

DIVERSIDADE GENÉTICA EM *SOTALIA* (CETACEA, DELPHINIDAE) NO BRASIL

Sholl, T.G.C¹., Nascimento, F.F.^{1,2}, Siciliano, S.¹ e Bonvicino³, C.R.

(1) Projeto de Monitoramento de Aves e Mamíferos Marinhos na Bacia de Campos/CENPES/PETROBRAS – Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21041-210 Brasil

(2) Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney, Sydney, Australia

(3) Divisão de Genética, CPq, INCA & Depto. de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ Brasil

Resumo

Para analisar a variabilidade genética e a estrutura populacional de *Sotalia* de diferentes localidades do Brasil foi usado como marcador molecular o gene mitocondrial citocromo *b* (*citb*). As amostras seqüenciadas neste estudo foram obtidas de tecidos de animais encalhados ou capturados em redes de pesca artesanal. Vinte e um espécimes de *Sotalia* tiveram todo o gene *citb* amplificado e seqüenciado. Nesse estudo foram encontrados três haplótipos para a forma fluvial e sete para a forma marinha. A estimativa de distância genética *p* entre os haplótipos da forma fluvial variou de 0,000 a 0,007% e entre os haplótipos da forma marinha variou de 0,000 a 0,004%. A estimativa de distância genética *p* entre haplótipos de *S. fluviatilis* e *S. guianensis* variou de 0,022 a 0,027%. Entre outras espécies de cetáceos, como as do gênero *Tursiops*, esta distância é quase o dobro (0,045%). As análises de *neighborjoining* e parcimônia máxima mostraram que os espécimes de *Sotalia* formam um grupo monofilético dividido em dois clados fortemente suportados, um contendo as amostras marinhas e outro contendo as amostras fluviais. Nossos resultados confirmam prévios trabalhos que mostraram uma distinção entre a forma marinha e fluvial. Aqui foi encontrado sete haplótipos para 22 espécimes da forma marinha, sendo que, em uma mesma localidade foi encontrado cinco haplótipos, e para a forma fluvial, os dados mostram pelo menos três haplótipos. Esses achados contrariam resultados anteriores em que apenas um haplótipo para cada forma foi registrado utilizando esse marcador molecular. Nossos dados mostram que a variação no gênero *Sotalia* é maior do que anteriormente reportada. Indivíduos de *S. guianensis* de localidades distintas compartilham o mesmo haplótipo, sugerindo fluxo gênico entre as populações estudadas. A análise de median joining não detectou estruturação geográfica em função da origem geográfica na forma marinha, mas essa estruturação não pode ser descartada para a população fluvial.

Introdução

O gênero *Sotalia*, tradicionalmente considerado mono-específico, encontra-se distribuído na costa Atlântica desde Florianópolis (Simões-Lopes 1987) até a Nicarágua (da Silva & Best 1996; Carr & Bonde 2000; IWC 2001). Este pequeno golfinho habita também rios e sistemas lacustres da Amazônia e ainda o baixo Orinoco. *Sotalia* ocupa dois ecótipos, marinho e fluvial, e estas formas diferem em dimensões cranianas e corporais. Até recentemente a única espécie reconhecida para o gênero era *Sotalia fluviatilis* Gervais, 1853 (Cetacea: Delphinidae), conhecido vulgarmente como boto-cinza ou tucuxi, mas, recentemente, Cunha *et al.* (2005) publicaram um estudo baseado em análises moleculares, sugerindo que *Sotalia* divide-se em duas espécies:

Sotalia guianensis, a forma marinha, e *Sotalia fluviatilis*, a forma fluvial. No entanto, não há ainda um consenso na comunidade científica sobre o status taxonômico destas duas formas.

Os dados moleculares provaram ser fontes úteis para estudos populacionais e para determinar os limites entre espécies (Knowlton 2000; Avise 2004). Recentemente, numerosos estudos moleculares forneceram evidências novas ou adicionais para o reconhecimento de novas taxa em cetáceos (Rosel *et al.* 1994; Wang *et al.* 1999; Dalebout *et al.* 2002; Wada *et al.* 2003).

Para analisar a variabilidade genética e a estruturação populacional de *Sotalia* de diferentes localidades do Brasil, tanto entre formas, como entre espécimes da forma marinha, foi usado como marcador molecular o gene mitocondrial citocromo *b* (*citb*).

Materiais e Métodos

Foram obtidas amostras de tecido de 21 espécimes de *Sotalia* encontrados mortos, encalhados, ou capturados em redes de pesca, de diferentes localidades do Brasil. O ADN foi extraído de amostras de fígado ou músculo conservadas em etanol absoluto, de acordo com protocolo modificado da técnica de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989).

