadadeira caudal
30.	42	Paraná Aranapu-AM	R. Solimões	M	2° 49' S e 64° 34'	Nadadeira caudal
31.	113	Entre Coari/Codajás-AM	R. Solimões	F	3° 10' S e 59° 46'	Nadadeira caudal
32.	89	R. Tapajós	R. Tapajós-PA	M	2° 25' S e 55° 10'	Nadadeira caudal
33.	B9	Vigia-PA	Baía de Marajó-PA	M	0° 49' S e 48° 08'	Nadadeira caudal
34.	90	Filha da Boo	Cativeiro	F	Cativeiro	Nadadeira caudal
35.	18	Erê (filho da Boo)	Cativeiro	M	Cativeiro	Nadadeira caudal
36.	2	Boo	sem procedência	F	sem procedência	Nadadeira caudal
37.	35	L. Amanã-AM	R. Japurá	F	2° 45' S e 60° 30' E	Nadadeira caudal
38.	46	L. Amanã-AM	R. Japurá	M	2° 45' S e 60° 30' E	Estômago
39.	59	L. Amanã-AM	R. Japurá	M	3° 38' S e 60° 05' E	Nadadeira caudal
40.	110	Arandu?	sem procedência	M	sem procedência	Nadadeira caudal
41.	11	Lago Amanã-AM	R. Japurá	F	2° 45' S e 60° 30' E	Nadadeira caudal
42.	12	Lago Amanã-AM	R. Japurá	F	2° 45' S e 60° 30' E	Nadadeira caudal
43.	16	Maraã-AM	R. Japurá	M	3° 41' S e 65° 37' E	Nadadeira caudal
44.	66	L. Araça-AM	R. Madeira	M	3° 36' S e 58° 47' E	Nadadeira caudal
45.	67	Borba-AM	R. Madeira	F	4° 24' S e 59° 29' E	Nadadeira caudal



46.	37	Ariaú-AM	R. Negro	M	3° 05' S e 60° 27' E	Nadadeira caudal
47.	72	Anavilhanas-AM	R. Negro	M	1° 15' S e 62° 15' E	Nadadeira peitoral
48.	76	R. Urubu-Tarumã-AM	R. Negro	M	3° 04' S e 60° 22' E	Nadadeira caudal
49.	77	L. Salvador-AM	R. Negro	F	?	Nadadeira caudal
50.	78	Ariaú-AM	R. Negro	F	3° 05' S e 60° 27' E	Nadadeira caudal
51.	B7	Barcelos-AM	R. Negro	M	0° 59' S e 62° 55' E	Nadadeira caudal
52.	I4	R. Cuieras-AM	R. Negro	M	2° 38' S e 60° 00'	Nadadeira caudal
53.	I5	Lago Xiborena-AM	R. Solimões	M	3° 10' S e 59° 55' E	Nadadeira caudal
54.	B13	Mojú-PA	R. Mojú-PA	M	1° 55' S e 48° 49' E	Nadadeira caudal
55.	81	Tribo Mundurucu-PA	R. São Manoel-PA	M	6° 24' S e 58° 00' E	Nadadeira caudal
56.	B1	Itaituba-PA	R. Tapajós-PA	F	4° 17' S e 56° 00' E	Nadadeira caudal
57.	B2	Juriti-PA	R. Amazonas	M	2° 17' S e 56° 02' E	Nadadeira caudal
58.	B4	Santarém-PA	R. Tapajós-PA	F	2° 11' S e 54° 41' E	Nadadeira caudal
59.	84	Manacapuru-AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
60.	87	Lago Baixio-AM	R. Solimões	M	3° 22' S e 60° 22' E	Nadadeira caudal
61.	B8	Altamira-PA	R. Xingu-PA	F	3° 18' S e 52° 32' E	Nadadeira caudal
62.	92	Catanho-Xiborena	R. Solimões	F	3° 10' S e 59° 55' E	Nadadeira caudal
63.	B14	Manacapuru-AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
64.	B3	Amaná-Am	R. Solimões	M	?	Nadadeira caudal
65.	F2 (104)	Manacapuru-AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Sem dado
66.	F7 (107)	Tefé-AM	R. Solimões	F	3° 25' S e 64° 41' E	Sem dado
67.	I7	Manacapuru –AM	R. Solimões	M	3° 19' S e 60° 37' E	Nadadeira caudal
68.	Shiva	sem procedência	sem procedência	F	sem procedência	Nadadeira caudal

