

RELAÇÃO GENÉTICA E NÍVEIS DE PARENTESCO EM AGREGAÇÃO DE BOTO-VERMELHO (*Inia geoffrensis*) DO BAIXO RIO NEGRO, AMAZONAS - AM

Ellen Helena Santos de Pinho GARCIA¹

Vera Maria Ferreira da SILVA²

Izeni Pires FARIAS³

Tomas HRBEK³

Waleska GRAVENA⁴

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

²Colaboradora CBIO/INPA; ³Colaborador Genética/UFAM;

⁴Orientadora INPA-FIXAM/FAPEAM.

INTRODUÇÃO

A organização social é diversificada entre os grupos de animais, e associações são muitas vezes caracterizadas por padrões de relacionamento e reprodução (Blundell *et al.* 2002). Muitas espécies de mamíferos formam agregações, com a finalidade de integração e proteção ou reprodução e competição territorial. (Kappeler e van Schaik 2002; Pusey e Packer 1987).

Em mamíferos aquáticos, como os cetáceos, alianças são comumente observadas (Norris e Dohl 1980). A maioria explora conjuntamente grandes áreas. Contudo, há espécies que ocupam periodicamente as mesmas regiões (Norris e Dohl 1980) e de forma solitária (da Silva 2002); sendo esta a característica dos botos (Herman 1980; Martin e da Silva 2004; da Silva e Martin 2014).

O boto-vermelho pertence à subordem Odontoceti, à superfamília Platanistoidea, a qual inclui espécies de golfinhos de rio, à família Iniidae e ao gênero *Inia* (da Silva e Martin 2014; Best e da Silva 1989a; Rice 1998). Nos rios do norte da América do Sul são encontradas três espécies de botos: *Inia boliviensis* (Gravena *et al.* 2014; da Silva e Martin 2014); *Inia araguaiaensis* (Hrbek *et al.* 2014); e *Inia geoffrensis*, com ampla distribuição ao longo dos rios das bacias dos rios Orinoco e Amazonas (Best e da Silva 1989a).

A espécie *I. geoffrensis* ocorre ao longo de praticamente todo o rio Negro, afluente do rio Amazonas (Best e da Silva 1993). O boto é considerado o maior cetáceo de água doce (Best e da Silva 1989a), e endêmico da bacia amazônica (Best e da Silva 1993).

São animais solitários e são raras as observações de grupos com mais de quatro indivíduos. As agregações eventualmente observadas ocorrem em áreas de alimentação, descanso e em épocas de corte e acasalamento (da Silva 2002). Embora avistados em grupos, estes não são considerados coesos e permanentes (Martin e da Silva 2004) e apenas a relação mãe e filhote é considerada estável e duradoura (Best e da Silva 1989b; Martin e da Silva 2004).

No rio Negro existem agregações de botos formadas artificialmente por estímulo antrópico. Atualmente, próximo à cidade de Manaus – AM, existe pelo menos seis flutuantes de interação com botos utilizados para atividade de ecoturismo, dentro de Unidades de Conservação (Nunes 2015) (Figura 1). Nestes locais ocorre interação entre botos de vida livre e humanos, por meio do provisionamento dos animais (alimentação artificial) (Gravena 2007). Assim, os botos se aproximam dos flutuantes; reunindo, inúmeros animais ao mesmo tempo no mesmo local (Alves *et al.* 2013).

Pela perspectiva dos tratadores, as agregações formadas em seus estabelecimentos são constituídas por indivíduos de uma mesma família, onde novas gerações são formadas. No entanto, como já descrito, os botos possuem hábito geralmente solitário e não formam naturalmente interações duradouras e estáveis (da Silva 2002).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar as relações genéticas e de parentesco, utilizando marcadores nucleares microssatélites e marcadores de sexo em duas diferentes agregações de botos localizadas no rio Negro. Além disso, realizar comparações entre os indivíduos dentro cada agregação, bem como entre as duas agregações analisadas para verificar possíveis variações genéticas entre elas.

MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção do material biológico dos botos para esse estudo foi realizada no município de Iranduba, no Flutuante do Davi ($3^{\circ}05'35.4''S$ $60^{\circ}28'31.0''W$) e no Flutuante do Jacaré ($3^{\circ}5'54.35''S$ $60^{\circ}17'10.64''W$). Estes dois flutuantes localizam-se a 54 km e 30 km de distância de Manaus respectivamente, separados cerca de 24 km de distância. Ambos estão situados na Área de Proteção Ambiental (APA) da margem direita do Rio Negro – Setor Paduari/Solimões (Figura 1).

A primeira coleta ocorreu no flutuante do Davi, localizado na comunidade São Tomé. Foram coletadas amostras de pele de 15 indivíduos que frequentaram o estabelecimento no período entre outubro e novembro de 2015. A segunda coleta ocorreu no flutuante do Jacaré, localizado nas proximidades da Cachoeira do Castanho. As amostras de seis botos foram coletadas durante o mês de dezembro e janeiro.

As coletas foram realizadas enquanto os animais recebiam alimento. Os tratadores identificaram os animais pelo nome para garantir que não houvesse repetições de amostras.

A coleta foi realizada com o auxílio de um dedal de costura modificado, descrito por Cunha *et al.* (2010) e com adaptações de Gravena (2007), especificamente para coletas de amostra de pele de golfinho.



Fonte: Gravena *et al.*, in prep.

Figura 1. Seis flutuantes identificados nesse estudo estão numerados na figura. Destacado em círculo rosa a localização dos dois flutuantes onde foram realizadas as coletas utilizadas nesse estudo, Flutuante do Davi, rio Negro (3) e Flutuante do Jacaré, próximo a Cachoeira do Castanho, rio Negro (5). Demais flutuantes identificados na região: flutuante Boto-cor-de-rosa, Novo Airão (1); flutuante do Boto, rio Ariáú (2); flutuante Recanto do Boto, rio Acajatuba (4), e flutuante do Cristovão, rio Tarumã-Mirim (6).

Em laboratório, filamentos de tecido epitelial de cerca de 3 mm cada foram submetidas a extração de DNA, utilizando-se o protocolo CTAB (Doyle e Doyle 1987). O material restante foi ressuscitado com água

ultrapura e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A qualidade das extrações foi verificada por meio da eletroforese em 1% de gel Agarose.

Para a análise de parentesco foram utilizados 8 locos microssatélites, Ttr48 e TtruAAT40, desenvolvidos para outras espécies de cetáceos (Rosel *et al.* 2005). Os locos, Ig3A1, Ig2B1, Ig2F2, Ig10E, Ig11D2 e Ig8H1, foram desenvolvidos para o gênero *Inia* por Gravena (2009).

Os marcadores foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e as condições das reações e as ciclagens foram realizadas como padrão descrito por Gravena (2007). Um *primer* (M13) marcado com fluorescência (FAM) foi utilizado nas reações de PCR, como descrito por Schuelke (2000).

Nos PCRs de genotipagens foram realizadas duas ciclagens, com três estágios de temperatura diferentes.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de Agarose 1%, e as amostras foram diluídas. As placas de genotipagem foram analisadas no sequenciador ABI 3130 xl. A quantidade de pares de base dos alelos foi mensurada em comparação ao padrão ROX 425 pelo programa GeneMapper. Uma tabela foi feita com os tamanhos dos alelos dos indivíduos, a qual foi utilizada como *input file* para os diferentes programas.

Para determinar o sexo dos indivíduos utilizou-se a reação de PCR, por meio de um par de marcadores moleculares (desenvolvidos para cetáceos) de cada gene, ZFX e SRY; ambos encontrados nos cromossomos X e Y, respectivamente (Richard *et al.* 1994; Bérubé e Palsbøll 1996; Rosel 2003). O resultado da amplificação foi observado em gel de Agarose 1,5%.

Para evitar repetições na amostragem, embora os tratadores tenham identificado os botos durante as coletas, foi conferido no programa MSTOOLS, versão 3.0, possíveis genótipos idênticos.

