
ECOLOGIA

ÉRIK HENRIQUE DE LACERDA CHOUERI

**ANÁLISES MOLECULARES COMO
FERRAMENTAS VOLTADAS AO ESTUDO DO
BOTO-CINZA (*Sotalia guianensis*) NA REGIÃO
DO LAGAMAR DE CANANÉIA**



Rio Claro
2012

ÉRIK HENRIQUE DE LACERDA CHOUERI

ANÁLISES MOLECULARES COMO FERRAMENTAS VOLTADAS AO
ESTUDO DO BOTO-CINZA (*Sotalia guianensis*) NA REGIÃO DO
LAGAMAR DE CANANÉIA

Orientador: Alexandra Sanches

Co-orientador: Marcos César de Oliveira Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Ecólogo.

Rio Claro
2012

599.5
C552a Choueri, Érik Henrique Lacerda
 Análises moleculares como ferramentas voltadas ao estudo do
 boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na região do Lagamar de Cananéia / Érik
 Henrique Lacerda Choueri. - Rio Claro : [s.n.], 2012
 27 f. : il., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Alexandra Sanches
Co-Orientador: Marcos César de Oliveira Santos

1. Cetáceo. 2. Ecologia molecular. 3. Delphinidae. 4. Variabilidade
genética. 5. Estruturação populacional. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família: minha querida vó Maria por todos os momentos de ternura e carinho concedidos desde quando nasci até os dias de hoje; minha mãe, grande dona Erô, a qual serviu (e serve!) como um perfeito exemplo de pessoa guerreira a qual carrega um coração imenso no peito; meu pai, jovem Dr. Miguel, pelo bom humor, puxões de orelha e bate-papos intermináveis os quais complementaram minha formação; meus irmãos caçulas, Pepo e Luna, por me fazerem rir falando bobagens, tomando cerveja e torcendo pelo Timão. Agradeço também ao restante da minha GIGANTE família!!!

Gostaria de agradecer à minha amiga e orientadora Alexandra Sanches por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência, bom humor, conselhos... enfim... foi uma experiência magnífica poder trabalhar com você!

Também quero agradecer ao meu co-orientador Marcos César de Oliveira Santos por conseguir levar golfinhos para o cerrado de Rio Claro! Muito obrigado por proporcionar minha aproximação com o mundo dos cetáceos!

Pessoal do LaBiC/LabEMiM pela troca de ideias e de conhecimentos acadêmicos... além, é claro, das festinhas e churrascos!

Gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz durante estes cinco anos de Rio Claro! Pessoal da MOB, Madrugas, Passargada, enfim... muitíssimo obrigado pelas festas, sambas, pokers e afins!

Agradeço também a meu grande amigo e companheiro Polenta, o qual, em diversos momentos difíceis, surgiu com um osso na boca ou com o rabo balançando, animando meu dia! De fato percebi que o cão é o melhor amigo do homem!

Por fim, gostaria de agradecer às pessoas com as quais compartilhei os melhores anos de minha vida: turma da Ecologia 2008! Considero-me privilegiado por ter vivido essa fase com pessoas tão especiais. Muito obrigado pelos momentos de estudos, discussão, festas, pedaladas, caminhadas, campos... obrigado por tudo!

Dentre essas pessoas especiais, algumas foram muito fundamentais para mim: Issa, Bambu, Say, Biz, Lama, Topera, Arrea, Pantoja e Léia, os momentos que passamos juntos foram fantásticos! Se pudesse, os viveria novamente! O que aprendi com vocês, nenhuma universidade seria capaz de ensinar: vocês me ensinaram a ser mais humano e maduro, tudo em grandes momentos de bom humor e a alegria! Obrigado por acreditarem em mim! AMO VOCÊS!

Resumo

Dentre os mamíferos marinhos presentes na costa brasileira, *Sotalia guianensis* (subordem *Odontoceti*, família *Delphinidae*) é um dos mais comumente encontrados, possuindo ampla distribuição pela América do Sul e Central. Pelo fato de apresentar hábito costeiro, esta espécie encontra-se diretamente relacionada com impactos de origem antrópica tais como poluição, pesca acidental ou degradação de habitats. Somado a estes fatores, a falta de informações relatada pela IUCN surge como outro ponto de preocupação, visto que não se sabe de fato qual o grau de conservação dessa espécie. Por este motivo o presente estudo pretende avaliar características populacionais existentes nos grupos de *S. guianensis* na região do Lagamar de Cananéia, litoral sul de São Paulo, utilizando-se de microsatélites. Para tanto, aspectos referentes à diversidade genética, grau de parentesco e fluxo gênico entre áreas estuarinas e de mar aberto foram considerados. A amostragem é composta por 22 tecidos oriundos de indivíduos de mar aberto e 11 estuarinos, coletados entre os anos de 1996 e 2009. O material foi amplificado por PCR utilizando-se de oito locos específicos para a espécie. O presente estudo concluiu que a diversidade genética (número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade esperada e observada) ocorrente no grupo de estudo é considerada como moderada quando comparada a outras populações de *S. guianensis* estudadas. Após a retirada dos locos com indício da presença de alelos nulos, a população mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, como revelado também pelo valor de F_{IS} . Corroborando com o nível de diversidade genética encontrado, foram avaliados baixos índices de parentesco, sem diferenças significativas entre os grupos em comparação (estuário e mar aberto), bem como entre os sexos, indicando a ausência de dispersão sexo assimétrica. A análise Bayesiana e o valor de F_{ST} não evidenciou qualquer sinal de estruturação populacional entre os animais do estuário e do mar aberto. No entanto a ocorrência de alelos exclusivos tanto no grupo de animais estuarinos quanto no de mar aberto infere que estes apresentam pools gênicos distintos. Desta forma, seria aconselhável manejá-los de forma independente.

Palavras-chave: Delphinidae, variabilidade genética, estruturação populacional.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	4
2. Justificativa e Objetivos.....	9
3. Resultados Esperados.....	10
4. Material e Métodos.....	11
4.1 Área de estudo.....	11
4.2 Coleta de tecido.....	12
4.3 Extração de DNA e amplificação.....	12
4.4 Análises estatísticas.....	14
5. Resultados e Discussão.....	17
5.1 Variabilidade genética.....	17
5.2 Estrutura populacional.....	19
6. Conclusões.....	22
7. Referências Bibliográficas.....	23

1. Introdução

Os cetáceos são mamíferos adaptados ao meio aquático, sendo que sua ocorrência abrange todos os oceanos, estando ainda presentes em áreas estuarinas ou bacias dulcícolas na América do Sul e Ásia (REEVES *et al.*, 2003).

Dentre os mamíferos marinhos da costa brasileira, o boto-cinza, *Sotalia guianensis* (subordem Odontoceti, família Delphinidae), é uma das espécies mais comumente encontradas (Figura 1). Sua distribuição geográfica estende-se desde a região norte de Santa Catarina (27° S), na América do Sul, avançando pela costa até chegar a Honduras (15° N) (BOROBIA *et al.*, 1991; DA SILVA & BEST, 1994; 1996; FLORES, 2002). Sua ocorrência é indicadora de qualidade de vida em ecossistemas costeiros pois tais animais atuam como peças chave na dinâmica populacional das comunidades em que estão inseridos (KATONA & WHITEHEAD, 1988; BOWEN, 1997).