Anexo 2: Número e frequência total dos haplótipos encontrados (incluindo os sem procedência) das 68 amostras de *Trichechus inunguis* analisadas.

amostras	frequência haplotípica total	5	10	15	20	25
amazonas29	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
amazonas68	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
amazonas80	2	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
amazonas95	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
amazonasb12	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
amazonasb16	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
amazonasb17	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
japura35	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
japura46	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATA
japura59	2	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
japurai1	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
japurai2	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
japurai6	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
madeira66	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
madeira67	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negro37	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negro72	1	GTGCT	TCCCTC	CCATA	TAGTA	CTATC
negro76	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negro77	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negro78	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negrob11	13	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negrob7	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
negroi4	2	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
Pará81	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
Paráb1	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
Paráb14	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
Paráb2	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
Paráb4	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimões23	15	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimões87	3	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimões92	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimõesb13	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimõesb3	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	CAGTA	CTATC
solimõesf2	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimõesf7	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
solimõesi7	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
SPshiva	1	GTGCT	CCTCC	CCATA	TAGTA	CTATC
37 haplótipos	68 amostras					

	30	35	40	45	50	55	60	65	70
amazonas29	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
amazonas68	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
amazonas80	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
amazonas95	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
amazonasb12	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
amazonasb16	TATGT	TTA-T	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
amazonasb17	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
japura35	TATGG	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
japura46	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
japura59	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
japurai1	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
japurai2	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
japurai6	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
madeira66	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
madeira67	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negro37	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negro72	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negro76	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negro77	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negro78	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATAA
negrob11	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negrob7	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
negroi4	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
Pará81	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	CATAA	TCGTA	CATTA
Paráb1	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
Paráb14	TATGT	TTTAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
Paráb2	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
Paráb4	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimões23	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimões87	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimões92	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimõesb13	TATGT	TTTAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimõesb3	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimõesf2	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimõesf7	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
solimõesi7	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA
SPshiva	TATGT	TTAAT	CTTGC	ATACA	CCATC	CTATG	TATAA	TCGTA	CATTA

	75	80	85	90	95	100	105	110	115
amazonas29	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAGGT	AATGC
amazonas68	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CGGTA	CAAGT	AATGC
amazonas80	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	TAAGT	AATGC
amazonas95	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	ATTGC
amazonasb12	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
amazonasb16	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
amazonasb17	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
japura35	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
japura46	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
japura59	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
japurai1	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
japurai2	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
japurai6	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
madeira66	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
madeira67	CACTA	TATGC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	TAAGT	AATGC
negro37	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
negro72	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
negro76	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGC	AATGC
negro77	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CGGTA	CAAGT	AATGC
negro78	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
negrob11	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
negrob7	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
negroi4	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CGGTA	CAAGT	AATGC
Pará81	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
Paráb1	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
Paráb14	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AAGTA	CAGTA	TAGAC	AATGC
Paráb2	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AAGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
Paráb4	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGC	AATGC
solimões23	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
solimões87	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
solimões92	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CGGTA	CAAGT	AATGC
solimõesb13	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AAGTA	CAGTA	CAGGT	AATGC
solimõesb3	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
solimõesf2	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGCA	CAGTA	CAAGT	AATGC
solimõesf7	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
solimõesi7	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGC
SPshiva	CACTA	TATAC	CCCAT	GCTTA	TAAGC	AGGTA	CAGTA	CAAGT	AATGT