Todo o gene mitocondrial citocromo *b* foi amplificado através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR; do inglês, *polimerase chain reaction*) utilizando um par de iniciadores externos (CB-out1, 5'-AATGAYATGAAAARYCATCGTTG-3'; CB-out2, 5'-TCTTCCTTGAGTCTTAGGGAG-3'; Cassens *et al.* 2000) utilizando um termociclador. Para um total de 50,0 µl de reação foi adicionado ADN (de 250,0 ng a 1,0 µg), dNTPs (0,5 mM/ml), iniciadores (0,3 pmol/µl), taq DNA polimerase (Invitrogen, Biotools ou Pharmacia; 0,04 U/µl) tampão de amplificação 10X nas seguintes condições: 94°C (60s); 35 ciclos [94°C (60s), 55 (60s) e 72°C (90s)].

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando os iniciadores externos CB-out1 e CB-out2, e os iniciadores internos CB-in1 (5'-TTRTTRGATCCTGTTTCRTG-3') e CB-in2 (5'-TGAGGACAAATATCATTYTGAG-3', Cassens *et al.* 2000). As reações foram corridas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 e as seqüências obtidas foram editadas com o programa Sequencing Navigator 3.3 (Applied Biosystems, Inc. 1994) e alinhadas manualmente.

As estimativas de distância genética foram calculadas com o programa "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" (MEGA3; Kumar *et al.* 2004) a partir do modelo de distância *p* com todas as bases incluídas e a opção "deleção par a par" (*pairwise deletion*). A análise de *neighbor-joining*, com o algoritmo Kimura-2-parâmetros e a opção "deleção par a par", a análise de parcimônia máxima e os valores de Bootstrap a partir de 1000 réplicas foram também obtidas com o MEGA3.

A análise a "base de rede", *median-joining* (MJ), foi estimada pelo programa NETWORK 4.1.1.0 (Fluxus Technology, 2005) cujo algoritmo foi explicado por Bandelt *et al.* (1999). A MJ é parcimoniosa sem fundamento estatístico. Como é um método baseado em distância, somente os sítios variáveis são selecionados.

Resultados

Nesse estudo foram encontrados um haplótipo para a forma fluvial e sete para a forma marinha. A estimativa de distância genética *p* entre os haplótipos da forma fluvial variou de 0,000 a 0,007% e entre os haplótipos da forma marinha variou de 0,000 a 0,004% (Tab. 1). A estimativa de distância genética *p* entre haplótipos de *S. fluviatilis* e *S. guianensis* variou de 0,022 a 0,027%. As análises de *neighbor joining* (NJ) e de parcimônia máxima (MP) foram concordante em mostrar que os espécimes de *Sotalia* formam um grupo monofilético dividido em dois clados

fortemente suportados (Bootstrap de 100% na NJ e 99% na MP), um contendo as amostras marinhas e outro contendo as amostras fluviais (Fig. 1).

A análise de *median joining* foi concordante com a análise de distância ao mostrar a separação entre os haplótipos de *S. fluviatilis* e *S. guianensis* por 24 mutações (Fig. 2). Nessa análise fica evidente a ausência de estruturação geográfica em função da distância geográfica em exemplares de *S. guianensis*, onde vemos que alguns espécimes de Belém compartilham o mesmo haplótipo com espécimes do Rio de Janeiro. Nessa análise o haplótipo mais central, aquele que tem conexão direta com cinco dos seis haplótipos da forma marinha, é compartilhado por espécimes de Belém e do Rio de Janeiro, e é provável que seja o haplótipo mais ancestral dessa forma.

Discussão

Nossos resultados confirmam o trabalho de Cunha *et al.* (2005) que mostraram uma distinção entre a forma marinha e fluvial. Foram encontrados sete haplótipos para 20 espécimes da forma marinha, sendo que em uma mesma localidade foram encontrados cinco haplótipos, e para a forma fluvial, os dados mostram pelo menos três haplótipos. Esses achados contrariam resultados anteriores em que apenas um haplótipo para cada forma foi registrado utilizando esse mesmo marcador molecular (Cunha *et al.* 2005). Nossos dados mostram que a variação no gênero *Sotalia* é maior do que anteriormente reportada. Um dos haplótipos foi compartilhado por espécimes de Belém e do Rio de Janeiro, sugerindo a ausência de estruturação em função da origem geográfica na população marinha, e sugerindo a existência de fluxo gênico entre as populações estudadas. Por outro lado, a existência de estruturação geográfica em função da origem geográfica não pode ser descartada para a população fluvial.

