

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DOS
CROCODILIANOS JACARÉ-AÇÚ (*Melanosuchus niger*) E JACARÉ-TINGA
(*Caiman crocodylus*) DA AMAZÔNIA

WILLIAM RANGEL VASCONCELOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – Amazonas
2005

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DOS
CROCODILIANOS JACARÉ-AÇÚ (*Melanosuchus niger*) E JACARÉ-TINGA
(*Caiman crocodylus*) DA AMAZÔNIA

WILLIAM RANGEL VASCONCELOS

Orientadora : Dra. Izeni Pires Farias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – Amazonas
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Vasconcelos, William Rangel

Diversidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) da Amazônia. -- 2005.

xviii, 78 f. : il.

Dissertação (mestrado)—INPA/UFAM, 2005.

1. Amazônia 2. *Melanosuchus niger* 3. *Caiman crocodilus* 4. Filogeografia 5. Citocromo *b* 6. Frequência haplotípica 7. Genética da conservação.

CDD 19. ed. 597.980415

Sinopse:

Dezoito populações de crocodilianos da Amazônia (nove de *Melanosuchus niger* e nove de *Caiman crocodilus*) foram analisadas para se identificar padrões espaciais e temporais da variabilidade genética. Tais análises incluíram frequência gênica e nucleotídica, AMOVA, *Fst*, testes de neutralidade seletiva de mutações, teste de Mantel e análise do agrupamento de clados (NCPA). Todos estes testes foram feitos a partir da variação na frequência dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo *b* e revelaram padrões semelhantes nas duas espécies. Observou-se elevada diversidade haplotípica, baixa diversidade nucleotídica, crescimento populacional e fragmentação entre as populações de drenagens fora da bacia Amazônica em relação às populações desta bacia. Isolamento por distância foi detectado nas populações de *M. niger*. Houve diferenciação genética entre algumas populações de ambas as espécies, quantificada pelo índice de *pairwise Fst*. Estes resultados podem fornecer subsídios para um manejo e/ou conservação mais eficaz.

Palavras-chave: Variabilidade genética, crocodilianos, *Melanosuchus niger*, *Caiman crocodilus*, DNAm, citocromo *b*, fragmentação populacional.

Dedico esta dissertação a minha família: meus pais Jóia Vasconcelos e Isaias Silva, meus irmãos Keila Elida e Wendell Mardson, aos colegas do laboratório LEGAL e da Vila Jaraqui.



"Distraídos venceremos"

Paulo Leminski

"Que ironia que o DNA também fosse o próprio instrumento que nos reconecta aos mistérios de nosso profundo passado e aumenta, em vez de diminuir, nosso senso de nós mesmos. Não "apenas substância química", afinal de contas, mas o mais precioso dos dons".

Bryan Sykes em "As Sete Filhas de Eva"

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, gostaria de agradecer sinceramente à Dra. Izeni Pires Farias, principalmente pelo seu exemplo de perseverança, trabalho e competência, no qual tentei me espelhar nestes dois últimos anos. Aproveito também para deixar meu muito obrigado à FAPEAM, pela bolsa de estudos. Ao INPA e à UFAM, instituições que tornaram possível este passo importante na carreira que escolhi (ou que me escolheu).

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores que me iniciaram na carreira científica, desde o jardim de infância (onde tudo começou) até o mestrado (onde tudo está começando). Especialmente:

À Norma Lindoso Viana que me convenceu de que Biologia seria muito melhor para mim que Arquitetura (coisa impossível de comprovar);

À Dra. Wilsea Maria Batista Figueiredo, pelo seu exemplo de ética e constante paciência quando me orientou nos meus primeiros passos na Filogeografia;

Ao Dr. Tomas Hrbek pela paciência nos momentos de dúvidas e pelo seu exemplo como pesquisador;

Ao Dr. Ronis da Silveira pela sua inestimável ajuda no trabalho de campo. Augusto Ruffeil (Guto), Boris Marione, Eduardo Matheus von Muhlen (Duca), Renato da Silveira (o Selvagem) e Pedro Alexandre Sampaio (Capiroto), pelo mesmo motivo;

Ao Dr. George Rebelo (Jaca) por sua ajuda de campo, sua contribuição literária e pelos bate-papos de boteco. Adriana Terra por sua ajuda no trabalho de campo;

Ao Msc. Marcelo Crossa do IPAM de Santarém pela disposição em sempre ajudar, contribuindo assim para o entendimento de questões ambientais na Amazônia;

À sociedade Civil Mamirauá pelo apoio logístico no início do projeto;

À The Nature Conservancy do Brasil, pelo apoio financeiro e principalmente por terem acreditado no meu trabalho;