	120	125	130	135	140	145	150	155	160
amazonas29	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
amazonas68	TCCTA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
amazonas80	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
amazonas95	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
amazonasb12	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
amazonasb16	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
amazonasb17	TCTCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
japura35	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
japura46	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ACTCC	CAACC	ACATG
japura59	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
japurai1	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
japurai2	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
japurai6	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
madeira66	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
madeira67	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negro37	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negro72	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negro76	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negro77	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negro78	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negrob11	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negrob7	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
negroi4	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
Pará81	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
Paráb1	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
Paráb14	TCCTA	GACA-	GTATA	TACCT	TCCAC	TGCAA	ACTCC	CAACC	ACATG
Paráb2	TCTCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
Paráb4	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimões23	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimões87	TCCCA	GACA	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimões92	TCCCA	GACAC	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimõesb13	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimõesb3	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimõesf2	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimõesf7	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
solimõesi7	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG
SPshiva	TCCCA	GACA-	ATATA	TACCT	TCCAC	TGTAA	ATTCC	CAACC	ACATG

	165	170	175	180	185	190	195	200	205
amazonas29	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
amazonas68	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
amazonas80	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
amazonas95	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
amazonasb12	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
amazonasb16	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
amazonasb17	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
japura35	<b>AG</b> TAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
japura46	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
japura59	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
japurai1	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
japurai2	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
japurai6	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
madeira66	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
madeira67	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negro37	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negro72	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negro76	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGAT <b>G</b>	TT-GC	ATAGC	ACATC
negro77	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negro78	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negrob11	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negrob7	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
negroi4	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAG <b>T</b>	ACATC
Pará81	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
Paráb1	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
Paráb14	GATAT	TCT <b>C</b> C	AGTCC	ATTTA	CTCCT	<b>T</b> AATA	TT-GC	ATAGC	ACAT <b>T</b>
Paráb2	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CT <b>T</b> CT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
Paráb4	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimões23	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimões87	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimões92	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT <b>T</b> GC	ATAGC	ACATC
solimõesb13	GATAT	TCT <b>C</b> C	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimõesb3	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimõesf2	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimõesf7	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
solimõesi7	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC
SPshiva	GATAT	TCTTC	AGTCC	ATTTA	CTCCT	TGATA	TT-GC	ATAGC	ACATC

	210	215	220	225	230	235	240	245	250
amazonas29	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
amazonas68	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
amazonas80	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
amazonas95	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGC
amazonasb12	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
amazonasb16	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
amazonasb17	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
japura35	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
japura46	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
japura59	ATACC	CCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
japurai1	ATACC	CCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTTGT
japurai2	ATACC	CCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTYGT
japurai6	ACACC	CCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
madeira66	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
madeira67	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negro37	ATACC	CCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negro72	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negro76	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negro77	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negro78	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negrob11	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negrob7	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
negroi4	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGC
Pará81	ACACC	TCTTA	ATCGC	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
Paráb1	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGC
Paráb14	ATGTT	CCTTA	ATCGT	ACATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTTGC
Paráb2	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
Paráb4	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
solimões23	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
solimões87	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGC
solimões92	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
solimõesb13	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTTGT
solimõesb3	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
solimõesf2	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
solimõesf7	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
solimõesi7	ACACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT
SPshiva	ATACC	TCTTA	ATCGT	CCATA	GCACA	TCACT	TGAAA	TCATT	CTCGT

	255	260	265	270	275	280	285	290	295
amazonas29	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
amazonas68	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
amazonas80	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
amazonas95	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAT-	CAAGC
amazonasb12	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCACA	CAAGC
amazonasb16	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
amazonasb17	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
japura35	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
japura46	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
japura59	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
japurai1	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
japurai2	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
japurai6	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
madeira66	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
madeira67	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negro37	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TTAC-	CAAGC
negro72	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negro76	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negro77	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negro78	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negrob11	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negrob7	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
negroi4	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
Pará81	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
Paráb1	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
Paráb14	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	CTAC-	CAAGC
Paráb2	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
Paráb4	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimões23	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimões87	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimões92	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimõesb13	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimõesb3	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimõesf2	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimõesf7	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
solimõesi7	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC
SPshiva	CAACA	TGCTT	ATCAC	CTCCA	TTAGG	CAGTC	CTTGA	TCAC-	CAAGC



