

# INTEGRAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS REVELA UMA NOVA ESPÉCIE DE LOBO-MARINHO NA AMÉRICA DO SUL

Larissa Rosa de Oliveira

## Introdução

O lobo-marinho sul-americano, *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783), é um dos otariídeos mais amplamente distribuídos ao longo do Hemisfério Sul, possuindo colônias reprodutivas desde a costa pacífica no Peru (Península de Paracas, 13°54'S, 76°20'W) até o Uruguai (Cabo Polônio, 34°24'S, 53°46'W) na costa atlântica da América do Sul (Vaz-Ferreira, 1982). Contudo, sua distribuição não é contínua, desaparecendo na costa central do Chile, entre as localidades de Mejillones (23°06'S, 70°27'W) e a Ilha de Chiloé (42°36'S, 73°57'W) (Guerra e Portflitt, 1991), um hiato de aproximadamente 2000 km. Além disso, espécimes erráticos oriundos do Uruguai são observados anualmente nas costas sul e sudeste do Brasil (Vaz-Ferreira, 1982; Pinedo, 1990).

Esta espécie foi intensamente caçada por vários séculos até 1991, quando o Uruguai tornou-se o último país a proibir sua caça (Ximenez e Langguth, 2002). Além da caça, o fenômeno "El Niño" (*El Niño Southern Oscillation*, ENSO) também vem contribuindo para o declínio das populações de *A. australis*, como o evento de 1996/1997 que causou a morte de 72% da população peruana (Arias-Schreiber e Rivas, 1998). A espécie encontra-se listada no Apêndice II da CITES e acredita-se que existam entre 300.000 e 450.000 indivíduos atualmente (Seal Conservation Society, 2003). Apesar da ampla distribuição, da caça indiscriminada e do forte declínio populacional sofrido em algumas localidades, raros foram os estudos que buscaram avaliar as possíveis diferenças populacionais e suas conseqüências para o manejo e conservação da espécie na América do Sul.

King (1954) propõe, com base no tamanho do crânio, a existência de três subespécies de *A. australis*: *A. australis australis*, que habitaria as Ilhas Falkland (Reino Unido); *A. australis gracilis*, que ocuparia o restante da costa da América do Sul; e *A. australis galapagoensis* com localidade tipo das Ilhas Galápagos. Repenning *et al.* (1971) atribuíram os status de espécie plena a *A. galapagoensis* e enfatizaram a necessidade da retomada dos estudos sobre a sistemática de *A. australis*. Os estudos realizados até o momento não abrangeram a totalidade da distribuição da espécie e utilizaram unicamente dados morfológicos de medidas cranianas para descrever as diferenças populacionais encontradas. Desta forma, o presente estudo apresenta o primeiro trabalho usando uma avaliação integrada de técnicas moleculares (microsatélites de DNA) e morfológicas (morfometria tradicional e geométrica) para a interpretação das diferenças populacionais do lobo-marinho sul-americano bem como para a definição de seu status taxonômico.

## **Material e Métodos**

### ***Dados moleculares***

Para a realização da análise de variabilidade genética e da diferenciação populacional foram avaliadas oito locos de microssatélites de 226 espécimes de *A. australis* coletados em duas populações demograficamente importantes para a espécie: a do Uruguai (n=48) (29°20'S, 52°06'W) localizada na costa Atlântica da América do Sul e a do Peru (n=178) (15°22'S, 75°12'W), localizada na costa Pacífica da América do Sul (figura 1). Espécimes coletados na costa do Brasil também foram incluídos nesta análise (e também na morfológica) e foram considerados oriundos das colônias reprodutivas do Uruguai de acordo com Vaz-Ferreira (1982) e Pinedo (1990).

A extração do DNA, a amplificação e o exame dos oito locos de microssatélites (Hg 6.3, Hg 8.10, Pv 9, Pv 11, Pv17, PvcA, PvcE e M11A) foram realizados de acordo com Gemmel *et al.* (1997).