Aos alunos que me senti responsável por seus primeiros passos na carreira científica, Herson Lima do Nascimento, Mário da Silva Nunes, Adam Alencar Leão e Edvaldo Pereira Mota;

Aos colegas de laboratório, por suas discussões, ajuda e compreensão no trato fino da convivência, que é uma arte, Wancley Santos, Maria da Conceição, Maria da Neves Viana e Rafaela Cardoso dos Santos. E posteriormente, Daniel Toffoli Ribeiro, Manuela Villar Amado, Andréa Cantanhede, Yane Almeida, Cleiton Fantin e Waleska Gravena;

Aos colegas do laboratório de Tecnologia de DNA, Enedina, Márcia, Edmar, Larissa, Alessandra e ao Dr. Spartaco Astolfi Filho;

Aos colegas Geconbebianos: Renata Schimitt, Carla Sardelle, Ivanildo Pereira, Wancley Santos, Márcia Neiva e André. E posteriormente, Carlos David Santana, Adília Nogueira, Taciana, Paulo Estéfano, Daniel Raid, Dutra, Barros e Toffoli. À Hercília e todos do GCBEv.

A todos os colegas do curso que considero mãe e pai do curso de Genética do INPA, o BADPI, se eu escrevesse nomes provavelmente não seria justo, eu não me recordaria de todos, então meus sinceros agradecimentos a todos que fazem parte deste programa de pós-graduação;

A todos os colegas que fiz na Universidade Federal do Amazonas: Paulo Evandro, Cláudio, Ed, Liene, Samanta, Marcelo Gordo, dentre outros.

Ao Fábio e Alexandre por sua amizade paraense;

A todos os amigos de Santarém e Itaituba pela grande amizade e apoio dispensados a mim através do tempo e da distância;

Aos irmãos do Espaço Cultural e Residencial Vila Jaraqui: César de Oliveira Haag, Leonardo da Silveira Rodrigues e Daniel Toffoli Ribeiro. E a todos os amigos da Vila: Adília e Joana, David Santana, Regina, Maria Joana de Albuquerque, Daniela (botinho), Camila, Paulo Evandro e etc.

Aos meus pais (Jóia Maria Holends Vasconcelos e Isaias da Silva Porto), meus irmãos (Wendell Mardson Vasconcelos e Keila Elida Vasconcelos) e minhas sobrinhas (Wendy e Ana Carolina) por terem compartilhado comigo as alegrias de um trabalho que deu certo (graças a Deus). A todos vocês que fazem parte do meu mundo e contribuíram de certa forma para que este trabalho fosse concluído, meu *muito obrigado*.

RESUMO

Os crocodilianos Amazônicos são incluídos em três gêneros, *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus*. Dentro destes, duas espécies merecem atenção especial porque foram muito exploradas em décadas passadas e hoje passam por uma recuperação populacional, o jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) e o jacaré-açú (*Melanosuchus niger*), que são os crocodilianos mais abundantes da Amazônia brasileira. Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de quantificar o grau de variabilidade genética e estrutura populacional dos crocodilianos *M. niger* e *C. crocodilus*, através de um marcador de linhagem materna (gene mitocondrial citocromo *b*), e desta forma, contribuir com informações que possam ser utilizadas em futuros planejamentos para a conservação e o manejo destas espécies. Com base nas análises de aproximadamente 1.080 pares de bases obtidas para um total de 125 indivíduos de *C. crocodilus* e 132 de *M. niger* provenientes de 9 e 11 localidades respectivamente, em diferentes regiões da Amazônia Brasileira, Peru, Equador e Guiana Francesa, foi possível identificar padrões genéticos biogeográficos. Os resultados demonstram que algumas populações de ambas as espécies estão em expansão populacional mostrando um número relativamente grande de haplótipos únicos. Ambas as espécies apresentaram elevada diversidade gênica e baixa diversidade nucleotídica. As análises de clados agrupados indicaram expansão, colonização a longa distância e fragmentação no passado, como possíveis eventos histórico-demográficos em populações de *C. crocodilus*. Em *M. niger*, os dados não foram conclusivos para identificar possíveis eventos históricos. Entretanto, possibilitaram identificar a existência de correlação entre divergência genética e distância geográfica. Esta correlação também foi identificada pelo

teste de Mantel, indicando isolamento por distância em *M. niger* e pelos valores significativos de *pairwise* F_{st} que confirmaram a ocorrência de fragmentação. Esta fragmentação foi identificada entre as populações oriundas de rios que deságuas diretamente nas drenagens do oceano Atlântico em relação às populações da bacia Amazônica, entretanto, dentro da bacia Amazônica algumas populações também apresentaram estrutura genética populacional, como por exemplo, a população de *M. niger* do rio Napo. As populações da Guiana Francesa e do Estado do Amapá representam potenciais unidades evolutivas diferenciadas das populações da bacia Amazônica.