	300	305	310	315	320	325	330	335	340
amazonas29	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
amazonas68	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
amazonas80	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
amazonas95	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
amazonasb12	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
amazonasb16	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
amazonasb17	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
japura35	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
japura46	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
japura59	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
japurai1	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
japurai2	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
japurai6	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
madeira66	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
madeira67	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negro37	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negro72	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negro76	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negro77	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negro78	GCCGA	GAAAC	CAACA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negrob11	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negrob7	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
negroi4	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
Pará81	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
Paráb1	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
Paráb14	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
Paráb2	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
Paráb4	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimões23	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimões87	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimões92	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimõesb13	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimõesb3	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimõesf2	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimõesf7	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
solimõesi7	GCCGA	GAAAC	CAACA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT
SPshiva	GCCGA	GAAAC	CAGCA	ACCCG	CCCTC	ATTTT	GTCCC	TCTTC	TCGCT

	345	350	355	360	364
amazonas29	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
amazonas68	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
amazonas80	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
amazonas95	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
amazonasb12	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
amazonasb16	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
amazonasb17	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
japura35	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
japura46	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
japura59	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
japurai1	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
japurai2	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
japurai6	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
madeira66	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
madeira67	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negro37	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negro72	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negro76	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negro77	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negro78	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negrob11	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negrob7	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
negroi4	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
Pará81	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
Paráb1	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
Paráb14	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
Paráb2	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
Paráb4	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimões23	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimões87	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimões92	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimõesb13	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimõesb3	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimõesf2	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimõesf7	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
solimõesi7	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG
SPshiva	CCGGG	CCCAT	AACTT	GTGGG	GGTG

Anexo 3: Matriz de distância genética corrigida, segundo o modelo HKY mais Gamma, dos 37 haplótipos de *Trichechus inunguis* e dos 14 haplótipos de *Trichechus manatus* incluídos nas análises como grupo externo.