Apesar disso, mesmo um século e meio após a descrição da espécie, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em seu plano de ação para pesquisa e preservação de cetáceos em águas brasileiras inseriu a espécie na categoria “dados deficientes” (IBAMA, 2001). As informações disponíveis também são limitadas em nível internacional, visto que a “International Union for Conservation of Nature” (IUCN) categorizou a mesma como insuficientemente conhecida (REEVES & LEATHERWOOD, 1994; REEVES *et al.*, 2003; IUCN, 2012).

Somada à falta de informações, a presença de atividades antrópicas em grande parte das áreas de vida acaba intensificando os possíveis riscos sobre a espécie. A pesca, tráfego de embarcações, construções portuárias, desaguamento de esgoto e derramamento de óleo proporcionam problemas relacionados à saúde e comportamento destes animais, além da degradação e perda de habitats (REEVES & LEATHERWOOD, 1994). Mesmo conhecendo-se os potenciais efeitos nocivos sobre a espécie, pouco se sabe sobre as reais consequências destes impactos. Como exemplo, estudo recente com *S. guianensis* no estuário de Paranaguá reportou casos de indivíduos que apresentavam doenças de pele, com a presença de nódulos na epiderme ocasionados por *Lacazia loboi*, uma espécie de fungo (BRESSEM *et al.*, 2009). Segundo os autores, tais enfermidades podem ser

resultantes da poluição, tendo em vista que indivíduos localizados em áreas mais limpas não apresentavam estas injúrias.

A população de *S. guianensis* residente no estuário de Cananéia vem sendo estudada desde a década de 1990. Aspectos comportamentais (SANTOS *et al.*, 2000), hábitos alimentares (SANTOS *et al.*, 2002), abundância (ACUÑA, 2002), determinação de idade (SANTOS *et al.*, 2003), acúmulo de contaminantes (YOGUI *et al.*, 2003), tamanho e composição de grupos (SANTOS & ROSSO, 2007; SANTOS *et al.*, 2010a), organização social (SANTOS & ROSSO, 2008), bioacústica (PIVARI & ROSSO, 2005) foram temas já amplamente analisados. Além disso, novos estudos foram produzidos nesta área como parte do projeto sob coordenação do Prof. Dr. Marcos C. O. Santos. Estes são referente à associação com aves (SANTOS *et al.*, 2010b), uso de área (SANTOS *et al.*, em prensa), e potencial interação de predação entre elasmobrânquios e pequenos cetáceos (SANTOS & GADIG, 2009).



Figura 1: Indivíduos de boto cinza, *Sotalia guianensis*, na Baía de Todos os Santos, Salvador, BA.

Trabalhos relacionados ao uso de ferramentas moleculares para a resolução de questões populacionais são recentes para a espécie. Cunha (2005) utilizou-se de marcadores mitocondriais para evidenciar a diferenciação entre *S. guianensis* e *Sotalia fluviatilis* (espécie situada na bacia amazônica). Ainda neste estudo, evidenciou-se a ocorrência de pelo menos três grandes populações de *S. guianensis* na costa brasileira, estando estas situadas no Norte, Nordeste e Sudeste/Sul do país (CUNHA, 2005). Ainda relacionada à distinção de *S. guianensis* e *S. fluviatilis*, Caballero e colaboradores (2007) utilizaram-se também de marcadores mitocondriais para distinguir tais espécies, porém inovaram com o uso de íntrons nucleares. Unidos a essa informação, dados referentes à morfometria complementaram o estudo (CABALLERO *et al.*, 2007).

Apesar da existência destes diversos trabalhos, ainda existe uma lacuna relacionada à diversidade e estrutura genética entre estoques populacionais encontrados em águas estuarinas, assim como sobre a relação com estoques de áreas vizinhas. Neste contexto, o trabalho de Hollatz *et al.* (2011) surge como pioneiro sobre a estruturação em fina escala de *S. guianensis* no litoral brasileiro com resultados significativos.

No estudo em questão foram comparados indivíduos machos da espécie nas regiões da baía de Sepetiba e Paraty, no Rio de Janeiro. Resultados voltados às análises mitocondriais não foram significativos, visto que a colonização por parte de *S. guianensis* na região Sudeste é consideravelmente recente (CUNHA *et al.*, 2005) e o material genético encontrado nas mitocôndrias é mais conservativo. Porém, ao se analisar o DNA nuclear, notou-se a ocorrência de estruturação entre as populações das duas regiões (HOLLATZ *et al.*, 2011). Os autores concluem que, pelo fato de ambos os estoques situarem-se em áreas relativamente fechadas, questões voltadas à heterogenia ocorrente entre os ambientes seriam as responsáveis por tal estruturação (HOLLATZ *et al.*, 2011).

Para fins de comparação e melhor entendimento, estudos realizados com outros pequenos cetáceos são constantemente utilizados como referência, como no caso do trabalho de Douglas e colaboradores (1984) com *Stenella attenuata*. Este obteve diferenças morfométricas significativas entre indivíduos estuarinos e de mar aberto, evidenciando a existência de estoques distintos destes animais entre os ambientes (DOUGLAS *et al.*, 1984). Posteriormente, um estudo utilizando-se de

ferramentas moleculares com a mesma espécie também chegou às mesmas conclusões (ESCORZA-TREVIÑO *et al.*, 2004).

Estruturações populacionais podem existir naturalmente como resultado de fatores biológicos e ambientais (MARTINS, 1987) ou podem ser causadas por interferências de origem antrópicas que interrompam ou limitem o fluxo gênico entre populações anteriormente panmíticas (FRANKHAM *et al.*, 2008). Estudos moleculares têm relatado estruturações populacionais em espécies de cetáceos de pequeno porte, demonstrando a coexistência de estoques geneticamente distintos numa mesma região (HOEZEL *et al.*, 1998; ROSEL *et al.*, 1999; PARSONS *et al.*, 2002; GASPARI *et al.*, 2007; KRÜTZEN & SHERWIN, 2004). Somado a isto, de acordo com Cunha e colaboradores (2005), existem evidências de que as populações de *S. guianensis* encontradas ao longo da costa brasileira representam diferentes unidades evolutivas, devendo ser consideradas de forma independente.

Aspectos comportamentais podem colaborar com tal estruturação, como resultado da filopatria exercida pelo sexo feminino e o fluxo gênico proporcionado pelos indivíduos do sexo masculino entre estoques adjacentes (PICHLER & BAKER, 2000), conforme já descrito para espécies de pequenos cetáceos (KRÜTZEN & SHERWIN, 2004; MÖLLER & BEHEREGARAY, 2004). Outro ponto que pode ser considerado para possíveis estruturações seriam as diferentes características ambientais existentes entre as áreas de vida, como temperatura, profundidade, entre outras (GASKIN, 1968; SILVA *et al.*, 2003).