ABSTRACT

The Amazonian crocodylians are included in three genera, *Caiman*, *Melanosuchus* and *Paleosuchus*. Within these genera, two species deserve special attention because they were overexploited in past decades; these are the black caiman (*Melanosuchus niger*) and spectacled caiman (*Caiman crocodilus*), the two more abundant crocodylians in the Brazilian Amazon. The objective of this research was to quantify the degree of genetic variability and population structure of the black caiman and the spectacled caiman using a matrilineal marker (mitochondrial gene cytochrome *b*), which to contribute information that can be used for management and for conservation of these species. Approximately 1080 bp were sequenced for a total of 125 individuals of *C. crocodilus* and 132 of *M. niger* representing 9 and 11 localities of each species, respectively. Sampling localities were distributed throughout the Brazilian Amazon, as well as Peru, Ecuador and French Guyana. Results of population genetic analyses demonstrate that some populations of both species are in a process of a demographic expansion shown by a relatively greater number of singleton haplotypes. Both species have high gene diversity but low nucleotide diversity. The Nested Clade Phylogeographical Analysis indicated range expansion, long-distance colonization and past fragmentation as possible historic-demographic event *C. crocodilus* populations. NCPA results for *M. niger* showed no significant historical events. However, in *M. niger* a significant correlation between genetic divergence and geographic distance also was identified by the Mantel test, indicating isolation by distance. The isolated populations of the Atlantic drainages potentially represent evolutionary units differentiated from the Amazon basin populations.