Haplótipo	amaz29	amazb16	amaz80	amaz68	amazb12	negrob11	amazb17	solli23	japura35	japura46	japura59	japurai1
amaz29	0											
amazb16	0.00569	0										
amaz80	0.00576	0.00569	0									
amaz68	0.012	0.01179	0.012	0								
amazb12	0.00578	0.00567	0.00575	0.00578	0							
negrob11	0.00576	0.00569	0.00576	0.00576	0	0						
amazb17	0.00576	0.00569	0.00576	0.012	0.00575	0.00576	0					
solli23	0.00283	0.00281	0.00283	0.00882	0.00282	0.00283	0.00283	0				
japura35	0.01502	0.01487	0.01502	0.01502	0.00868	0.00868	0.01502	0.01179	0			
japura46	0.01502	0.01487	0.01503	0.01502	0.00865	0.00868	0.01503	0.01179	0.01814	0		
japura59	0.00576	0.00569	0.00576	0.012	0.00575	0.00576	0.00576	0.00283	0.01502	0.01503	0	
japurai1	0.00882	0.00868	0.00882	0.01531	0.0088	0.00882	0.00882	0.00576	0.01839	0.0184	0.00283	0
japurai2	0.00576	0.00569	0.00576	0.01203	0.00578	0.00579	0.00576	0.00283	0.01506	0.01512	0	0
japurai6	0.00882	0.00868	0.00882	0.00882	0.00282	0.00283	0.00882	0.00576	0.01179	0.01179	0.00283	0.00576
madeira67	0.00882	0.00868	0.00283	0.01531	0.00883	0.00882	0.00882	0.00576	0.01839	0.01839	0.00882	0.012
madeira66	0.00569	0.00573	0.00569	0.01179	0.00567	0.00569	0.00569	0.00281	0.01484	0.01484	0.00569	0.00868
negro76	0.012	0.01179	0.012	0.012	0.00578	0.00576	0.012	0.00882	0.01502	0.01503	0.012	0.01531
negro72	0.02234	0.02191	0.02235	0.02234	0.01527	0.01531	0.02235	0.01876	0.02555	0.02556	0.02235	0.02608
negro78	0.00868	0.00869	0.00868	0.01503	0.00865	0.00868	0.00868	0.00569	0.01814	0.01814	0.00868	0.01179
negro37	0.00882	0.00868	0.00882	0.01531	0.0088	0.00882	0.00882	0.00576	0.01839	0.0184	0.00283	0.00576
negrob7	0.00868	0.00866	0.00868	0.00868	0.0028	0.00281	0.00868	0.00569	0.01167	0.01167	0.00868	0.01179
negro77	0.00882	0.00868	0.00882	0.00282	0.00285	0.00283	0.00882	0.00576	0.01179	0.01179	0.00882	0.012
negroi4	0.012	0.01179	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.00882	0.0219	0.0219	0.012	0.01531
solli3	0.012	0.01179	0.012	0.012	0.00575	0.00576	0.012	0.00882	0.01502	0.01503	0.012	0.01531
solli87	0.00576	0.00569	0.00576	0.012	0.00575	0.00576	0.00576	0.00283	0.01502	0.01503	0.00576	0.00882
solli7	0.00882	0.00871	0.00882	0.00882	0.00282	0.00283	0.00882	0.00576	0.01179	0.01179	0.00882	0.012
parab14	0.09439	0.09952	0.09447	0.10811	0.10807	0.10822	0.10822	0.10119	0.12842	0.11321	0.09447	0.08803
solif2	0.00576	0.00569	0.00576	0.012	0.00575	0.00576	0.00576	0.00283	0.01502	0.01503	0.00576	0.00882
solif7	0.00576	0.00569	0.00576	0.012	0.00575	0.00576	0.00576	0.00283	0.01502	0.01503	0.00576	0.00882
solli92	0.0088	0.00865	0.00883	0.00284	0.00283	0.00281	0.00883	0.00576	0.01175	0.01181	0.00883	0.01202
parab2	0.01531	0.01506	0.01532	0.01531	0.0088	0.00882	0.00882	0.012	0.0184	0.0184	0.01532	0.01876
solli13	0.01503	0.01821	0.02191	0.02936	0.02191	0.02191	0.02191	0.0184	0.03274	0.03275	0.02191	0.0184
para81	0.012	0.01179	0.012	0.012	0.00575	0.00576	0.012	0.00882	0.01503	0.01503	0.012	0.01531
parab1	0.00882	0.00868	0.00882	0.01531	0.0088	0.00882	0.00882	0.00576	0.01839	0.0184	0.00882	0.012
parab4	0.00882	0.00868	0.00882	0.00882	0.00282	0.00283	0.00882	0.00576	0.01179	0.01179	0.00882	0.012
amaz95	0.01179	0.01167	0.01179	0.01839	0.01178	0.01179	0.01179	0.00868	0.02157	0.02157	0.01179	0.01503
shiva	0.00576	0.00569	0.00576	0.012	0.00575	0.00576	0.00576	0.00283	0.01502	0.01503	0.00576	0.00882
B	0.09616	0.08806	0.08341	0.09616	0.09615	0.09624	0.09624	0.08968	0.11515	0.10095	0.0834	0.08968
A	0.08961	0.0819	0.07739	0.08961	0.08961	0.08968	0.08968	0.0834	0.10785	0.09426	0.07739	0.0834
C	0.07739	0.07041	0.06615	0.08968	0.07735	0.07745	0.07744	0.07167	0.09426	0.08177	0.06615	0.07167
D	0.09633	0.08825	0.08353	0.11036	0.09626	0.09641	0.09641	0.08983	0.11537	0.10114	0.08354	0.08983
E	0.13724	0.12714	0.12122	0.12109	0.12089	0.12122	0.13741	0.12913	0.14289	0.14307	0.12122	0.12913
G	0.1457	0.1351	0.12898	0.12884	0.1287	0.12898	0.14589	0.13724	0.15154	0.15173	0.12898	0.13724
I	0.14906	0.13803	0.13191	0.13174	0.13153	0.13191	0.14927	0.14039	0.15494	0.15516	0.13191	0.14039
K	0.15465	0.14346	0.13718	0.13701	0.13691	0.13717	0.15486	0.14581	0.16068	0.16089	0.13717	0.14581
J	0.1402	0.12972	0.12381	0.12366	0.12346	0.12381	0.14039	0.13191	0.14589	0.14609	0.12381	0.13191
L	0.10863	0.11425	0.10874	0.12369	0.12364	0.12383	0.12391	0.11612	0.12902	0.12908	0.10867	0.10161
N	0.113	0.11863	0.11311	0.12829	0.12821	0.12842	0.12842	0.12059	0.15083	0.13387	0.1131	0.10594
M	0.10812	0.11361	0.10822	0.12311	0.12305	0.12324	0.12325	0.11556	0.14518	0.12855	0.10822	0.10119
O	0.11809	0.12386	0.11819	0.13369	0.13365	0.13382	0.13383	0.12583	0.15673	0.13942	0.11819	0.11088
P	0.01876	0.01847	0.01876	0.012	0.012	0.012	0.01876	0.01532	0.01503	0.02191	0.01876	0.02235