Com o objetivo de inferir qual o provável número de grupos biológicos (K) existentes as amostras, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) e gerar probabilidades posteriores para diferentes números de grupos utilizando os modelos de “*admixture*” e “*correlated-allelic-frequencies*”. As análises foram feitas utilizando 1.000.000 cadeias de MCMC, procedidas por 100.000 cadeias MCMC descartadas como *burn-in*. Cada análise foi repetida 10 vezes.

A partir da frequência de cada alelo distribuída na população, o programa IDENTIX estimou o grau de parentesco entre os indivíduos das duas agregações, pelo coeficiente de parentesco r (Belkhir *et al.* 2002), utilizando-se o método de Queller e Goodnight (1989). Este programa assume que os grupos não são relacionados. Para valores de r em torno de 0,12, 0,25, 0,50 ou maior que 0,50, os indivíduos são considerados com relacionamentos de terceira ordem (primos), de segunda ordem (meio irmãos), e de primeira ordem (irmãos verdadeiros, ou pais e filhos), respectivamente (Queller e Goodnight 1989). Para valores abaixo de 0,12, bem como valores negativos, são representativos de indivíduos não aparentados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas nos dois flutuantes de ecoturismo avaliados o total de 21 amostras de boto: 15 botos do Flutuante do Davi e seis botos do Flutuante do Jacaré.

Na determinação do sexo, para o indivíduo ser considerado macho observa-se duas bandas no gel, uma relativa ao gene ZFX e a outra ao SRY. Para o indivíduo ser considerada fêmea, somente uma banda é observada, sendo representativa das duas bandas do mesmo gene (ZFX) sobrepostas, as quais são originadas dos cromossomos herdados dos pais.

Os marcadores sexuais revelaram que ambas agregações são formadas exclusivamente por indivíduos machos, provavelmente, devido à premissa de que machos e fêmeas apresentam diferentes preferências por habitat. Os

machos preferem os rios maiores, enquanto que as fêmeas com filhotes permanecem mais isoladas e procuram locais mais calmos e protegidos, podendo ser mais facilmente encontradas em florestas alagadas e dentro das áreas alagadas de várzeas (Martin e da Silva 2004).

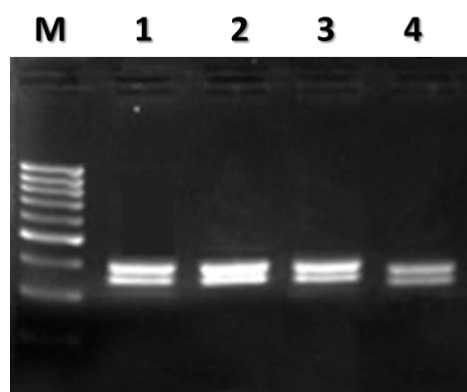


Figura 2. Foto do gel de determinação do sexo de botos da agregação do Jacaré: (1) Costelinha, (2) Fuleco, (3) Salvador, (4) Roberto e (M) Marcador 100 pb, realizados com marcadores moleculares de genes dos cromossomos X e Y.

No estudo de Gravena *et al.* (2009), semelhantemente, todos os indivíduos que frequentaram as agregações estudadas eram machos. Esta predominância poderia justificar o comportamento muitas vezes agressivo entre os botos, sendo comum observar ferimentos pelo corpo dos animais causados por mordidas intraespecíficas. Provavelmente, em virtude da disposição hierárquica entre os indivíduos pela competição do alimento ofertado (Nunes 2015).

Para a análise dos resultados de microssatélites foram eliminados dois locos (11B1 e Ttr11), devido a não amplificação de todas as amostras. Foram utilizados diferentes locos fluorescentes (HEX, FAM) e diluições, bem como PCRs e genotipagens refeitas, porém poucas amostras amplificaram no geral. Também foram eliminadas duas amostras de boto (Prog e Rob), ambas da agregação do Flutuante do Jacaré, pois, dos 10 locos utilizados, estas amostras amplificaram menos da metade de locos utilizados, o que poderia invalidar os resultados durante a análise. Assim, foram utilizados oito locos e 19 amostras de botos.

Foi verificado que nas amostras obtidas não existem genótipos idênticos nem dentro, nem entre cada uma das agregações. Sugerindo que no período amostrado não são os mesmos indivíduos frequentando as duas agregações.