O programa *Genepop* versão 3.1 (Raymond e Rousset, 1995) foi utilizado para calcular parâmetros de diversidade genética através das frequências alélicas, das heterozigosidades esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) além de testar os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, excesso de homozigotos e desequilíbrio de ligação.

A existência de subdivisão populacional foi estimado através do  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995), um índice análogo ao  $F_{ST}$  que assume o modelo de mutação escalonada (*stepwise mutation model*) (Ohta e Kimura 1973). Além disso, a diferenciação genética entre as populações foi testada através da distribuição das frequências alélicas entre as populações do Peru e Uruguai usando o teste G (Sokal e Rohlf, 1981), tendo como hipótese nula ( $H_0$ ) que ambas amostras foram obtidas de uma população panmítica, ou seja, a distribuição alélica deve ser idêntica em ambas populações. Por fim, para determinar quão informativo o genótipo de um indivíduo é sobre sua população de origem, foi realizado um teste de atribuição populacional a partir de suas frequências genotípicas (*assignment test*) (Paetkau *et al.*, 1995).

### ***Dados morfológicos***

Para o estudo da variação morfológica entre populações de *A. australis* foram analisados 321 crânios exclusivamente de machos adultos (a fim de evitar efeitos ontogenéticos e de dimorfismo sexual) depositados em 18 coleções científicas internacionais, os quais pertenciam a oito populações distintas distribuídas ao longo da costa da América do Sul (figura 1): Uruguai (n=124), Norte da Argentina (n=11), Centro da Argentina (n=7), Sul da Argentina (n=7), Ilhas Falkland (n=45), Norte do Chile (n=9),

Sul do Chile (n=7) e Peru (n=101) através das técnicas de morfometria tradicional (medidas lineares) e morfometria geométrica (marcos anatômicos).

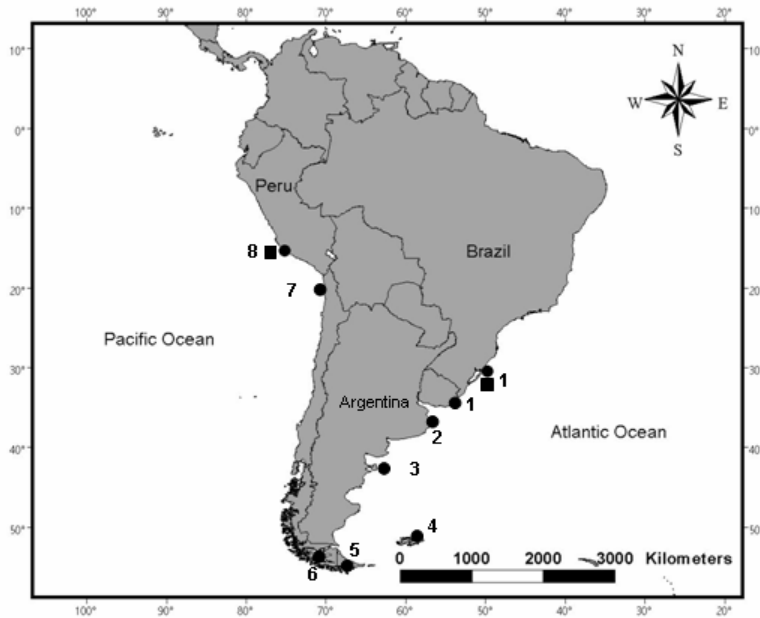
Em cada crânio foram realizadas 15 medidas lineares e analisados 62 marcos anatômicos (figura 2), posicionados em 1027 imagens nas vistas dorsal (n=228), ventral (n=271), lateral (n=255) e occipital (n=273). As possíveis diferenças na forma e no tamanho do crânio das diferentes localidades estudadas foram determinadas utilizando -se técnicas de análises univariadas (análise univariada da variância (ANOVA)) e multivariadas (análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de variáveis canônicas (VC)), sobre as coordenadas dos pontos dos espécimes alinhados e também das medidas cranianas tomadas. Os marcos anatômicos e os métodos de digitalização estão definidos em Oliveira *et al.* (2005) e os métodos de alinhamento e representação gráfica estão descritos em Hingst-Zaher *et al.* (2000). Todas as análises estatísticas, tanto de morfometria tradicional quanto geométrica foram feitas com o uso dos programas SPSS versão 8.0, Systat 10 e SAS 6.12.