Haplótipo	japurai2	japurai6	madeira67	madeira66	negro76	negro72	negro78	negro37	negrob7	negro77	negroi4	solib3
japurai2	0											
japurai6	0.00285	0										
madeira67	0.00882	0.012	0									
madeira66	0.00569	0.00868	0.00868	0								
negro76	0.01206	0.00882	0.01531	0.01179	0							
negro72	0.02245	0.01876	0.02607	0.02191	0.02234	0						
negro78	0.00868	0.01179	0.01179	0.00863	0.01503	0.02557	0					
negro37	0.00283	0.00576	0.012	0.00868	0.01531	0.02608	0.01179	0				
negrob7	0.0087	0.00569	0.01179	0.00863	0.00868	0.0184	0.01167	0.01179	0			
negro77	0.00885	0.00576	0.012	0.00868	0.00882	0.01875	0.01179	0.012	0.00569	0		
negroi4	0.01203	0.01531	0.01531	0.01179	0.01875	0.02996	0.01503	0.01531	0.01502	0.00882	0	
solib3	0.01206	0.00882	0.01531	0.01179	0.012	0.01531	0.01503	0.01531	0.00868	0.00882	0.01875	0
solib7	0.00579	0.00882	0.00882	0.00569	0.012	0.02235	0.00868	0.00882	0.00868	0.00882	0.00576	0.012
solib7	0.00885	0.00576	0.012	0.00868	0.00882	0.01876	0.00569	0.012	0.00569	0.00576	0.01531	0.00882
parab14	0.08839	0.10119	0.1011	0.10603	0.10812	0.14847	0.11332	0.08803	0.11321	0.11545	0.10811	0.12324
solif2	0.00579	0.00882	0.00882	0.00569	0.012	0.02235	0.00868	0.00882	0.00868	0.00882	0.012	0.012
solif7	0.00576	0.00882	0.00882	0.00569	0.012	0.01531	0.00868	0.00882	0.00868	0.00882	0.012	0.00576
solib92	0.00886	0.00576	0.01199	0.00868	0.0088	0.0188	0.01178	0.01202	0.00568	0	0.00885	0.00883
parab2	0.01535	0.012	0.01876	0.01503	0.01531	0.02609	0.0184	0.01876	0.01179	0.012	0.02235	0.01532
solib13	0.01843	0.02556	0.02556	0.02157	0.02936	0.04177	0.02515	0.02556	0.02515	0.02556	0.02936	0.02937
para81	0.01209	0.00882	0.01531	0.01179	0.012	0.02235	0.01503	0.01531	0.00868	0.00882	0.01875	0.012
parab1	0.00885	0.012	0.012	0.00868	0.01531	0.01876	0.01179	0.012	0.01179	0.012	0.00882	0.00882
parab4	0.00888	0.00576	0.012	0.00868	0.00283	0.01876	0.01179	0.012	0.00569	0.00576	0.01531	0.00882
amaz95	0.01182	0.01503	0.01502	0.01167	0.01839	0.02936	0.01484	0.01503	0.01484	0.01502	0.01179	0.0184
shiva	0.00576	0.00882	0.00882	0.00569	0.012	0.02235	0.00868	0.00882	0.00868	0.00882	0.012	0.012
B	0.0837	0.08968	0.08961	0.09426	0.11014	0.13373	0.10104	0.08968	0.10095	0.103	0.11014	0.11025
A	0.07767	0.0834	0.08334	0.08785	0.103	0.12555	0.09433	0.0834	0.09426	0.09616	0.103	0.10309
C	0.0664	0.07168	0.07163	0.07588	0.08969	0.11036	0.08183	0.07167	0.08177	0.0834	0.08968	0.08976
D	0.08389	0.08984	0.08976	0.09441	0.11036	0.13405	0.10122	0.0775	0.10113	0.10319	0.11036	0.11047
E	0.12174	0.11366	0.12898	0.1346	0.13725	0.16466	0.14324	0.11366	0.12652	0.12898	0.12109	0.13741
G	0.12952	0.12109	0.13708	0.14289	0.14571	0.17436	0.15192	0.12109	0.13445	0.13708	0.12884	0.14589
I	0.13254	0.12381	0.14021	0.14608	0.14906	0.17852	0.15537	0.12381	0.13741	0.1402	0.13174	0.14927
K	0.13781	0.12892	0.14563	0.15165	0.15465	0.18464	0.1611	0.12892	0.14282	0.14563	0.13701	0.15485
J	0.1244	0.11606	0.13174	0.13741	0.14021	0.16831	0.14627	0.11606	0.12913	0.13174	0.12366	0.14039
L	0.10213	0.11604	0.116	0.12128	0.12362	0.16841	0.1293	0.10161	0.12916	0.13175	0.12369	0.14043
N	0.10647	0.12059	0.12048	0.12588	0.12829	0.17337	0.13401	0.10594	0.13387	0.13646	0.12829	0.14518
M	0.1017	0.11556	0.11545	0.12071	0.12311	0.16732	0.1287	0.10119	0.12855	0.13113	0.12311	0.13968
O	0.11142	0.12583	0.12572	0.13126	0.13369	0.17972	0.13956	0.11088	0.13942	0.14203	0.13369	0.15093
P	0.0188	0.01532	0.02235	0.0184	0.01876	0.02998	0.02192	0.02235	0.01503	0.00882	0.01876	0.01876