Informações voltadas a questões populacionais nas mais amplas escalas atuam como uma alternativa no sentido de avaliar o real impacto de atividades antrópicas sobre estes animais. Ao se estabelecer a diferenciação de populações, assume-se que estas possuem *pools* gênicos (conjuntos de genes) distintos, devendo, portanto, serem manejadas de formas diferentes para a manutenção destas importantes informações biológicas.

A diversidade genética, de acordo com Frankham e colaboradores (2008), “é o material bruto sobre o qual a seleção natural atua para permitir a adaptação e evolução dos organismos e a sua adequação às mudanças ambientais”. Ela constitui-se pela variedade de alelos e genótipos encontrados em determinado grupo de uma mesma espécie (FRANKHAM *et al.*, 2008). A importância da diversidade genética é relevante a tal ponto que a IUCN a considera como uma das três prioridades globais para a conservação (IUCN, 2012), tudo isso graças a dois

aspectos principais: o primeiro considera que, pelo fato das mudanças ambientais serem processos contínuos e incessantes, a diversidade genética surge como resposta para as populações se adaptarem e evoluírem diante destas. O segundo ponto refere-se à sobrevivência e reprodução da população, sendo que a diminuição da diversidade genética estaria associada ao aumento da endogamia e, conseqüentemente, com a perda do valor adaptativo. No caso de populações selvagens, um planejamento adequado das atividades antrópicas pode ser dirigido à manutenção do fluxo gênico e, por conseguinte, da diversidade genética (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Desta forma, é imprescindível o conhecimento tanto dos níveis de diversidade genética bem como a possível existência natural de estoques geneticamente diferentes de *S. guianensis*, visto que as incertezas dificultam acessar potenciais impactos sobre as populações e planejar medidas efetivas de conservação. Adicionalmente, a estrutura genética em uma escala mais fina deve ser conhecida para casos de planos de manejo mais locais.

2. Justificativa e objetivos

A *IUCN Red List* é considerada uma das principais ferramentas voltadas para a avaliação de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2012), sendo que seus dados atuam direcionando esforços para a conservação (RODRIGUES *et al.*, 2006). Levando-se em consideração o fato de *S. guianensis* enquadrar-se na categoria “*Data deficient*”, a espécie não pôde ser avaliada por falta de informações (IUCN, 2012), desta forma, não se sabe qual o real grau de conservação da espécie. Neste contexto torna-se de grande importância o levantamento de informações voltadas à ecologia e biologia de *S. guianensis*, partindo desde o âmbito individual até o populacional.

Outro ponto relaciona-se ao fato da área de estudo estar inserida na Área de Proteção Ambiental Marinha Litoral Sul (Decreto Estadual Nº 53.527 de 08 de Outubro de 2008), onde a presença humana pode e deve ocorrer desde que inserida em adequados planos de manejo e conservação dos recursos naturais (Lei Federal Nº 9.985, de 18 de julho de 2000). Para tanto, o enriquecimento de informações referentes à biota regional é de extrema importância, visando auxiliar a tomada de decisões coerentes.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo analisar a estrutura genética, em uma fina escala, das agregações de *S. guianensis* da região do Lagamar, considerando aspectos referentes à diversidade genética e fluxo gênico, avaliando desta forma a ocorrência de estruturações populacionais entre o estoque interno ao estuário com as áreas de mar aberto adjacentes.

3. Resultados esperados

Estudo promovido com *Pontoporia blainvillei*, uma espécie de pequeno cetáceo, comprovou a ocorrência de estruturação populacional entre indivíduos estuarinos e de mar aberto (COSTA-URRUTIA *et al.*, 2011). Somado a isto, Hollatz *et al.* (2011) também chegou a resultados significativos quando comparou populações de *S. guianensis* entre as baías de Sepetiba e Paraty (RJ). Desta forma, espera-se encontrar uma diferenciação genética significativa entre indivíduos estuarinos e animais de mar aberto no presente trabalho.

4. Material e métodos

4.1. Área de estudo:

A área de trabalho foi o estuário do Lagamar. Este é situado nas proximidades do município de Iguape (24°45'S), Estado de São Paulo, alcançando o Pontal Sul (25°30'S), no Estado do Paraná (Figura 2). A área é composta por dois principais corpos d'água totalizando 4.422 quilômetros quadrados, apresentando cerca de 180 km de extensão de canais interioranos, ladeados por uma rica área de manguezais e marismas, representando relevantes áreas de proteção, alimentação, reprodução e descanso de diversas espécies de crustáceos, moluscos, peixes e cetáceos (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990). Devido a essa importância, a área em questão foi inserida na Área de Proteção Ambiental Marinha Litoral Sul (Decreto Estadual N° 53.527 de 08 de Outubro de 2008).

