

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ELEFANTES-
MARINHOS-DO-SUL (*Mirounga leonina*, Linnaeus,
1758) DA ILHA ELEFANTE, SHETLANDS DO SUL,
ANTÁRTICA**

TIAGO PEREIRA BRITO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Prof^a Dra. Mônica Mathias Costa Muelbert

**RIO GRANDE
08/2008**

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre iluminou o meu caminho e me forneceu forças para alcançar mais esse objetivo. A minha família, pelo apoio e força que me deram durante essa permanência em Rio Grande.

A pesquisadora Dr^a Larissa Rosa de Oliveira pelos conhecimentos repassados como orientadora desse trabalho durante a minha permanência em Porto Alegre. Aos demais membros do Centro de Biologia Molecular e Genômica da PUC/RS pela troca de experiências.

Aos colaboradores do projeto, Dra. Mônica Muelbert e Dr. Sandro Luiz Bonatto e aos membros da equipe do Projeto Elefante-Marinho-do-Sul.

Aos membros da banca, pelas inúmeras sugestões que foram de grande importância ao trabalho. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Secchi pelo apoio e pela revisão da dissertação!

Aos amigos que deixei em Belém, mas que nunca deixaram de me incentivar apesar da distância! As grandes amizades que fiz em terras gaúchas, em especial aos amigos Marcos, Flávio e Bernardo durante a vivência de república e cassino! Alexandre e Rodrigo pela hospitalidade em Porto Alegre! A Ana, que juntos compartilhamos muitas das dificuldades, mas que não desistimos!

Aos meus colegas de curso e a equipe do laboratório de Mamíferos e Tartarugas Marinhas que partilhamos os conhecimentos e as experiências na área. Aos professores do programa que, em sua maioria, estiveram dispostos a ajudar!

Nunca perca a fé na humanidade, pois ela é como um oceano. Só porque existem algumas gotas de água suja nele, não quer dizer que ele esteja sujo por completo...

Ghandi

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	pág. 13
2. METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	pág. 20
2.1. Descrição da área de estudo e da colônia	pág. 20
2.2. Coleta das amostras	pág. 21
2.3. Processamento das amostras	pág. 22
2.3.1. <i>Extração do DNA</i>	pág. 22
2.3.2. <i>Amplificação do mtDNA</i>	pág. 23
2.3.3. <i>Purificação do produto amplificado</i>	pág. 25
2.3.4. <i>Sequenciamento do DNA purificado</i>	pág. 25
2.3.5. <i>Alinhamento das seqüências nucleotídicas</i>	pág. 26
2.4. Análise dos dados	pág. 26
2.4.1. <i>Análise da diversidade genética</i>	pág. 26
2.4.2. <i>Análise da estruturação populacional e filogenia</i>	pág. 27
2.4.3. <i>Análise do tamanho efetivo, flutuação populacional e neutralidade seletiva</i>	pág. 30
3. RESULTADOS	pág. 32
3.1. <i>Diversidade Genética</i>	pág. 32
3.2. <i>Estruturação populacional e filogenia</i>	pág. 35
3.3. <i>Tamanho efetivo, flutuação populacional e neutralidade seletiva</i>	pág. 43