## **Resultados**

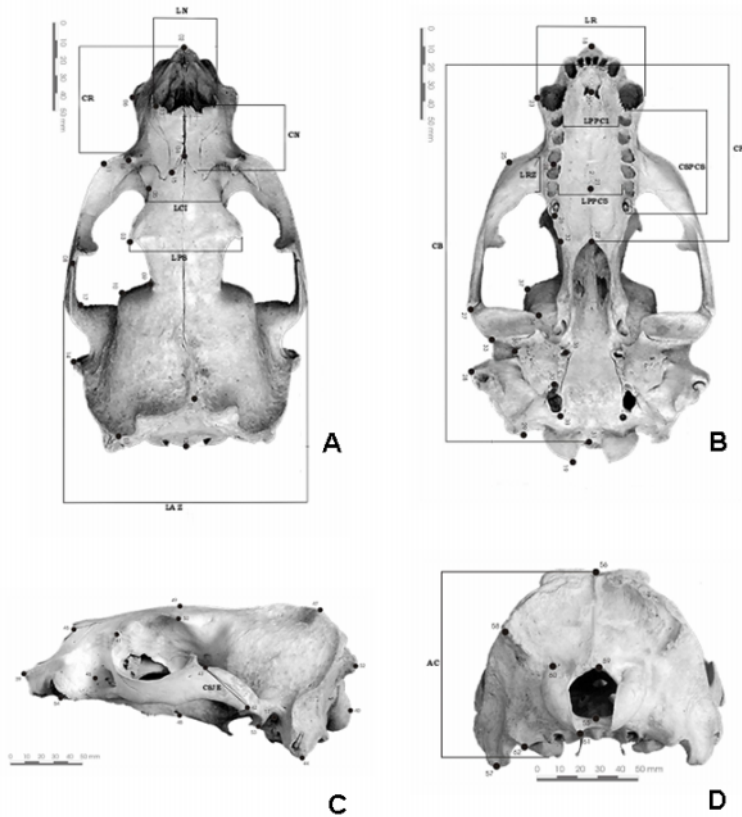
### **Dados moleculares**

Ambas populações apresentaram todos os locos em equilíbrio de Hardy -Weinberg, com exceção do loco Pv17, que foi excluído das demais análises por esta razão. Uma alta diversidade genética foi observada para ambas populações com número total de 67 alelos registrados em ambas populações. Contudo, as médias da riqueza alélica ( $A$ ) e das taxas de heterozigotos esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) foram significativamente diferentes entre as populações ( $P < 0,05$ ;  $GL = 6$ ; Uruguai  $A = 8,086$ ,  $H_E = 0,791$  e  $H_O = 0,758$ ; e Peru  $A = 6,956$ ,  $H_E = 0,779$  e  $H_O = 0,769$ ) sugerindo diferenciação genética entre as populações.

O resultado do teste G para homogeneidade da distribuição dos alelos entre as duas populações também indicou que as diferenças observadas entre as frequências alélicas das populações do Uruguai e Peru foram altamente significativas ( $P < 0,001$ ;  $GL = 16$ ). Neste sentido foi rejeitada a hipótese de que distribuição das frequências alélicas seria idêntica em ambas populações. O valor estimado de  $R_{ST}$  para os loci estudados foi de 0,143 e foi estatisticamente significativo ( $P < 0,001$ ;  $\chi^2 = 473,28$ ;  $GL=68$ ), indicando diferenciação genética entre as populações. Contudo, quando são observados os valores de  $R_{ST}$  para cada loco, constatou-se que em três deles (Pvc A, Pv 11 e Pv 9) os valores indicaram grande diferenciação genética (0,24; 0,16 e 0,18 respectivamente). Em adição o loco Hg 8.10 apresentou o mais elevado valor de  $R_{ST}$  (0,324), indicando um nível de diferenciação genética extremamente elevado entre as populações. O resultado do teste