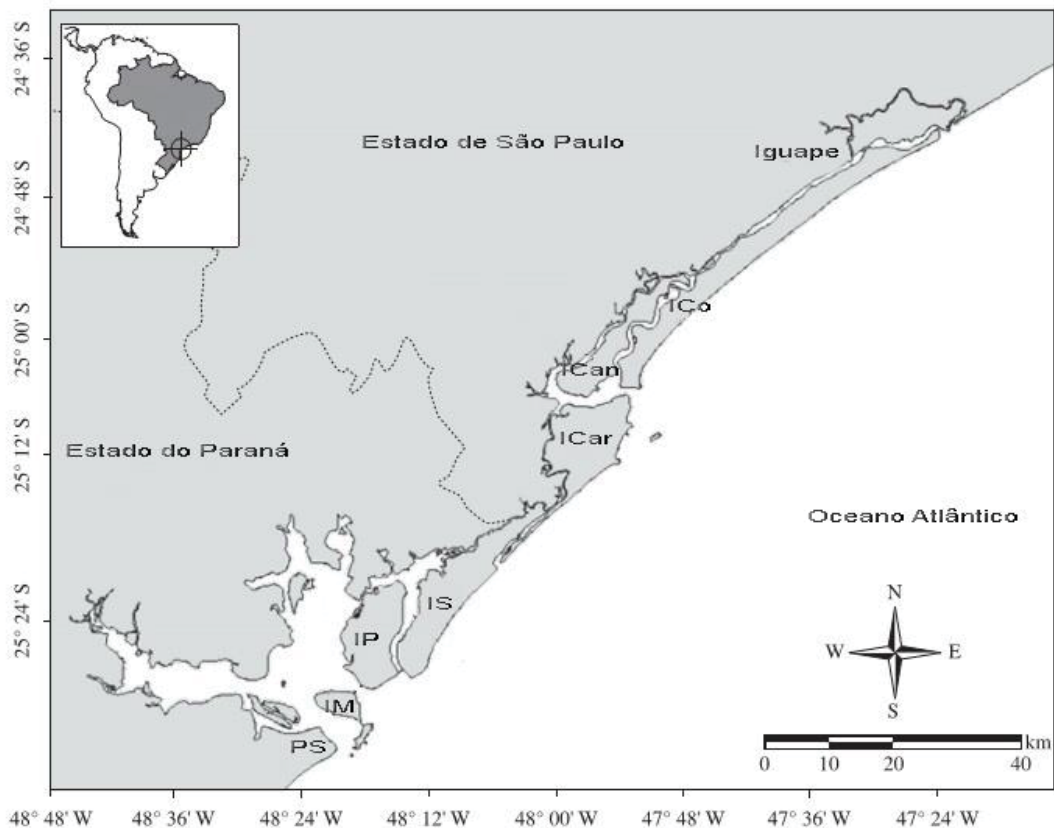


Figura 2: Estuário do Lagamar iniciando-se em Iguape (24°45'S), Estado de São Paulo, até o Pontal Sul (25°30'S), Estado do Paraná. No sentido Norte/Sul, temos: Ilha Comprida (ICo), Ilha de Cananéia (ICan), Ilha do Cardoso (ICar), Ilha do Superagui (IS), Ilha das Peças (IP), Ilha do Mel (IM) e Pontal Sul (PS). Adaptado de Santos *et al.*, 2010.

Pelo fato dessa área ser mais abrigada e possuir grande abundância de recursos, agregações de *S. guianensis* são avistadas durante todo o ano exercendo principalmente atividades relacionadas à alimentação e deslocamento, sendo frequente a presença de infantes (SANTOS & ROSSO, 2007).

4.2. Coleta de tecido:

Os materiais biológicos compostos por músculos e peles utilizados para o presente estudo são oriundos do Projeto Atlantis (coordenação do Prof. Dr. Marcos C. O. Santos) e são constituídos por 22 amostras de animais de mar aberto e 11 estuarinos, coletadas entre os anos de 1996 a 2009. Dentre os botos amostrados em mar aberto, 12 indivíduos são do sexo masculino enquanto que sete são fêmeas. Ainda nesta área, quatro indivíduos não possuem sexo definido. Em relação ao estuário, as amostras são compostas por oito animais machos e uma fêmea.

Quando biópsia, a coleta foi feita com o equipamento da empresa “Paxarms” próprio para tal finalidade. No caso de necropsias, os animais em questão foram encontrados encalhados nas praias da região ou capturados acidentalmente por redes de pesca. As amostras foram georreferenciadas no momento da coleta e posteriormente armazenadas em etanol a 4°C.

Foram considerados como animais estuarinos os indivíduos coletados na parte interna do estuário ou encalhados nas praias voltadas para este. No caso de indivíduos de mar aberto, foram encontrados encalhados ou nas adjacências de praias voltadas para a costa. Em relação a capturas acidentais, os dados coletados foram oriundos apenas das áreas externas do estuário.

4.3. Extração de DNA e amplificação:

Para a obtenção do DNA, foi utilizado o método de extração com tampão salino (ALJANABI & MARTINEZ, 1997). Este foi selecionado por questões voltadas a praticidade, visto que durante o processo de extração os reagentes utilizados seriam NaCl, Tris-HCl, EDTA, SDS, proteinase, isopropanol, etanol e água (mais

detalhes em Aljanabi & Martinez, 1997), ao contrário de outras metodologias em que se utilizam fenol e clorofórmio, por exemplo (SAMBROOK *et al.*, 1989).

O DNA foi submetido à amplificação utilizando-se de locos microssatélites específicos para *S. guianensis* (Tabela 1; CUNHA & WATTS, 2007). Estes são constituídos por curtas sequências de 1 a 6 pares de base (pb) repetidas em tandem (TAUTZ & RENZ, 1984), utilizando-se do processo de Polymerase Chain Reaction (PCR) para sua amplificação. Tais marcadores têm como característica grande distribuição através do genoma, multialelismo, alto grau de polimorfismo e herança Mendeliana. Além do mais, por se tratar de um marcador co-dominante, ele permite a identificação de heterozigose. Frente a tais vantajosas características, esses marcadores têm se mostrado como uma poderosa ferramenta em estudos populacionais, de comportamento e de manejo e conservação de espécies de mamíferos (PICHLER & BAKER, 2000; CUNHA *et al.*, 2005; PARSONS *et al.* 2002; GASPARI *et al.* 2007).

Tabela 1: Marcadores microssatélites que foram utilizados na análise genética de *S. guianensis* (Cunha & Watts, 2007).

Loco	Primer (5'-3')	Unidade repetitiva
Sgui-002	F: GGATGTCACTGAACACAGAGC R: ACCTATCTACATTTCCCAGAGG	(CA) ₁₈
Sgui-003	F: TCCAATCTCCAACCAAATCCC R: GTCGCTAAGTTCATCATCTGC	(GT) ₂₈
Sgui-007	F: CCATTTAGAGGTTGGGGTGC R: GGGATTCCATAGTGACAAGC	(GT) ₂₂
Sgui-010	F: ATTAGCCACAGACAAGATCG R: CATGGGATTTCTGGAAGCC	(CA) ₃₁
Sgui-011	F: ACAGAGAAGCAAGTGGGAAACC R: TTCCCCGCCACTAAGATTCC	(GT) ₂₆
Sgui-016	F: TTCTCTGGGCAAACACTGC R: CATTATTGCCGAAGTATGATGC	(GT) ₂₈
Sgui-017	F: GTGGTGGAGTAGAGGATAGG R: ACATTGGGCTTCAACGCACG	(CA) ₂₂
Sgui-018	F: CTGGAAAAAGAGTAGTTGGC R: GTGCAAGACCTCAAATCC	(GT) ₂₉

Para as PCRs foi adotado o método de Schuelke (2000) para a incorporação de sinal fluorescente. Cada reação foi conduzida em volume final de 15 µl contendo tampão de amplificação 1x, 0,6mM de MgCl₂, 2mM do primer forward, 8mM do

primer reverse, 8 mM do primer contendo o sinal fluorescente, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 50 ng de DNA. O programa da PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C. Para que seja feito o anelamento final, tem-se 12 ciclos de 30 segundos a 94°C e 45 segundos a 53°C.

Por fim, as genotipagens foram efetuadas em sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) utilizando-se primers com marcas fluorescentes. Posteriormente os resultados foram analisados através do programa GeneMarker (Softgenetics).

4.4. Análises estatísticas:

Primeiramente foi avaliada a ocorrência de alelos nulos pelo programa MicroChecker (OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Tal medida foi tomada pois estes poderiam promover uma leitura errônea de variabilidade genética, possíveis estruturações populacionais, entre outras.

Para se determinar a variabilidade genética da população, valores referentes ao número de alelos e riqueza alélica foram considerados. Além do mais o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado avaliando-se os valores de heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) para cada loco. Desvios ocorrentes entre o valor de H_O e H_E indicam variações no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando os valores de H_E médio são menores que os da média de heterozigosidade observada, por exemplo, a população apresenta elevada presença de heterozigotos, evidenciando tal desequilíbrio.