ÍNDICE

4. DISCUSSÃO	pág. 46
4.1. Diversidade Genética	pág. 46
4.2. Estruturação Populacional e Filogenia	pág. 51
4.3. Tamanho efetivo, flutuação populacional e neutralidade seletiva.....	pág. 62
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	pág. 66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pág. 68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Índices de diversidade genética da colônia reprodutiva de elefante-marinho-do-sul da Ilha Elefante analisados para um fragmento de 299 pb da região controladora do mtDNA e demais colônia da espécie, bem como seus respectivos estoques populacionais. pág. 33
- Tabela 2:** Dados da AMOVA para os índices de fixação (F_{st} , acima da diagonal e Φ_{st} , abaixo) para sete colônias de *Mirounga leonina* analisadas. pág. 37
- Tabela 3:** Dados da AMOVA para os índices de fixação (F_{st} , acima da diagonal e Φ_{st} , abaixo) para quatro estoques populacionais de *Mirounga leonina* analisadas. pág. 37
- Tabela 4:** Dados de tamanho efetivo populacional e parâmetros de neutralidade seletiva de *Mirounga leonina* da Ilha Elefante e demais colônias da espécie, analisados para um fragmento de 299 pb da região controladora do mtDNA pág. 44
- Tabela 5:** Comparação dos dados da análise de diversidade genética da região controladora do mtDNA de dez espécies de pinípedes presentes na literatura pág. 50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Macho e fêmea de elefante-marinho-do-sul, *Mirounga leonina* pág. 15
- Figura 2:** Distribuição circumpolar das principais colônias reprodutivas do elefante-marinho-do-sul. pág. 15
- Figura 3:** Localização da área de estudo Stinker Point sobre a Ilha Elefante nas Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica. pág. 21
- Figura 4:** Níveis médios com respectivos erros padrões de diversidade nucleotídica (A) e haplotípica (B) de *M. leonina* da Ilha Elefante (IE) e demais colônias re-analisadas pág. 34
- Figura 5:** Variação dos pares dos índices de fixação em relação às distâncias linear entre as colônias pág. 38
- Figura 6:** Rede de haplótipos contendo 187 amostras de 299 pb da região controladora do mtDNA obtidas para sete colônias de *M. Leonina*. pág. 41
- Figura 7:** Árvore filogenética contendo 96 haplótipos com 299 pb da região controladora do mtDNA obtidas para sete colônias de *M. Leonina*. pág. 42
- Figura 8:** Flutuação do tamanho efetivo populacional obtidos através de dados moleculares (mtDNA) da colônia reprodutiva de *M. leonina* da Ilha Elefante e demais colônias da espécie. pág. 45
- Figura 9:** Padrão de circulação do oceano austral, com a distribuição das principais colônias de pinípedes pág. 60
- Figura 10:** Importantes áreas de forrageamento das colônias reprodutivas de *Mirounga leonina* nos oceanos Atlântico Sul e Antártico pág. 61

RESUMO

O elefante-marinho-do-sul (*Mirounga leonina*) foi uma espécie extensivamente caçada durante os séculos XIX e XX por sua gordura e óleo. Atualmente sua população mundial está estimada em cerca de 740.000 indivíduos, os quais apresentam um padrão circumpolar de distribuição no hemisfério sul, com quatro estoques populacionais: Geórgia do Sul (Atlântico), Kerguelen-Heard (Índico), Macquarie (Pacífico) e Península Valdés (Patagônia/Atlântico). Apesar da ampla distribuição da espécie, do histórico de caça e os inúmeros estudos genéticos publicados sobre *Mirounga leonina* em geral, pouco se sabe sobre a diversidade genética e parâmetros demográficos da colônia reprodutiva da Ilha Elefante – IE (61°13'S; 55°23'W) nas Shetlands do Sul – Antártica. O presente estudo apresenta a primeira estimativa de diversidade genética e tamanho efetivo populacional (N_e) dessa colônia, através da análise da região controladora do DNA mitocondrial (mtDNA). A análise genética foi realizada a partir do sequenciamento de um segmento de 299 pares de bases (pb) do mtDNA de 60 amostras de pele de filhotes marcados na IE durante o verão austral de 2005/2006. Foram acrescentadas a esse estudo amostras das colônias da Península Valdés – PV (n=32), Ilhas Geórgia do Sul – GS (n=27), Ilhas Falklands/Malvinas – IF (n=16), Ilha Marion – IM (n=30), Ilha Heard – HD (n=5) e Ilha Macquarie – MQ (n=6), conforme os dados disponíveis na literatura e no GenBank. Os níveis de diversidade genética das colônias foram estimados através da diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) calculadas pelo Programa Arlequin, enquanto que o N_e foi estimado por $N_e = \theta / 4\mu g$, onde: θ , número de segregações por sítios polimórficos foi calculado por coalescência utilizando o Programa Lamarc; μ , a taxa de mutação, estimada em 75×10^{-9} sítios por ano; g , tempo de geração da espécie, considerado de 8 anos. A estruturação populacional (AMOVA) foi estimado pelo Programa Arlequin através dos índices de fixação (F_{st} e Φ_{st}) e a análise de filogenética foi realizada através da árvore de haplótipos construída pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa Mega e a rede de haplótipos foi construída com o auxílio dos Programas DnaSp e Network. O resultado da análise da região de