**Figura 1.** Mapa da área de estudo com a localização das oito populações estudadas de *Arctocephalus australis*: **1.** Uruguai (sul do Brasil e Uruguai); **2.** Norte da Argentina, **3.** Centro da Argentina; **4.** Ilhas Falkland/ Malvinas; **5.** Sul da Argentina; **6.** Sul do Chile; **7.** Norte do Chile e **8.** Peru. Círculos representam localidades analisadas com base em dados craniométricos e os quadrados representam áreas amostradas para estudos de microsatélites de DNA.



**Figura 2.** Representação das 15 medidas e dos 62 pontos de referência (números arábicos) (ver texto) utilizadas no presente estudo. **A.** vista dorsal. **B.** vista ventral. **C.** vista lateral. **D.** Vista occipital. **CB:** comprimento basilar, **CSPCS:** comprimento da série de pós-caninos superiores direita, **LR:** largura rostral, **AC:** altura do crânio, **CP:** comprimento do palato, **LPPC1:** largura na altura do palato no pós-canino 1, **LPPC5:** largura do palato na altura do pós-canino 5, **CN:** comprimento dos nasais, **LCI:** largura da constrição interorbital, **LPS:** largura do processo supraorbital, **CR:** comprimento do rosto, **LN;** largura dos ossos nasais, **LRZ:** largura da raiz do zigomático, **CSJE:** comprimento da sutura jugo-esquamosal, **LAZ:** largura do arco zigomático.

de atribuição populacional demonstrou que 96% dos espécimes foram corretamente designados às suas populações de origem (figura 3), sugerindo que as populações são geneticamente diferentes e que seus genótipos são bem representativos da respectiva população. Estes resultados somados aos anteriores sugerem evidências de grande diferenciação genética e ausência de fluxo gênico recente entre populações do Uruguai e Peru, e que estas poderiam ter divergido recentemente.

### **Dados morfológicos**

Os resultados da ANOVA dos dados de morfometria tradicional demonstraram que 13 das 15 medidas possuíram médias estatisticamente diferentes entre as populações estudadas ( $P < 0,01$ ), sendo os espécimes do Peru maiores que os das demais populações. Em adição as análises de componentes principais (PCA) e as análises discriminantes de variáveis canônicas (VC) das 15 medidas corroboraram os resultados moleculares, evidenciando diferenças significativas entre as populações ( $\lambda$  de Wilks = 0,0698;  $F = 4,102$ ;  $GL = 105/835,01$ ;  $P < 0,0001$ ) e uma separação dos espécimes em dois grandes grupos geográficos *a priori*: um formado pelas populações existentes no lado atlântico da América do Sul, e outro o grupo do lado pacífico formado pelas amostras do Peru e norte do Chile. Os espécimes da região sul do Chile estão dispersos no grupo do Atlântico. Foram geradas funções discriminantes de classificação usando cinco medidas que concentravam a maior parte da variação (CSPCS, LPPC5, LRZ, LN e CSJE). Os resultados foram altamente significativos ( $\lambda$  de Wilks = 0,317;  $F = 75,330$ ;  $GL = 5, 175$ ;  $P < 0,00001$ ), com os espécimes do Pacífico apresentando escores maiores que os do Atlântico na maioria dos eixos discriminantes.