Haplótipo	solii87	solii7	parab14	solif2	solif7	solii92	parab2	solib13	para81	parab1	parab4	amaz95
solii87	0											
solii7	0.00882	0										
parab14	0.09447	0.11568	0									
solif2	0.00576	0.00882	0.10822	0								
solif7	0.00576	0.00882	0.10822	0.00576	0							
solii92	0.00883	0.00573	0.11556	0.00883	0.00883	0						
parab2	0.01532	0.01201	0.11568	0.01532	0.01532	0.01199	0					
solib13	0.02191	0.02557	0.06626	0.02191	0.02191	0.0255	0.02557	0				
para81	0.012	0.00882	0.12325	0.012	0.012	0.00883	0.01532	0.02937	0			
parab1	0.00283	0.012	0.10119	0.00882	0.00283	0.01202	0.01876	0.02556	0.01531	0		
parab4	0.00882	0.00576	0.10119	0.00882	0.00882	0.00576	0.012	0.02556	0.00882	0.012	0	
amaz95	0.00569	0.01503	0.106	0.01179	0.01179	0.01503	0.02191	0.02887	0.0184	0.00868	0.01503	0
shiva	0.00576	0.00882	0.10822	0.00576	0.00576	0.00883	0.01532	0.02191	0.012	0.00882	0.00882	0.01179
B	0.09624	0.10319	0.09633	0.09624	0.09624	0.10316	0.10319	0.10101	0.11025	0.10309	0.10309	0.10792
A	0.08968	0.09633	0.10319	0.08968	0.08968	0.09629	0.09633	0.09431	0.1031	0.09624	0.09624	0.10093
C	0.07745	0.08354	0.10329	0.07745	0.07744	0.08354	0.08353	0.08181	0.08976	0.08347	0.08347	0.08789
D	0.09641	0.10339	0.0965	0.09641	0.09641	0.10336	0.10339	0.10119	0.11048	0.10329	0.10329	0.10811
E	0.12122	0.12929	0.07205	0.13741	0.13741	0.12915	0.11378	0.13208	0.13742	0.12913	0.12913	0.13454
G	0.12898	0.13741	0.07782	0.14589	0.14589	0.13721	0.12122	0.14039	0.1459	0.13724	0.13725	0.14282
I	0.13191	0.14058	0.07963	0.14927	0.14927	0.14043	0.12396	0.14375	0.14927	0.14039	0.14039	0.146
K	0.13717	0.146	0.07198	0.15485	0.15486	0.14575	0.12907	0.14918	0.15486	0.14581	0.14581	0.15157
J	0.12381	0.13208	0.07367	0.14039	0.14039	0.13193	0.11619	0.13503	0.1404	0.13191	0.13191	0.13734
L	0.10867	0.13206	0.00888	0.12383	0.12391	0.13186	0.13222	0.07795	0.14035	0.11612	0.11604	0.12128
N	0.1131	0.13676	0.01179	0.12842	0.12842	0.13667	0.13677	0.08187	0.14518	0.12059	0.12059	0.12583
M	0.10822	0.13143	0.00576	0.12324	0.12325	0.13131	0.13144	0.07761	0.13968	0.11556	0.11556	0.12067
O	0.11819	0.14233	0.01484	0.13382	0.13383	0.14221	0.14234	0.08629	0.15093	0.12583	0.12583	0.13121
P	0.01876	0.01532	0.10832	0.01876	0.01876	0.0088	0.01532	0.02938	0.01876	0.02235	0.01532	0.02556