Também foi calculado o valor referente ao parâmetro F_{IS} , índice que indica o grau de endogamia existente em uma população. Este é considerado de grande importância uma vez que o endocruzamento reduz a heterozigosidade (FRANKHAM *et al.*, 2008). Para a avaliação dos parâmetros citados anteriormente, foram utilizados os softwares GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET, 1995) e FSTAT (GOUDET, 1995).

Para que se detectasse a ocorrência de alelos nulos, os quais poderiam promover uma leitura errônea de possíveis estruturações populacionais, foi utilizado

o programa MicroChecker (OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Este, por sua vez, produz genótipos aleatórios com os dados inseridos e posteriormente compara a distribuição destes com os genótipos reais através da distribuição binomial cumulativa, comparando-os com desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

Também foi averiguada a possível ocorrência de alelos exclusivos, ou seja, alelos existentes apenas em um dos grupos em questão. A existência destes foi avaliada através dos resultados obtidos pelo programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

Através do programa GenAlex (PEAKALL & SMOUSE, 2006) foram estabelecidos graus de parentesco entre indivíduos, comparando-se separadamente indivíduos do estuário, de mar aberto, fêmeas e machos. Também foi avaliado separadamente o grupo de machos do estuário, grupo de machos de mar aberto e grupo de fêmeas de mar aberto. O grupo de fêmeas do estuário não foi considerado pois a amostragem consta com apenas um indivíduo.

Tais análises foram efetuadas pois, de acordo com Handley & Perrin (2007), a dispersão sexo-assimétrica ocorre em diversas espécies de mamíferos. Além do mais, tal padrão já foi avaliado para *Tursiops* sp., outra espécie de pequeno cetáceo (KRÜTZER & SHERWIN, 2004). A ocorrência desta para *S. guianensis* traria informações voltadas à ecologia comportamental destes animais. Para tanto, foi avaliado tal índice levando em consideração a estimativa de Lynch & Ritland (1999).

No sentido de analisar a estrutura genética da população, ou seja, verificar a existência de diferenciações genéticas entre populações ou estoques, foi utilizada uma estimativa de diferenciação genética, o F_{ST} (WEIR & COCKERHAM, 1984), calculado por meio do *software* FSTAT (GOUDET, 1995). Este índice refere-se ao grau de estruturação populacional de tal forma que, caso $F_{ST}=0$, infere-se que as frequências alélicas entre dois grupos são idênticas. Em contrapartida, caso $F_{ST}=1$, conclui-se que as populações fixaram alelos diferentes, sendo consideradas como distintas (MCMANUS, *et al.*, 2011).

Para os valores de significância dos testes múltiplos em questão, considerou-se a correção de Benjamini & Yekutieli (2001). Posteriormente a análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000) complementou os resultados obtidos.

Para esta análise, todos os genótipos foram inseridos na planilha de entrada sem que fosse informado o grupo de origem da amostra, se do estuário ou do mar aberto. Nos modelos testados, admitiu-se mistura e frequências alélicas correlacionadas. Foram testados os modelos de K de uma a seis populações, sendo que para cada modelo (K=1 a K=6) foram realizadas cinco iterações ou corridas (período de *Burnin* de 500.000; extensão da Cadeia de Markov de 1.000.000). Para a definição do modelo que melhor explicou o conjunto de dados fornecidos à análise, foi utilizado o método de Jakobsson e Rosenberg (2007) e o de Evanno *et al.*, 2005, utilizando o Structure Harvester (EARL *et al.*, 2011), programa que fornece uma maneira rápida de avaliar e visualizar os valores de probabilidade através dos valores de K e das várias iterações para facilitar a detecção do número de clusters genéticos que melhor se ajustam aos dados.

5. Resultados e Discussão

5.1. Variabilidade genética

O número de alelos encontrados variou de 2 a 8, obtendo uma média de 4,37 alelos por loco. Os valores referentes à riqueza alélica, a qual é corrigida para amostras de diferentes tamanhos, variaram de 2,00 a 7,64 com uma média de 4,20. A média de H_O foi 0,325 enquanto ao valor da H_E média foi 0,426 (Tabela 2).

Tabela 2: Valores referentes a número de alelos (N_A), riqueza alélica (R_A), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), Valor P referente ao teste de Hardy-Weinberg (P_{HW}), coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) e valor p referente à F_{IS} maior que zero.

Loco	N_A	R_A	H_O	H_E	P_{HW}	F_{IS}	Valor-p ($F_{IS}>0$)
Sgui02	3	2,781	0,219	0,473	0,0013*	0,537	0,0125*
Sgui03	2	2,000	0,100	0,156	0,1626	0,360	0,1563
Sgui07	4	3,711	0,129	0,212	0,0165*	0,392	0,0250
Sgui10	2	2,000	0,419	0,490	0,4733	0,145	0,3125
Sgui11	5	5,000	0,520	0,474	0,0855	-0,097	0,8188
Sgui16	4	3,737	0,032	0,157	0,0002*	0,795	0,0063*
Sgui17	7	6,804	0,600	0,706	0,0039*	0,150	0,1063
Sgui18	8	7,638	0,581	0,737	0,0230	0,186	0,0438
Média	4,37	4,2	0,325	0,426	0,0958	0,308	0,1852

* valores significativos (< 0.0184) considerando a correção de Benjamini & Yekutieli (2001)

Quando comparados os valores obtidos para a população de *S. guianensis* das costas do Rio de Janeiro e Pará, dados referentes ao número de alelos foram semelhantes nos locos Sgui02 e Sgui17 e inferiores, no presente estudo, para os locos Sgui03, Sgui10, Sgui11 e Sgui18 (Cunha & Watts, 2007). Os locos Sgui07 e Sgui16 evidenciaram um número de alelos superior. Ao se considerar o valor médio do número de alelos amostrados, o presente estudo apresentou valores próximos (Tabela 3).

Em relação aos resultados de H_E , estes foram consideravelmente distintos em apenas dois locos (Sgui03 e Sgui11). Os valores refletidos pelos outros locos foram próximos, assim como a média final da diversidade genética apresentada pelas populações costeiras do Rio de Janeiro e Pará (CUNHA & WATTS, 2007) (Tabela 3).

Quando comparados os valores de H_E com os obtidos em estudo de estruturação em fina escala de *S. guianensis* efetuado na baía de Sepetiba e Paraty

(Rio de Janeiro), os valores médios foram semelhantes (HOLLATZ, *et al.*, 2011) (Tabela 3). De acordo com os autores, através dos valores obtidos é possível inferir a ocorrência de níveis de variabilidade genética moderada. A similaridade entre os resultados de Hollatz *et al.* (2011) com o presente estudo já era esperada, visto que, de acordo com Cunha e colaboradores (2005), as populações de *S. guianensis* das regiões Sul e Sudeste são geneticamente próximas, sendo que suas características genéticas seriam semelhantes.

Tabela 3: Valores de números de alelos e heterozigosidade esperada obtidos para três diferentes populações de *S. guianensis*.