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| FICHA CATALOGRÁFICA..... | III |
| DEDICATÓRIA..... | IV |
| EPÍGRAFE..... | V |
| AGRADECIMENTOS..... | VI |
| RESUMO..... | IX |
| ABSTRACT..... | XI |
| LISTA DE TABELAS..... | XV |
| LISTA DE FIGURAS..... | XVI |
| ANEXO..... | XVIII |
| | Pag. |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1-HISTÓRIA NATURAL DE CROCODILIANOS AMAZÔNICOS..... | 1 |
| 1.2-DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DE <i>Caiman crocodilus</i> E <i>Melanosuchus niger</i> | 3 |
| 1.3-CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PESCA E COMERCIALIZAÇÃO DE CROCODILIANOS NA AMAZÔNIA..... | 5 |
| 1.3.1- Status de Conservação em <i>M. niger</i> e <i>C.crocodilus</i>..... | 7 |
| 1.4 – GENÉTICA COMO FERRAMENTA ÚTIL NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE | 9 |
| 1.4.1- Uso de DNA mitocondrial em estudos genéticos..... | 11 |
| 1.4.2- Estudos moleculares na ordem Crocodylia..... | 13 |
| 1.5- JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES..... | 18 |
| 1.6- OBJETIVOS..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6.1- Objetivo geral..... | 19 |
| 1.6.2- Objetivos específicos..... | 19 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 2.1- LOCAIS DE COLETA E AMOSTRAGEM | 20 |
| 2.2- MÉTODOS LABORATORIAIS..... | 23 |
| 2.2.1- Extração de DNA..... | 23 |
| 2.2.2- Amplificação <i>in vitro</i> do gene da citocromo <i>b</i> | 23 |
| 2.2.3- Sequenciamento do gene citocromo <i>b</i> | 25 |
| 2.2.4- Alinhamento das seqüências nucleotídicas..... | 26 |
| 2.3 - MÉTODOS DE ANÁLISES INTRA-ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 2.3.1- Cladogramas de haplótipos e a inferência de eventos históricos..... | 27 |
| 2.3.2- Polimorfismo molecular em populações..... | 28 |
| 2.3.3- Testes de neutralidade e equilíbrio genético..... | 29 |
| 2.3.4- Metodologias para detectar estrutura de população..... | 31 |
| 3- RESULTADOS..... | 36 |
| 3.1- <i>Caiman crocodilus</i> | 36 |
| 3.2- <i>Melanosuchus niger</i> | 44 |
| 4- DISCUSSÃO..... | 53 |
| 4.1- <i>Caiman crocodilus</i> | 53 |
| 4.1.1- Polimorfismo da região do citocromo <i>b</i> em <i>C. crocodilus</i> e testes de neutralidade..... | 53 |
| 4.1.2- Análise Filogeográfica do Agrupamento de Clados (ou NCPA) e estrutura genética entre populações de <i>C. crocodilus</i> | 54 |
| 4.2 – <i>Melanosuchus niger</i> | 58 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1 - Diversidade genética e neutralidade de mutações em <i>M. niger</i> | 58 |
| 4.2.2 – Análise Filogeográfica de Clados Agrupados ou NCPA e estrutura genética entre populações de <i>Melanosuchus niger</i>..... | 59 |
| 4.3 – BENEFÍCIOS PARA A TOMADA DE DECISÕES QUANTO AO MANEJO E A CONSERVAÇÃO DE CROCODILIANOS AMAZÔNICOS..... | 61 |
| 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01- Frequência dos haplótipos do gene citocromo <i>b</i> em populações de <i>C. crocodilus</i> | 37 |
| Tabela 02- Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em <i>C. crocodilus</i> , mostrando os valores das distâncias dos clados (D_c), distâncias dos clados agrupados (D_n) e distância dos clados interiores versus os de ponta (I-T)..... | 38 |
| Tabela 03- Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva..... | 40 |
| Tabela 04- Matriz mostrando os valores de F_{st} das comparações entre os pares de populações de <i>C. crocodilus</i> e os números efetivos de migrantes por geração (Nm)..... | 41 |
| Tabela 05- Distribuição dos 41 haplótipos encontrados no fragmento de 1027 pb em <i>M. niger</i> | 45 |
| Tabela 06- Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em <i>M. niger</i> , mostrando os valores das distâncias dos clados (D_c), distâncias dos clados agrupados (D_n) e distância dos clados interiores versus os de ponta (I-T)..... | 47 |
| Tabela 07- Matriz de valores de <i>pairwise</i> F_{st} usando o método da distância (abaixo da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) entre os pares de populações (acima da diagonal) em populações de <i>M. niger</i> | 49 |
| Tabela 08 - Sumário com os principais índices de diversidade genética populacional em <i>M. niger</i> e valores dos testes de neutralidade..... | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01- Filhotes de jacaré-tinga - <i>C. crocodilus</i> | 2 |
| Figura 02- Captura de <i>M. niger</i> | 4 |
| Figura 03- Distribuição geográfica de <i>Caiman crocodilus</i> e <i>Caiman yacare</i> | 5 |
| Figura 04- Esquema gráfico do DNA mitocondrial de <i>Caiman crocodilus</i> com destaque à região do gene citocromo <i>b</i> | 11 |
| Figura 05- Cladograma ilustrando as relações filogenéticas entre crocodilianos existentes e extintos..... | 14 |
| Figura 06- Distribuição geográfica das 11 populações de jacaré-açú analisadas e os respectivos números amostrais por localidade..... | 21 |
| Figura 07- Distribuição geográfica das 9 populações de <i>C. crocodilus</i> analisadas e os respectivos números amostrais por localidade..... | 22 |
| Figura 08- Detalhe do DNAm _t mostrando as regiões de anelamento dos primers..... | 25 |
| Figura 09- Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídio mostrando o fragmento do gene citocromo <i>b</i> amplificado..... | 26 |
| Figura 10- Modelo de Ilha simples com o fluxo de migrantes da população principal (A) em direção a uma população previamente isolada (B)..... | 33 |
| Figura 11- Esquema do modelo de n-ilhas, o qual utiliza dois parâmetros: tamanho efetivo de população e taxa de migração por geração..... | 34 |
| Figura 12- Cladograma dos 38 haplótipos de <i>C. crocodilus</i> | 39 |
| Figura 13- Árvore filogenética de <i>Neighbor Joining</i> sem raiz baseada nos valores de <i>pairwise F_{st}</i> das populações de <i>Caiman crocodilus</i> | 42 |

| | |
|---|----|
| Figura 14- Árvore dos haplótipos inferida com 95% de parcimônia, contendo os 41 haplótipos de DNAMt detectados em <i>M. niger</i> | 46 |
| Figura 15- Árvore filogenética de <i>Neighbor Joining</i> sem raiz baseada nos valores de <i>pairwise F_{st}</i> das populações de <i>Melanosuchus niger</i> | 51 |

ANEXO

| | |
|---|----|
| Tabela A- Sítios variáveis nos 1085 pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo <i>b</i> de <i>Caiman crocodilus</i> | 74 |
| Tabela B- Sítios variáveis nos 1027 pb dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo <i>b</i> de <i>Melanosuchus niger</i> | 75 |
| Figura A- Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de <i>C. crocodilus</i> | 76 |
| Figura B- Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de <i>M. niger</i> | 76 |
| Figura C- Composição da freqüência nucleotídica da região do citocromo <i>b</i> de <i>C. crocodilus</i> | 77 |
| Figura D- Composição da freqüência nucleotídica da região do citocromo <i>b</i> de <i>M. niger</i> | 77 |
| Figura E- Freqüência dos aminoácidos nas seqüências de <i>C. crocodilus</i> | 78 |
| Figura F- Freqüência dos aminoácidos nas seqüências de <i>M. niger</i> | 78 |
| Tabela C- Matriz de distâncias de rios em Km utilizada nas análises de agrupamento de clados (NCPA) e no teste de Mantel..... | 79 |