	shiva	B	A	C	D	E	G	I	K	J	L	N	M	O	P
shiva	0														
B	0.09624	0													
A	0.08968	0.00282	0												
C	0.07744	0.00882	0.00576	0											
D	0.09641	0.01875	0.01531	0.00882	0										
E	0.13741	0.12358	0.13165	0.13181	0.1087	0									
G	0.14589	0.1315	0.13992	0.1401	0.11598	0.00283	0								
I	0.14927	0.13457	0.14322	0.14342	0.11867	0.00569	0.00868	0							
K	0.15486	0.12339	0.13143	0.13158	0.10854	0.00863	0.01168	0.00868	0						
J	0.14039	0.1263	0.13456	0.13474	0.11108	0.00281	0.00569	0.00283	0.00569	0					
L	0.12391	0.08389	0.09021	0.09028	0.09049	0.09093	0.09752	0.09992	0.09087	0.09306	0				
N	0.12842	0.08786	0.09426	0.09434	0.09441	0.09484	0.10152	0.10384	0.09472	0.09689	0.00583	0			
M	0.12325	0.08348	0.08976	0.08984	0.08361	0.08398	0.09026	0.09239	0.08388	0.08587	0.00283	0.00569	0		
O	0.13383	0.0924	0.09894	0.09901	0.09909	0.09952	0.10633	0.10867	0.0994	0.10158	0.00874	0.00281	0.00863	0	
P	0.01876	0.09633	0.08976	0.0775	0.0965	0.12136	0.12913	0.13208	0.13734	0.12395	0.10885	0.12856	0.12338	0.1339	0

Anexo 4: Cariótipo do indivíduo B14-Mojú. O número de cromossomos corresponde ao de *Trichechus inunguis*, ou seja 56 cromossomos. O peixe-boi marinho, *Trichechus manatus* possui 48 cromossomos.