O provável número de grupos biológicos inferido pelo programa STRUCTURE 2.3.4 foi $K=1$ ($\ln \text{Pr}(X|K=1) = -275,53$, ($\ln \text{Pr}(X|K=2) = -280,26$; e, ($\ln \text{Pr}(X|K=3) = -283,51$. Valores de K maiores que um tiveram probabilidade posterior menor que $K=1$ o que indica a prevalência de apenas um grupo na população estudada. Isto mostra ausência de estruturação, o que tornam os indivíduos pertencentes a mesma população, mesmo tratando-se de duas agregações distintas. Uma possível justificativa, seria a proximidade entre os dois flutuantes (24 km de distância).

No programa IDENTIX, foi determinada a relação de parentesco entre os botos a partir de comparações alélicas entre os indivíduos de cada agregação e entre elas. A proporção de comparações negativas para relação de parentesco é maior em relação às comparações positivas. Entretanto, em comparação ao estudo de Gravena *et al.* (in prep.), onde foram estudadas duas agregações (90 km de distância entre elas) foram verificados poucos pares de indivíduos aparentados.

Verificou-se, então, o aumento do número de pares de indivíduos relacionados. Provavelmente, a menor distância entre as duas agregações estudadas (24 km) contribuiu para este maior grau de parentesco.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que, os botos avaliados permanecem em grupos (artificiais) mesmo não sendo relacionados geneticamente. Assim, as formações destas agregações ocorrem pela oferta fácil de alimento, e não por pertencerem a um grupo familiar, como é relatado pelos donos dos flutuantes.

Por habitarem as mesmas áreas, os acasalamentos dos machos, possivelmente, com as mesmas fêmeas, podem ter ocorrido com maior frequência. Isto poderia justificar o aumento da relação de parentesco entre indivíduos. Nas duas agregações avaliadas, relativamente próximas geograficamente, verificaram-se resultados diferentes do estudo de Gravena (2007).

A expansão da atividade ecoturística com botos selvagens traz a necessidade de se assegurar que tais atividades sejam sustentáveis. Para que sejam implementadas estratégias de manejo, antes, é necessário conhecer bem a natureza dessas agregações, cujo comportamento e própria natureza podem estar sendo moldados pela influência antrópica.

REFERÊNCIAS

- Alves, L.C.P. de S.; Andriolo, A.; Orams, M.B.; Azevedo, A.F. 2013. Resource defence and dominance hierarchy in the boto (*Inia geoffrensis*) during a provisioning program. *Acta Ethologica*, 16(1): 9–19.
- Belkhir, K.; Castric, V.; Bonhomme, F. 2002. IDENTIX, a Software to Test for Relatedness in a Population Using Permutation Methods. *Molecular Ecology Notes*, 2: 611–14. doi:10.1046/j.1471-8278.
- Bérubé, M., and P. Palsbøll. 1996. Identification of Sex in Cetaceans by Multiplexing with Three ZFX and ZFY Specific Primers. *Molecular Ecology*, 5(2): 283–287.
- Best, R.C.; da Silva, V.M.F. 1989a. Amazon River Dolphin, Boto. *Inia geoffrensis* (de Blaville, 1817). In *Handbook of Marine Mammals*, edited by Ridgway, S.H.; Harrison, R.J. 3: 23–34. London: Academic Press.
- Best, R.C.; da Silva, V.M.F. 1989b. Biology, Status and Conservation of *Inia geoffrensis* in the Amazon and Orinoco River Basins. In *Biology and Conservation of the River Dolphins*, edited by Perrin, W.F.; Brownell Jr, R.L.; Kaiya, Z.; Jionkang, L. 3: 23–34.
- Best, R.C.; da Silva, V.M.F. 1993. *Inia geoffrensis*. *Mammalian Species*, 426: 1-8.
- Blundell, G.M.; Ben-David, M.; Bowyer, R.T. 2002. Sociality in river otters: cooperative foraging or reproductive strategies? *Behavioral Ecology*, 13(1): 134–141.
- Cunha, H.A.; Watts, P.C. 2007. Twelve Microsatellite Loci for Marine and Riverine Tucuxi Dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*). *Molecular Ecology Notes* 7: 1229–31. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01839.x.
- da Silva, V.M.F.; Martin, A.R. 2014. Family Iniidae (Amazon River Dolphins). In *Handbook of The Mammals of the World*, edited by Wilson, D.E.; Mittermeier, R.A. Vol 4. Sea, 364–79. Barcelona: Lynx Edicions.
- da Silva, V.M.F. 2002. Amazon River Dolphin, *Inia geoffrensis*. In: Perrin, W.F.; Wursig, B.; Thewissen, J.G.M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, London (1473 pp).
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Gravena, W.; Hrbek, T.; da Silva, V.M.F.; Farias, I.P. (in prep.). Relatedness analysis of boto (*Inia geoffrensis* – Cetacea:Iniidae) in two provisioning sites in the lower Negro River - Amazonas, Brazil. *Marine Mammal Science*.