Locos	Lagamar		B.Sepetiba E ¹		B. Sepetiba I ¹		Paraty ¹		RJ e PA ²	
	Na	HE	nA	HE	nA	HE	nA	HE	nA	HE
Sgui02	3	0,473	-	-	-	-	-	-	3	0,444
Sgui03	2	0,156	2	0,05	2	0,043	1	NA	6	0,508
Sgui07	4	0,212	-	-	-	-	-	-	2	0,115
Sgui10	2	0,490	-	-	-	-	-	-	4	0,471
Sgui11	5	0,474	6	0,531	5	0,453	5	0,514	14	0,795
Sgui16	4	0,157	-	-	-	-	-	-	2	0,093
Sgui17	7	0,706	5	0,599	4	0,564	4	0,748	6	0,818
Sgui18	8	0,737	5	0,517	7	0,712	7	0,694	10	0,782
Média	5,5	0,518	4,5	0,424	4,5	0,443	4,25	0,652	5,875	0,503

¹ Hollatz *et al.*, 2011; ² Cunha & Watts, 2007;
 - Locos não utilizados por Hollatz *et al.*, 2011.

Quanto à análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg, estes foram significativamente diferentes para os locos Sgui02, Sgui07, Sgui16 e Sgui17 (Tabela 2). A análise da presença dos alelos nulos informou que todos os locos citados anteriormente, exceto Sgui17, apresentaram este tipo de erro, resultando na subestimação da heterozigose e conseqüentemente no desequilíbrio de HW. Desta forma, excluindo-se os locos com alelos nulos, a população em questão encontra-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Sob esta mesma perspectiva, o valor médio de F_{IS} obtido corrobora com o exposto anteriormente, em que ao serem retirados os locos com alelos nulos, os animais analisados não apresentam níveis de endocruzamento relevantes, visto que o valor não é significativamente maior que zero.

A média de relação de parentesco obtido para todos os animais (-0,021) indica um valor de parentesco reduzido. A média do grau de parentesco referente somente aos animais estuarinos obtidos pelo índice de Lynch & Ritland (1999) foi -0,068, enquanto que para os de mar aberto foi -0,032. Ambos os grupos apresentam alta diversidade genética, indo de acordo com Frankham *et al.* (2008). Isto ocorre pois quanto menor o parentesco de indivíduos de uma população, maior será seu grau de variabilidade genética (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Os valores de parentesco médios obtidos para comparações entre machos e entre fêmeas não foram significativamente diferentes (-0,032 e -0,073, respectivamente), indicando que não existe evidência de dispersão sexo-diferencial, com filopatria de fêmeas e dispersão de machos, como reportado para outros cetáceos (CONNOR, 2012).

Em relação ao baixo índice de parentesco entre fêmeas, este segue os padrões observados também para *T. aduncus* (MÖLLER *et al.*, 2006). Pelo fato dos grupos de fêmeas serem compostos por indivíduos não obrigatoriamente aparentados, o valor obtido foi relativamente superior ao do sexo masculino. Apesar disso, para que resultados mais consistentes sejam elaborados em relação à composição dos grupos, incluindo análises de grau de parentesco, seria ideal unir dados referentes à análise molecular com informações obtidas através de estudos com foto identificação, como os observados em Möller *et al.* (2001), Möller *et al.* (2006) e Parsons *et al.* (2003).

5.2. Estrutura populacional

Trabalhos recentes evidenciaram a ocorrência de estruturações populacionais em fina escala com pequenos cetáceos (COSTA-URRUTIA *et al.*, 2011), inclusive com *S. guianensis* (HOLLATZ *et al.*, 2011) entre áreas estuarinas e de mar aberto. Tais estudos consideram a heterogenia ambiental ocorrente entre regiões vizinhas como responsável por esse fenômeno. Além do mais, de acordo com Flores & Bazzalo (2004), tais animais apresentam áreas de vida consideravelmente restritas, desta forma seria possível a ausência de fluxo gênico entre grupos relativamente próximos. Em frente a estas evidências, no presente trabalho análises foram

voltadas para averiguar detalhes referentes ao fluxo gênico entre indivíduos das duas áreas.

Ao contrário do esperado, a análise Bayesiana indicou que tanto os animais estuarinos quanto os indivíduos de mar aberto pertencem a uma população genética (Figura 3). Complementando, o valor de F_{ST} obtido entre os dois grupos amostrais não foi significativamente diferente de zero ($F_{ST}=0,0521$; valor $p=0,2$), corroborando os resultados encontrados pela análise anterior. Conclui-se, portanto, a existência de fluxo gênico entre indivíduos de *S. guianensis* residentes no estuário do Lagamar com animais das áreas de mar aberto adjacentes.

Tal fator pode ser explicado pela grande mobilidade apresentada por *S. guianensis* tanto para indivíduos machos como fêmeas (DAURA-JORGE, 2003), o qual não ficaria restrito apenas às áreas estuarinas ou de mar aberto. Outro padrão relevante, o qual também acarretaria na não diferenciação, foi observado na região estuarina do rio Caravelas, BA, onde determinados indivíduos de *S. guianensis* apresentavam fidelidade ao estuário, porém a área em questão era compartilhada com animais de mar aberto (ROSSI-SANTOS *et al.*, 2007). Neste caso o fluxo gênico poderia ocorrer entre os grupos adjacentes da mesma forma.

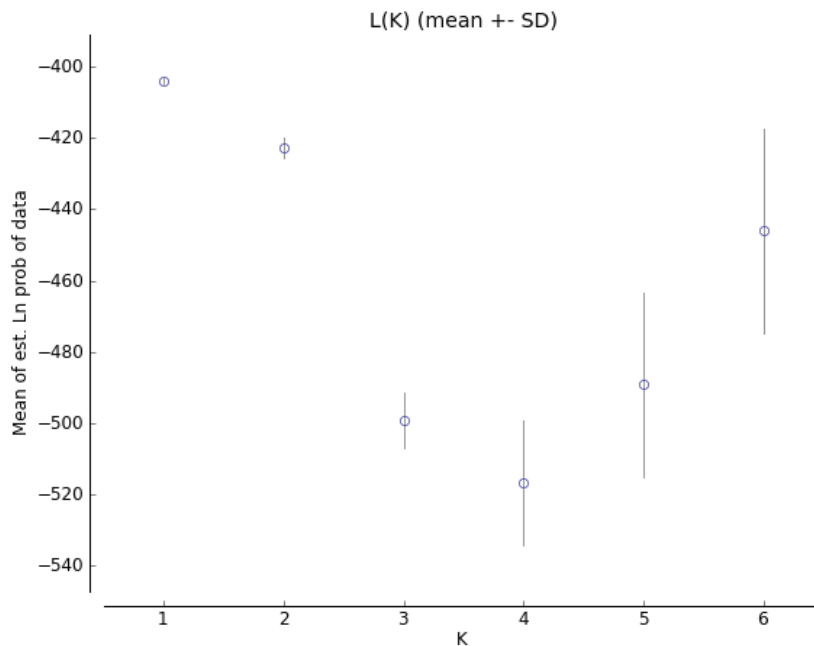


Figura 3: Gráfico gerado pela análise do Structure Harvester (EARL & VONHOLDT 2012), mostrando que o modelo mais provável é o de K=1 população.