Esta análise classificou corretamente 97% (58 em 60 espécimes) dos espécimes, enquanto que a classificação pelo método *jackknifed* resultou em 93% (56 em 60) espécimes corretamente classificados. Não foi possível criar uma função para o Chile devido ao reduzido número de espécimes. Os dois escores foram calculados para cada espécime e, os espécimes foram então agrupados de acordo com seus escores de classificação mais alta. As funções de classificação obtidas foram:

**Grupo do Atlântico:** Escore:  $-217,116 + 6,220(\text{CSPCS}) + 2,398(\text{LPPC5}) - 2,094(\text{LRZ}) + 1,293(\text{LN}) - 0,172(\text{CSJE})$

**Grupo do Pacífico:** Escore:  $-246,283 + 6,659(\text{CSPCS}) + 2,823(\text{LPPC5}) - 1,724(\text{LRZ}) + 0,218(\text{LN}) + 0,177(\text{CSJE})$

Desta forma, através destas equações de função discriminante criou-se um método preciso capaz de identificar se um crânio de *Arctocephalus australis* pertenceria a espécimes do Atlântico ou do Pacífico através da realização de somente cinco medidas

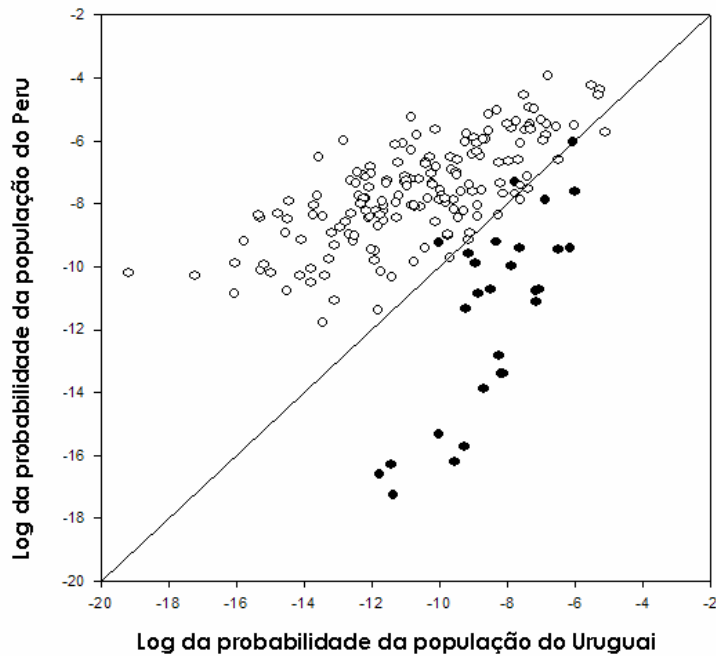
cranianas. Estas funções de classificação podem ser úteis principalmente na identificação de espécimes depositados em museus que possuem procedência des conhecida (Monteiro-Filho *et al.*, 2002).

Os resultados da morfometria geométrica para a forma do crânio foram semelhantes aos observados na morfometria tradicional, com todas as vistas cranianas estudadas apresentando diferenças significativas entre as populações (dorsal:  $\lambda$  de Wilks = 0,0511, GL: 203/1322,187,  $P < 0,0001$ ; ventral:  $\lambda$  de Wilks = 0,0335, GL: 259/1576,761,  $P < 0,0001$ ; lateral:  $\lambda$  de Wilks = 0,0755, GL: 189/154,103,  $P < 0,0001$ ; occipital:  $\lambda$  de Wilks = 0,5466, GL: 77/1535,51,  $P < 0,0001$ ). As populações foram separadas, contudo, em três grupos geográficos *a priori*: espécimes do sul Chile, do Atlântico e do Pacífico, principalmente na vista dorsal (figura 4). De um modo geral os crânios dos machos do grupo do Atlântico apresentaram uma transição bem marcada do rostro para o arco zigomático e o processo supra-orbital mais largo que os espécimes do Peru. Contudo, comparando a forma do crânio de todas as populações em conjunto, a população do sul do Chile possui o rostro e o processo supra-orbital mais largos, além de ossos nasais mais desenvolvidos dentre todas populações estudadas (ver setas na figura 4).