- Gravena, W.; Farias, I.P.; da Silva, M.N.F.; da Silva, V.M.F.; Hrbek, T. 2014. Looking to the Past and the Future: Were the Madeira River Rapids a Geographical Barrier to the Boto (Cetacea: Iniidae)? *Conservation Genetics*, 15(3): 619–29. doi:10.1007/s10592-014-0565-4.
- Gravena, W.; Hrbek, T.; da Silva, V.M.F.; Astolfi-Filho, S.; Farias, I.P. 2009. Microsatellite Loci for Population and Parentage Analysis in the Amazon River Dolphin (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817) *Molecular Ecology Resources*, 9(2): 600–603. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02458.x.
- Gravena, W. 2007. Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para análise de parentesco no boto-vermelho (*Inia geoffrensis*). Manaus: [s.n.].
- Herman, L.M. 1980. *Cetacean Behaviour: Mechanisms and Functions*. Edited by L. M. Herman. New York: Wiley-Interscience.
- Hrbek, T.; da Silva, V.M.F.; Dutra, N.; Gravena, W.; Martin, A.R.; Farias, I.P. 2014. A New Species of River Dolphin from Brazil or: How Little Do We Know Our Biodiversity. *PLoS One*, 9(1): 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0083623.
- Kappeler, P.M.; van Schaik, C.P. 2002. Evolution of Primate Social Systems. *International Journal of Primatology*, 23: 707–40.
- Martin, A.R.; da Silva, V.M.F. 2004. River Dolphin and Flooded Forest: Seasonal Habitat Use and Sexual Segregation of Botos (*Inia geoffrensis*) in an Extreme Cetacean Environment. *Journal of Zoology (London)*, 263: 295–305.
- Norris, K.S.; Dohl, T.P. 1980. The Behaviour of the Hawaiian Spinner Porpoise, *Stenella longirostris*. *Fisheries Bulletin*, 77: 821–47.
- Nunes, A.C.G. 2015. Respostas comportamentais do boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) ao turismo de interação no baixo Rio Negro, Amazonas. Manaus: [s.n.].
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.J.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics Soc America*, 155(2): 945–59.
- Pusey, A.E.; Packer, C. 1987. Dispersal and Philopatry. In *Primate Societies*, edited by B.B. Smuts, D.L. Cheney, R.M.; Seyfarth, R.W.; Wrangham; *Struhsaker*, T.T. 250–66.
- Queller, D.C.; Goodnight, K.F.T.T. 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution*, 43: 258–75.
- Rice, D.W. 1998. *Marine mammals of the world. Systematics and distribution*. The Society for Marine Mammalogy.
- Richard, K.R.; McCarry, S.W.; Wright, J.M. 1994. DNA Sequence from the SRY Gene of the Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) for Use in Molecular Sexing. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 873–77.
- Rosel, P.E. 2003. PCR-Based Sex Determination in Odontocete Cetaceans. *Conservation Genetics*, 4(5): 647–49.
- Rosel, P.E.; Forgetta, V.; Dewar, K. 2005. Isolation and Characterization of Twelve Polymorphic Microsatellite Markers in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology Notes*, 5(4): 830–33. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01078.x.
- Schuelke, M. 2000. An Economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2): 233–234.