Apesar da amostra da forma marinha analisada ter sido maior (20) que a da forma fluvial (4), a estimativa de distância genética p entre os espécimes da forma fluvial foi maior que a distância entre espécimes da forma marinha. As estimativas de distância genética p entre a forma marinha e a forma fluvial variou de 0,022 a 0,027%, enquanto entre outras espécies de cetáceos, como as do gênero *Tursiops*, esta distância é quase o dobro (0,045%). Nossos dados mostram que apesar de existir diferença entre *Sotalia guianensis*, a forma marinha, e *Sotalia fluviatilis*, a forma fluvial, esta distância é pequena quando comparada a distância encontrada entre outros pares de espécies de outros gêneros de cetáceos, sugerindo que, se realmente existe ausência de fluxo gênico entre as duas formas, este é um evento relativamente recente.

Agradecimentos

Aos Projetos Piatam Mar e Piatam Oceano, da Petrobras, pelo auxílio em passagens e logística em Belém. C.R. Bonvicino é bolsista do CNPq. T. Sholl é bolsista PIBIC da FIOCRUZ/CNPq.

Referências bibliográficas

- Applied Biosystems, Inc. 1994. Sequence navigator, DNA and protein comparison software. A division of Perkin-Elmer Corporation. Foster City, California.
- Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution, 2nd edn. Chapman & Hall, New York.
- Bandelt H.-J., Foster P. & Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1): 37-48.

- Carr T. & Bonde R.K. 2000. Tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) occurs in Nicaragua, 800km north of its previously known range. *Marine Mammal Science* 16: 447–452.
- Cassens I., Vicario S., Waddell B.G., Balchowsky H., Van Belle D., Ding W., Fan C., Lal Mohan R.S., Simões-Lopes P.C., Bastida R. *et al.* 2000. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11343–11347.
- Cunha H.A., da Silva V.M.F., Lailson-Brito Jr. J., Santos M.C.O., Flores P.A.C., Martin A.R., Azevedo A.F., Fragoso A.B.L., Zanelatto R.C. & Sole'-Cava A.M. 2005. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology*. v. 148, p. 449-457.
- Dalebout M.L., Mead J.G., Baker S.C., Baker A. & van Helden L. 2002. A new species of beaked whale discovered through phylogenetic analyses of mitochondrial DNA sequences. *Marine Mammal Science* 18:577–608.
- da Silva V.M.F. & Best R.C. 1996. *Sotalia fluviatilis*. *American Society of Mamalogists. Mammalian Species* 527:1-7.
- Fluxus Technology. 2005. Free phylogenetic network analysis software [online]. German. [capturado 21 ago. 2005] Disponível em <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- IWC. 2001. Report of the standing sub-committee on small cetaceans. *Journal of Cetacean Research and Management* 3 (Supplement): 263–291.
- Knowlton N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420:73–90.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinformatics** 5:150-163.
- Rosel P.E., Rojas-Bracho L. 1999. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* Norris and MacFarland 1958. *Mar Mamm Sci* 15:990–1003.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Simões-Lopes P.C. 1987. Sobre a ampliação da distribuição do gênero *Sotalia*, Gray 1866 (Cetacea, Delphinidae) para águas do estado de Santa Catarina, Brasil. In: 2ª Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul. Rio de Janeiro; p.87-88.
- Wada S., Oishi M. & Yamada T.K. 2003. A newly discovered species of living baleen whale. *Nature* 426:278–281.
- Wang J.Y., Chou L.S. & White B.N. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology* 8:1603–1612.

Tabela 1. Estimativas de distância genética p entre haplótipos de *Sotalia*. Números em negrito são as distâncias intra haplótipos da forma fluvial e eintra haplótipos da forma marinha. GEM são amostras coletadas de espécimes do estado do Rio de Janeiro.

Táxon		Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. guianensis</i>	1	Belém 4, 5, 13, 14, 19, 28, 29 e CRB2848										
<i>S. guianensis</i>	2	Belém 9, GEM 34, 38, 39, 50, DQ086827	0.002									
<i>S. guianensis</i>	3	Belém 12	0.004	0.001								
<i>S. guianensis</i>	4	Belém 26	0.004	0.002	0.002							
<i>S. guianensis</i>	5	Belém 30	0.003	0.001	0.002	0.002						
<i>S. guianensis</i>	6	GEM 47, 65 e 73 (Rio de Janeiro)	0.003	0.001	0.003	0.003	0.002					
<i>S. guianensis</i>	7	SAM001 (Florianópolis)	0.004	0.001	0.004	0.004	0.002	0.004				
<i>S. fluviatilis</i>	8	DQ086828	0.026	0.025	0.025	0.025	0.027	0.025	0.027			
<i>S. fluviatilis</i>	9	AF304067	0.023	0.022	0.023	0.023	0.023	0.022	0.024	0.004		
<i>S. fluviatilis</i>	10	CRB2849 (Aflente Rio Negro)	0.031	0.029	0.030	0.031	0.030	0.030	0.031	0.004	0.007	
<i>T. truncatus</i>	11	AF084095	0.081	0.081	0.081	0.081	0.082	0.080	0.082	0.082	0.082	0.088

Figura 1. Análise de *neighbor joining* (em cima) e máxima parcimônia (em baixo) entre os exemplares de *Sotalia guianensis* e *S. fluviatilis*. Números próximos aos nós são valores de *bootstrap*.