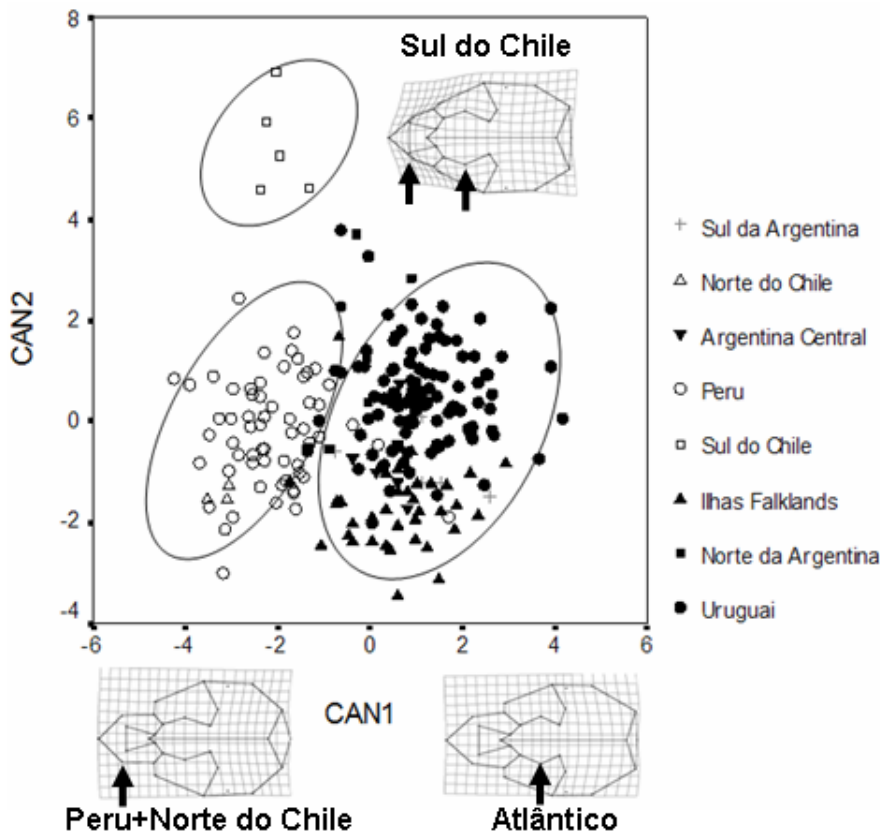
### **Discussão**

O presente estudo demonstrou através da análise integrada entre medidas cranianas, descritores geométricos, marcadores moleculares nucleares e a estatística multivariada a existência de uma descontinuidade genética e morfológica substancial entre as populações de *A. australis*, a qual também reflete um padrão de descontinuidade geográfica, indicando desta forma a existência de unidades taxonômicas distintas nos lados Pacífico e Atlântico da América do Sul.

Outras diferenças significativas foram observadas em caracteres não osteológicos ou genéticos como as divergências nos sistemas reprodutivos de ambas populações (harém no Uruguai, Cappozo, 1996; *lekking* no Peru, Majluf *et al.*, 1996), diferenças morfológicas externas em fêmeas adultas (58 kg no Peru, Majluf, 1992; 41,7 kg no Uruguai, Lima e Paez, 1995), diferenças nas pressões seletivas atuando sob cada população em seu respectivo ecossistema (*e.g.* recorrentes eventos de ENSO no Peru e a caça no Atlântico até 1991), além de diferenças significativas no período médio de nascimentos (19 de novembro no Peru, 15 de dezembro no Chile e 17 de dezembro no Uruguai; Pavés com. pess.) sugerindo uma assincronia reprodutiva e conseqüentemente um isolamento reprodutivo entre as populações de lado opostos da América do Sul.



**Figura 3.** Espécimes de *Arctocephalus australis* corretamente atribuídos à população do Peru (círculos brancos) possuem a maioria dos genótipos distribuídos acima da linha de 45° enquanto que os espécimes corretamente atribuídos a população do Uruguai (círculos negros) estão abaixo da linha de 45°. Número total de indivíduos analisados = 198 (Uruguai n= 29 e Peru n= 169).