consenso relevou uma alta diversidade genética ($\pi = 0,023$ e $h = 0,956$) para a IE, similar as demais colônias da espécie, com exceção da colônia da PV que apresenta uma reduzida diversidade. A análise filogenética demonstrou certa dificuldade de se identificar linhagens matrilineares recíprocas nas colônias, devido a grande variação intrapopulacional da espécie. No entanto a análise dos índices de fixação registrou que a espécie apresenta certa estruturação populacional ao longo de suas colônias, com possível ocorrência de um fluxo gênico entre as colônias das GS, IF e IE. O N_e registrado para a colônia da IE ($N_e = 45.965$ indivíduos) demonstrou que essa pequena colônia apresentou um nível de diversidade genética equivalente a uma população 29 vezes maior do que a atual, estimada em 681 indivíduos para a área em estudo e, de 1.545 indivíduos sobre a IE. Isso por que essa colônia apresenta um fluxo gênico sobre ela, pertencendo ao estoque populacional da Geórgia do Sul. A baixa estruturação populacional registrada entre essas colônias pode ser justificada pelos padrões de deslocamentos e sobreposição de áreas de forrageios de fêmeas adultas entre as colônias das GS e Shetland do Sul (IE), com registros de deslocamentos de fêmeas e de machos de uma colônia a outra. Apesar de pequena, a colônia reprodutiva de elefantes-marinhos-do-sul da IE apresenta uma grande importância, devido sua alta diversidade genética, podendo ser uma fonte de reposição de indivíduos para demais colônia da espécie, que, em sua maioria, encontram-se em declínio. Quanto ao padrão de distribuição dos haplótipos entre as colônias, ele pode estar associado ao padrão altamente migratório da espécie no oceano austral, cuja dispersão entre as colônias (fluxo gênico) estaria associada ao sistema de circulação antártica.

Palavras-chave: diversidade genética, estruturação populacional, filogenia, fluxo gênico, tamanho efetivo populacional e mamífero marinho.

ABSTRACT

The southern elephant seal (*SES-Mirounga leonina*) was extensively hunted between the XIXth and XXth centuries. Nowadays the world's population is estimated roughly in 740,000 individuals and exhibits a circumpolar distribution. Four different stocks are recognized: the Peninsula Valdés stock in Argentina, the South Georgia stock in the south Atlantic Ocean, the Kerguelen stock in the south Indian Ocean and the Macquarie stock in the south Pacific Ocean. Although there are many genetics studies on elephant seals in general, this is the first study reporting the genetic diversity and effective population size for SES from Elephant Island – EI (61°13'S; 55°23'W), South Shetlands, Antarctica. Skin samples from 60 pups were collected during the 2005/2006 austral summer. Molecular analyses were performed by sequencing the mitochondrial DNA control region with 299 base pairs. Samples from the colonies of Peninsula Valdes – PV (n=32), South Georgia Islands – SG (n=27), Falklands/Malvinas Islands – FI (n=16), Marion Island – MI (n=30), Heard Island – HD (n=5) and Macquarie Island – MQ (n=6) were added to the study, according to informations available in the literature and GenBank. Genetic diversity was estimated using haploid (h) and nucleotide diversities (π) calculated using *Arlequin*. Effective population size was estimated as $N_e = \theta / 4\mu g$, where θ was calculated from coalescence analysis using *Lamarc*. Substitution rate (μ) was 75×10^{-9} site/years and generation time (g) was 8 years. Population structure was estimated using *Arlequin* through the setting of indices (F_{st} and Φ_{st}). Phylogenetic analysis was done through the Neighbor-Joining tree of haplotypes using *Mega* and the net of haplotypes was constructed using the *DnaSp* and *Network*. EI had a high genetic diversity ($\pi = 0.023$ and $h = 0.956$) similar to other colonies of the species, with exception of the PV colony that presents a reduced diversity. EI did not demonstrated a unique phylogeny among its female lineage due to a great intrapopulation variation. However the setting indices demonstrated that the species presents certain population structure among its colonies, with occurrence of gene flow among the colonies of the SG, FI and EI. A great effective population size was estimated to EI ($N_e =$

45,965 individuals). However, this small colony presented a level of genetic diversity equivalent to a bigger population, 29 times the size of the colony ($N = 681$ individuals or 1,545 individuals for the entire EI). The low population structure and the current gene flow among EI and SG is probably due to movements of females between South Shetlands Islands and SG. The distribution haplotypes among colonies can be associated to the high migratory pattern of the species in the austral ocean, whose dispersion among the colonies (gene flow) can be associated with the Antarctica Circulation System.

Key words: genetic diversity, population structure, phylogeny, gene flow, effective population size and marine mammal