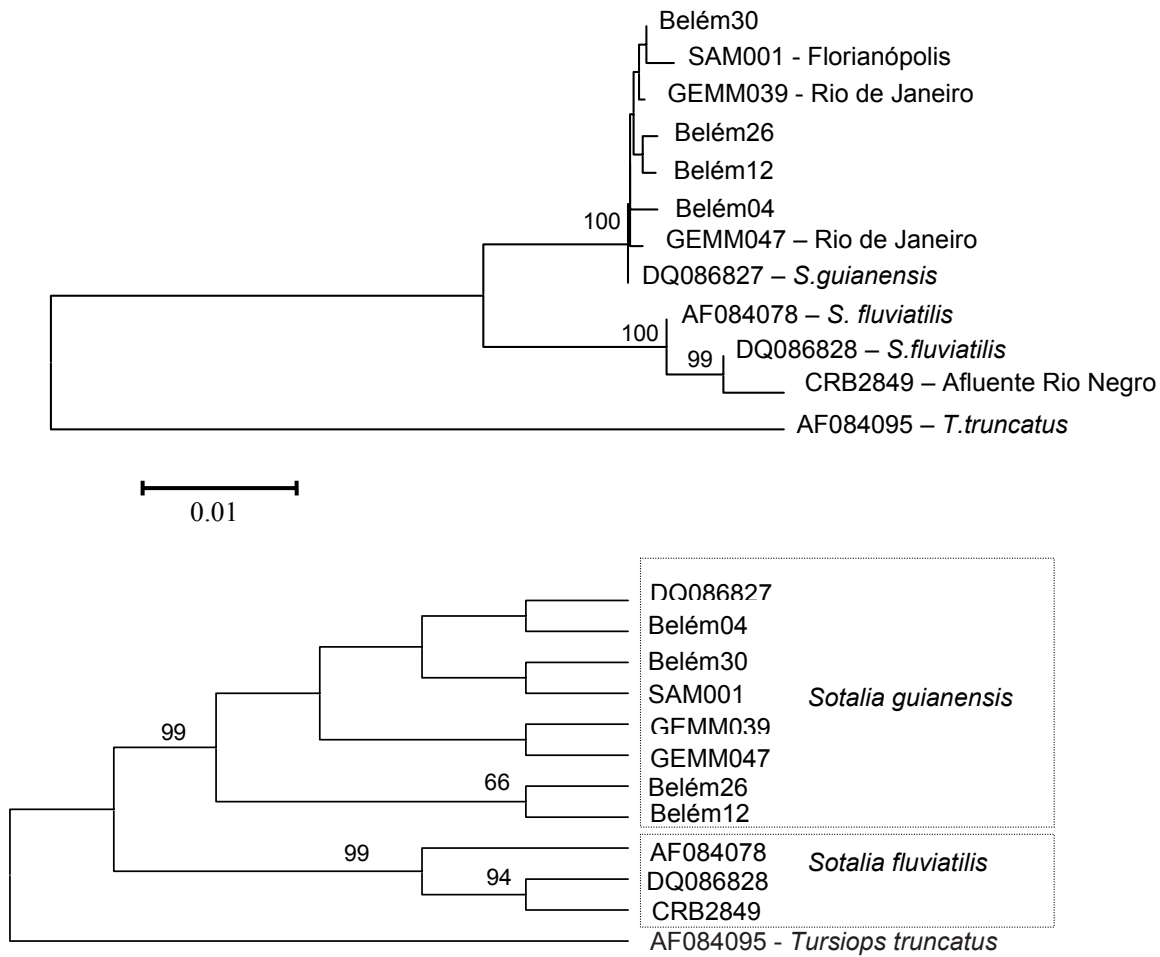


Figura 2. Análise de *median joining* com os haplótipos de *Sotalia fluviatilis* e de *Sotalia guianensis*. Os números próximos as linhas indicam as mutações necessárias para derivar um haplótipo de outro. Círculos representam os haplótipos sendo seu diâmetro proporcional ao número de espécimes que compartilham o haplótipo.