**Figura 4.** Análise das variáveis canônicas, vista dorsal. Diagramas representam a forma do crânio de cada grande grupo formado pela análise nos dois extremos de escores de cada eixo canônico (CAN1 e CAN2). Elipses representam 95% dos espécimes. Setas indicam áreas de maior variação na forma do crânio.

Estudos recentes do mtDNA indicaram a existência de linhagens mitocondriais distintas (monofilia recíproca) entre as mesmas populações, sugerindo histórias evolutivas distintas (Tuñez *et al.*, 2007). Contudo, devido à herança matrilinear do mtDNA (Avise, 1994) e a conhecida filopatria da espécie (Vaz-Ferreira, 1982), a

estruturação encontrada poderia ser um reflexo da história evolutiva das fêmeas. Entretanto, os resultados apresentados no presente estudo usando como marcadores nucleares do tipo DNA microssatélites refletem a contribuição de machos e fêmeas para o fluxo gênico e indicaram ausência de fluxo recente entre as populações estudadas.

A descontinuidade da distribuição da espécie na costa chilena (hiato de 2.000 km no costa central do Chile), juntamente com presença da massa continental da América do Sul separando as populações do Peru e Atlântico e o possível isolamento reprodutivo oriundo da assincronia reprodutiva das populações, sugerem ainda a existência de barreiras de grande magnitude que tornam pouco factível a existência de fluxo gênico entre populações tão separadas geograficamente. Estas barreiras poderiam ter levado a uma fragmentação na distribuição original da espécie e a um subsequente processo de especiação alopátrica entre as populações do Atlântico e Pacífico, fenômeno que também teria sido responsável pela diversificação em seis espécies atuais do gênero de *Arctocephalus* (Démeré *et al.*, 2003).

Desta forma, considera-se que todas estas evidências apresentadas sejam suficientes para refutar a hipótese de King (1954) da existência de três subespécies de *A. australis* e sugerir que a população do Peru (e norte do Chile) seja elevada à categoria de espécie plena. Neste sentido a espécie *Arctocephalus australis* incluiria as populações localizadas na costa atlântica da América do Sul (Uruguai, Ilhas Falkland, toda a costa da Argentina) e a espécie *Arctocephalus* sp. A, incluiria apenas as populações da costa pacífica da América do Sul (Peru e norte do Chile). Apesar da grande diferenciação morfológica dos espécimes analisados do sul do Chile, não foi possível chegar a nenhuma conclusão taxonômica em função do reduzido número de espécimes analisados morfológicamente (n=5) e da ausência de dados moleculares para esta população. É importante salientar que os mesmos espécimes que autora examinou foram também examinados para este estudo, no entanto os mesmos foram separados por sexo e idade e os machos adultos analisados separadamente. King (1954) possivelmente incluiu em sua análise além de machos adultos, espécimes fêmeas e machos jovens. Esta inclusão de espécimes com sexo e categorias etárias diferentes pode ter levado a este resultado equivocado tendo em visto o grande dimorfismo sexual da espécie (Oliveira *et al.*, 2005).

Por fim é importante salientar que a nova espécie sugerida de lobo-marinho para costa do Peru possui o tamanho efetivo de apenas 2,153 indivíduos (Oliveira *et al.*, 2006) e está classificada como em perigo de extinção como resultado de um declínio populacional de 72% entre 1996 e 1998 (Arias-Schreiber and Rivas, 1998), causado pela baixa disponibilidade de recurso alimentar durante o mais severo fenômeno de El Niño da

história ocorrido em 1997-1998. Desta forma, considerar esta população como uma espécie distinta de lobo-marinho, e possivelmente endêmica para a costa do Peru e norte do Chile, pode ser um passo crucial para as futuras políticas de conservação e manejo desta espécie.