A ocorrência de alelos exclusivos foi evidenciada em ambas as áreas (Tabela 4), sendo que um destes apresentou-se com uma frequência elevada em mar aberto. Além do mais, dos 35 alelos amostrados, 14 (40%) enquadram-se como privados a um dos grupos populacionais.

De acordo com Botrel *et al.* (2006) a ocorrência destes alelos pode ser um indicativo de diferenciação entre populações. Apesar do presente estudo não apresentar tal padrão, tais alelos evidenciam que cada grupamento possui pools gênicos diferenciados, mesmo podendo haver fluxo gênico entre estes. Desta forma, seria de grande importância manejar estes grupos de formas distintas, considerando que as características genéticas singulares ocorrentes entre eles são valiosas para sua manutenção (RUSCHEL *et al.*,2008).

Tabela 4: Ocorrência de alelos exclusivos em indivíduos de mar aberto e estuário.

Localidades	Loco	Alelo (pb)	Frequência
Estuário	Sgui02	225	0,056
	Sgui18	262	0,056
Mar Aberto	Sgui07	241	0,024
		247	0,048
	Sgui11	418	0,032
		420	0,032
	Sgui16	170	0,024
		180	0,048
	Sgui17	154	0,048
		178	0,024
		180	0,071
	Sgui18	228	0,048
		252	0,024
		264	0,143

6. Conclusões

O grupo de estudo de *Sotalia guianensis* analisado no presente trabalho apresenta níveis consideráveis de diversidade genética quando comparados com outros estudos (CUNHA & WATTS, 2007; HOLLATZ *et al.*, 2011). Além do mais a análise referente à relação entre heterozigosidade esperada e observada, somada com os valores do coeficiente de endocruzamento e a análise da presença alelos nulos, inferem que esta se encontra no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados obtidos com o índice de parentesco de Lynch & Ritland (2009) corroboraram com tal informação, visto os baixos valores de parentesco obtidos. Além do mais, pelo fato de não ocorrerem diferenças significativas entre as relações de parentesco de animais do estuário e do mar aberto, nem entre fêmeas e machos, indica-se a inexistência de uma dispersão sexo-assimétrica entre os grupamentos analisados.

Em relação à possível estruturação populacional, não foi detectada diferenciação genética entre os animais do estuário e mar aberto, de acordo com os valores obtidos do índice F_{ST} , assim como com a análise bayesiana. Apesar disso, a ocorrência de alelos exclusivos nos grupamentos estuarinos e de mar aberto evidenciou a existência de *pools* gênicos distintos. Tal informação não pode ser ignorada sob a perspectiva conservacionista, sugerindo-se que estes grupos sejam manejados de formas distintas (Ruschel *et al.*, 2008).

7. Referências Bibliográficas:

- ACUÑA, L. B. 2002. Estimativa do tamanho da população do boto-tucuxi marinho, *Sotalia fluviatilis* (Cetacea, Delphinidae) na região do estuário de Cananéia, São Paulo, por meio de catálogo de foto-identificação para a espécie. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 73pp.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid SALT-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22): 4694-693.
- BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. 2001 The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals Of Statistics*, v. 29, n. 4, p.1165-1188.
- BOROBIA, M., *et al.* 1991. Distribution of the South American dolphin *Sotalia fluviatilis*. *Canadian Journal of Zoology*, 69:1025-1039.
- BOTREL, M. C. G. *et al.* 2006. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 30, n. 5, p.821-827.
- BOWEN, W D. 1997. Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Marine Ecology: Progress Series*, p.267-274.
- BRESSEM, M. F.; SANTOS, M. C. O.; OSHIMA, J. E. F. 2009. Skin diseases in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Paranaguá estuary, Brazil: A possible indicator of a compromised marine environment. *Marine Environmental Research*, p. 63-68.
- CABALLERO, S. *et al.* 2007. Taxonomic status of the genus *Sotalia*: species level ranking for “Tucuxi” (*Sotalia fluviatilis*) and “Costero” (*Sotalia guianensis*) dolphins. *Marine Mammal Science*, v. 23, n. 2, p.358-386.
- CONNOR, Richard C. Dolphin social intelligence: Complex alliance relationships in bottlenose dolphins and a consideration of selective environments for extreme brain size evolution in mammals. *The Royal Society B: Philosophical Transactions*, p.587-602, 2012.
- COSTA-URRUTIA, P. *et al.* 2008. Population Genetic Structure and Social Kin Associations of Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Journal of Heredity*, p. 1-11.
- CUNHA, H. A. *et al.* 2005. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology* 148:449-457.
- CUNHA, H. A.; WATTS, P. C. 2007. Twelve microsatellite loci for marine and riverine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*). *Molecular Ecology Notes*.
- DA SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. 1994. Tucuxi *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853). Pp. 43 – 49. In: *Handbook of Marine Mammals: The First Book of Dolphins*. (S. H. Ridgway and R. Harrison, eds.). Academic Press, London.
- DA SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. 1996. *Sotalia fluviatilis*. *Mamm. Species* 527: 1-7.
- DAURA-JORGE, Fábio G. 2003. Variação sazonal e diária dos estados comportamentais, padrões de movimentação e tamanho de grupo do boto-cinza *Sotalia guianensis* (Cetacea: Delphinidae) na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. 2003. 63 f. Monografia (Bacharel) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- DOUGLAS, M. E.; SCHNELL, G. D.; HOUGH, D. J. 1984. Differentiation between inshore and offshore spotted dolphins in the eastern tropical Pacific Ocean. *Journal Of Mammalogy*, p. 375-387.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- ESCORZA-TREVIÑO, S. *et al.* 2005. Genetic differentiation and intraspecific structure of Eastern Tropical Pacific spotted dolphins, *Stenella attenuata*, revealed by DNA analyses. *Conservation Genetics*, v. 6, n. 4, p.587-600.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of Individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14:2611-2620.
- FLORES, P. A. C. 2002. Tucuxi *Sotalia fluviatilis*. Pp. 1267 – 1269. In: Encyclopedia of Marine Mammals. (W. F. Perrin, B. Würsig and J. G. M Thewissen, eds.). Academic Press, San Diego, CA.
- FLORES, P. A. C.; BAZZALO, M. 2004. Home ranges and movement patterns of the marine tucuxi dolphin, *Sotalia fluviatilis*, in Baía Norte, Southern Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, p. 37-52. jun/jul.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 280 p.
- GASKIN, D. E. 1968 Distribution of Delphinidae (Cetacea) in relation to sea surface temperatures off eastern and southern New Zealand. *New Zealand Journal Of Marine And Freshwater Research*, v. 03, n. 02, p.527-534.
- GASPARI, S. *et al.* 2007. Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 16:2922-2933.
- GEISE, L.; GOMES, N.; CERQUEIRA, R. 1999. Behaviour, habitat use and population size of *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Cetacea, Delphinidae) in the Cananéia estuary region, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos, v. 59, n. 2, p.183-194.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- HOEZEL, A. R.; POTTER, C. W.; BEST, P. B. 1998. Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265:1177-1183.
- HOLLATZ, C.; FLACH, L.; BAKER, C. S. 2011. Microsatellite data reveal fine genetic structure in male Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) in two geographically close embayments at south-eastern coast of Brazil. *Marine Biology*, p.927-933.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. 2001 Mamíferos Aquáticos do Brasil. Plano de Ação. Ed. MMA/IBAMA, Brasília, Brasil.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. 2010. IUCN Red List. Disponível em: <www.iucn.org>. Acesso em: 12 mar. 2010.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.

- KATONA, S.; WHITEHEAD, H. 1988. Are Cetacea ecologically important? *Oceanography and Marine Biology: an annual review* 26: 553-568.
- KRÜTZEN, M.; SHERWIN, W. B. 2004. Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analyses: Bottlenose dolphins (*Tursiops sp.*) in Shark Bay, western Australia. *Marine Mammal Science*, Sydney, p.28-47.
- LAWSON, L. J.; PERRIN, N., 2007. Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology*, n. 16, p.1559-1578.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. 1999. Estimation of pairwisereLATEDNESS with molecular markers. *Genetics*, v.152, p.1753-1766.
- MARTINS, P. S. 1987. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “*in situ*”. Ipef, Piracicaba, p.71-78.
- MCMANUS, C. *et al.* 2011. Estatística para descrever genética de populações. Disponível em: http://animal.unb.br/imagens/Serie_tecnica_genetica_populacoes.pdf Acesso em: 07 jun. 2012.
- MÖLLER, L. M.; BEHEREGARAY, L. B. 2004. Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Molecular Ecology*, p.1607-1612.
- MÖLLER, L. M. *et al.* 2001. Alliance membership and kinship in wild male bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Proc. R. Soc. B*, Londres, v. 268, n. 1479, p.1941-1947, 22 set.
- MÖLLER, L. M. *et al.* 2006. Association patterns and kinship in female Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 61, n. 1, p.109-117.
- NETO, C. G. B. 2010. Aspectos da filopatria das baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) na costa do Brasil. 59 f. Monografia (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- OOSTERHOUT, C. V. *et al.* 2004. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology: Notes*, v. 4, n. 3, p.535-538, set. 2004.
- PARSONS, K. M. *et al.* 2002. Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? *Biological Conservation* 108:175-182.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. 2006. Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology: Notes*, v. 6, n. 1, p.288-295, mar. 2006.
- PICHLER F. B.; BAKER, C. S. 2000. Loss of genetic diversity in the endemic Hector’s dolphin due to fisheries-related mortality. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267:97-102.
- PIVARI, D.; ROSSO, S. 2005. Whistles of small groups of *Sotalia fluviatilis* during foraging behavior in southeastern Brazil. *Journal of the Acoustical Society of America*, n. 118, p. 2725 – 2731.

- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotypic data. *Genetics* 155:945-959.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- REEVES, R. R.; LEATHERWOOD, S. (EDS.) 1994. Dolphins, Porpoises and Whales: 1994-1998 Action Plan for the Conservation of Cetaceans. The World Conservation Union, IUCN, Gland, Switzerland.
- REEVES, R. R. *et al.* 2003. Dolphins, Whales and Porpoises: 2002 – 2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans. The World Conservation Union, IUCN, Gland, Switzerland.
- RODRIGUES, A. S. L. *et al.* 2006. The value of the IUCN Red List for conservation. *Trends In Ecology & Evolution*, v. 21, n. 2, p.71-76.
- ROSEL, P. E. *et al.* 1999. Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology* 8: S41-S54.
- ROSSI-SANTOS, M. R.; WEDEKIN, L. L.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. 2007. Residence and site fidelity of *Sotalia guianensis* in the Caravelas River Estuary, eastern Brazil. *Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom*, United Kingdom, p.207-212.
- RUSCHEL, A. R.; PEDRO, J.; NODARI, R. O. Diversidade genética em populações antropizadas do fumo brabo (*Solanum mauritianum*) em Santa Catarina, Brasil. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v. 36, n. 77, p.63-72, mar. 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- SANTOS, M. C. O. *et al.* 2010a. Group size and composition of Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) (Van Bénèden, 1864) in the Paranaguá Estuarine Complex, Brazil. *Brazilian Journal Of Biology*, São Carlos, p. 631-637. fev. 2010.
- SANTOS, M. C. O *et al.* 2010b. Feeding associations between Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, and seabirds in the Lagamar estuary, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 70(1).
- SANTOS, M. C. O.; GADIG, O. B. F. 2009. Evidence of a failed predation attempt of a bull shark (*Carcharhinus leucas*) on a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*). *Arquivos de Ciências do Mar*.
- SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S. 2007. Ecological aspects of marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*) based on group size and composition in the Cananéia estuary, southeastern Brazil. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals*. v. 6, n. 1, p. 71 – 82.
- SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S. 2008. Social organization of marine tucuxi, *Sotalia guianensis*, in the Cananéia estuary of southeastern Brazil, *Journal of Mammalogy*, n. 88(2), p. 347 – 355.
- SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S.; SANTOS, R. A.; LUCATO, S. H. B.; BASSOL, M. 2002. Insights on small cetacean feeding habits in southeastern Brazil. *Aquatic Mammals*, n. 24, p. 35 – 48.

- SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S.; RAMOS, R. M. A. 2003. Age estimation of marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association, U.K. (London)*, n. 83, p. 223 – 236.
- SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S.; SICILIANO, S.; ZERBINI, A. N.; ZAMPIROLI, E.; VICENTE, A.; ALVARENGA, F. 2000. Behavioral observations of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in São Paulo estuarine waters, Southeastern Brazil. *Aquatic Mammals*. v. 26, p. 260 – 267.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H. S. L.; CINTRÓN-MOLERO, G. 1990. The Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Estuaries*, 13:193-203.
- SCHUELKE, M. 2003. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18:233-234.
- SILVA, M. A. *et al.* 2003. Occurrence and distribution of cetaceans in the waters around the Azores (Portugal), summer and autumn 1999-200. *Aquatic Mammals*, p.77-83.
- SMITH-GOODWIN, J. A. 1997. A molecular genetic assessment of the population structure and variation in two inshore dolphin genera on the east coast of South Africa. 250 f. Monografia (Doutorado) - Rhodes University, Grahamstown.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*.
- VARGAS, S M; SANTOS, F R. 2008. Alelos exclusivos indicam introgressão em espécies de tartarugas marinhas. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, p.133-133.
- YOGUI, G. T.; SANTOS, M. C. O.; MONTONE, R. C. 2003. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. *The Science of the Total Environment*, n. 312, p. 67 – 78.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.