### **Referências bibliográficas**

- Arias-Schreiber M and Rivas C (1998) Distribución, tamaño y estructura de las poblaciones de lobos marinos *Arctocephalus australis* y *Otaria byronia* en el litoral Peruano, en Noviembre 1996 y Marzo 1997. Informe Progresivo del Instituto del Mar del Perú 73: 17-32.
- Awise JC (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution . New York: Chapman & Hall pp. 511.
- Cappozzo HL, Perez F and Batalles LM (1996) Reproductive behavior of South American fur seals in Uruguay. In International Symposium and workshop on Otariid reproductive strategies and conservation , p. 37. Washington, EUA. 12-16 April 1996.
- Deméré TA, Berta A and Peter JA (2003) Pinnipedimorph evolutionary biogeography. Bull Am Mus Nat His 279: 32-76
- Gemmell NJ, Allen PJ, Goodaman SJ and Reed JZ (1997) Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. Mol Ecol 6: 661-666.
- Goodman SJ (1997) Rst calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. Mol Ecol 6: 881-885.
- Guerra CG and Portflitt GK (1991) El Niño on pinnipeds in Northern Chile. In Trillmich F and Ono KA (eds) Pinniped and El Niño, responses to environmental stress. Springer-Verlag Press, Berlin, pp 47-54.
- Hingst-Zaher E, Marcus LF and Cerqueira R (2000) Application of geometric morphometrics to the study of postnatal size and shape changes in the skull of *Callomys expulsus*. Hystrix 11: 99-114.
- King JE (1954) The otariid seals of the Pacific coast of America. Bull British Mus (Natural History) 2: 309-337.
- Lima M and Páez E (1995) Growth and reproductive patterns in the South American fur seal. J Mammal 76: 1249-1255.
- Majluf P, Riveros JC and Parlane S (1996) Cool spots as "hot spots": the evolution of lekking in the South American fur seal. In Croxall JP and Gentry RL (eds) International Symposium and workshop on Otariid reproductive strategies and conservation . Washington, EUA. p.26. 12-16 April 1996.

- Monteiro-Filho ELA, Monteiro LR and Reis S (2002) Skull shape and size divergence in dolphins of the genus *Sotalia*: a tridimensional morphometric analysis. *J Mammal* 83: 125-134.
- Ohta T and Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Gen Research* 22: 201-204.
- Oliveira LR, Hingst-Zaher E and Morgante JS (2005) Size and shape sexual dimorphism in the skull of the South American fur seal, *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) (Carnivora: Otariidae). *LAJAM* 4: 27-40.
- Oliveira LR, Arias-Schreiber M, Meyer D and Morgante JS (2006) Effective population size in a bottlenecked fur seal population. *Biol Cons* 131: 505-509.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I and Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol Ecol* 4: 347-354.
- Pinedo MC (1990) Ocorrência de Pinípedes na costa brasileira. *Garcia de Orta, Serie Zoologia* 15: 37-48.
- Raymond M and Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Her* 86: 248-249.
- Repenning CA, Peterson RS and Hubbs CL (1971) Contributions to the systematics of the southern fur seals, with particular reference to the Juan Fernández and Guadalupe species. In Burt WH (ed), "Antarctic Pinnipedia", *Antarctic Research*, 18:1-34.
- Seal Conservation Society (2006) South American Fur Seal, <http://www.pinnipeds.org/species/samfursl.htm> (March 30, 2006).
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981. *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> ed. New York.
- Túnez C, Centrón, D, Cappozzo, HL and Cassini MH (2007) Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). *Mamm Biol* 72: 193-203.
- Vaz-Ferreira R (1982) *Arctocephalus australis* Zimmerman, South American fur seal. *Mammals in the seas, FAO Fisheries series, Small cetaceans, seals, sirenians and otters* 4: 497-508.
- Ximenez IM and Langguth E (2002) *Isla de Lobos*. Graphis ed. Montevideo, 227pp.
- Zimmerman EAW Von (1783) "Geographische Geschichte des Menschen, und der Allgemeiss Verbreiteten Vierfüssigen Thiere", Leipzig. 3:1778-1783