

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES PARA GOLFINHOS-ROTADORES  
(*Stenella longirostris*).**

**ANDRÉIA SANTORO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. CELSO LUÍS MARINO**

**Botucatu – SP  
2008**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES PARA GOLFINHOS-ROTADORES  
(*Stenella longirostris*).**

**ANDREIA SANTORO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. CELSO LUIS MARINO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de **Bacharel em Ciências Biológicas**.

**Botucatu – SP**

**2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Santoro, Andreia.

Caracterização e validação de marcadores microssatélites para golfinhos-  
rotadores (*Stenella longirostris*) / Andréia Santoro. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade  
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Celso Luis Marino

1. Genética animal 2. Marcadores moleculares 3. Golfinho – Genética

Palavras-chave: Golfinhos-rotadores; Microssatélites; *Stenella longirostris*

*“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.”*

**Salmo 23 (22)**

*Dedico este estudo à minha querida família, em especial aos meus amados pais, Isabel e Antonio, que sempre me apoiaram e deram forças para continuar na busca de meus sonhos, incentivando-me a prosseguir na conquista dessa nova etapa.*

*Este momento é fascinante e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram a viver comigo o meu sonho. Presentearam-me com a riqueza do estudo, compartilharam minhas alegrias e tristezas, foram sempre minha fortaleza.*

*Meus amados pais, ofereço o sorriso que trago no rosto, fruto da esperança, luta e crença que vocês fizeram nascer em mim a partir de cada gesto de carinho e amor. A emoção me cala, ficando a certeza de que hoje dedico a vocês esta vitória, porque ela vos pertence. Sem vocês nada disso teria o menor valor. Obrigado por tudo. Amo muito vocês.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado com sua luz e ter permitido alcançar mais esta graça em minha vida.

Aos meus queridos pais, Antonio e Isabel, que são minha fortaleza, fonte de amor, paz e esperança.

Ao meu irmão Daniel, cunhada Alessandra e minha linda sobrinha Pietra, por alegrar minha vida e compartilhar os momentos importantes. Amo vocês!

Ao meu avô Mauro e avó Aparecida, que rezaram muito por essa conquista. Em especial, à minha amada avozinha Olga e avô Domingo, vocês fazem muita falta.

Ao meu orientador Celso Luís Marino, exemplo de dedicação, comprometimento e profissional. Muito obrigada!

A Profa. Dra. Lígia Souza Lima Silveira da Mota por ter aceitado ser parecerista deste trabalho.

À Ana Paula Farro, por permitir que eu continuasse seu trabalho e disponibilizar as amostras coletadas de pele dos golfinhos-rotadores.

Aos meus companheiros de laboratório: Tânia, Juliana, Leonardo, Julio, Vanusa, Virgínia, Karine, Mauricio, Suzana, Helena e Aletéa.

Em especial aos meus grandes amigos, Tânia, Juliana e Leonardo, pelos momentos agradáveis e vários almoços divertidos. Tânia muito obrigada pela orientação durante todo o trabalho, você é demais!

E ao Júlio e à Vanusa que sempre estiveram dispostos a ajudar na realização do projeto.

Às meninas da república, por mais um ano de alegria e boas risadas: à Flávia Kalose, minha grande amiga do coração, companheira de república e “irmã-cordão-umbilical” para toda vida; à minha super prima Natália, pelos conselhos da “titia”; e à Taísa, que se tornou amiga de todas as horas. Vocês moram no meu coração.

A todos os meus amigos e amigas, que acompanharam a realização desse sonho, vocês contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Muito obrigada!

## INDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b>	<b>4</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
3.1 Considerações sobre Fernando de Noronha.	5
3.2 Golfinhos-rotadores	6
3.3 Marcadores Moleculares	8
3.4 Marcadores moleculares microssatélites	8
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
4.1 Material	11
4.2 Métodos	11
4.2.1 Extração de DNA	11
4.2.2 <i>Primers</i> de microssatélites	12
4.2.3 Análise dos <i>primers</i> – formação de <i>hairpins</i> e dímeros	14
4.2.4 Amplificação do DNA e eletroforese	14
4.2.5 Análise dos fragmentos	15
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>16</b>
5.1 Extração do DNA	16
5.2 <i>Primers</i> de microssatélites	16
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>21</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>22</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arquipélago de Fernando de Noronha.....	5
Figura 2 - Golfinhos-rotadores ( <i>Stenella longirostris longirostris</i> ) .....	7
Figura 3 - Gel de agarose 1, 5% com a amplificação dos <i>primers Slo5, Slo6, Slo7 e Slo12</i> na temperatura de anelamento de 50°C e MgCl <sub>2</sub> a 2 mM: os números 1,2 e 3 correspondem aos indivíduos <i>S. longirostris</i> coletados em Fernando de Noronha; o número 4 é o golfinho-rotador encalhado; C- controle negativo; L - ladder 100bp (Invitrogen) e a seta indica o excesso de <i>primers</i> .....	17
Figura 4 - Gel de agarose 1,5% com a amplificação dos primers <i>Slo10</i> (A) e <i>Slo8</i> (B) com indivíduos da espécie <i>S. longirostris</i> . As setas indicam a amplificação do fragmento de tamanho esperado. L: ladder 100bp (Invitrogen); C-: controle negativo.....	18
Figura 5-Gel de poliacrilamida 6% com a amplificação do <i>primer Slo8</i> com indivíduos da espécie <i>S. longirostris</i> . As setas indicam a posição de dois alelos. L: <i>ladder</i> 10bp (Invitrogen); C-: controle negativo. ....	19

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- <i>Loci</i> microssatélites desenhados para a espécie <i>Stenella longirostris</i> com seus respectivos alelos e graus de heterozigosidade.....	13
Tabela 2 - <i>Primers</i> avaliados em diversas temperaturas de anelamento e concentrações de MgCl <sub>2</sub> .....	17

## RESUMO

A utilização de marcadores microssatélites tem auxiliado os programas de conservação, colaborando na definição de estratégias para proteção e manejo de populações de animais silvestres. Alguns microssatélites já foram desenvolvidos para algumas espécies de cetáceos, inclusive para os golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*), aos quais recentemente foram publicados oito microssatélites espécie-específicos. A identificação e caracterização de novos SSR se faz necessário para ampliação das possibilidades de uso desses marcadores em estudos da Biologia e conservação dos golfinhos-rotadores. Deste modo, o presente projeto teve como objetivo dar continuidade a um trabalho de desenvolvimento de microssatélites para *S. Longirostris* iniciado no Departamento de Genética dessa Universidade, realizando a caracterização e validação de seis *primers* de microssatélites confeccionados para a espécie. O material tecido epidérmico de golfinhos-rotadores foi coletado no Arquipélago de Fernando de Noronha pelo método de raspagem da pele. A extração do DNA das amostras foi realizada com o uso da resina Chelex®. Os *primers* de microssatélite foram avaliados em reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e validados na população natural. Dos seis *primers* avaliados quatro não apresentaram amplificação de produtos específicos (*Slo5*, *Slo6*, *Slo7* e *Slo12*) e dois amplificaram bandas com tamanhos esperados (*Slo8* e *Slo10*). O *primer Slo10* foi monomórfico e o *Slo8* apresentou-se polimórfico em gel de acrilamida. E, desta forma, os *primers* de microssatélites caracterizados neste trabalho contribuirão para a melhor compreensão da biologia da espécie, bem como no planejamento e monitoramento da população de *Stenella longirostris*.

## 1 INTRODUÇÃO

O golfinho da espécie *Stenella longirostris* (GRAY, 1828) é pertencente à ordem Cetácea, subordem Odontoceti, família Delphinidae e reconhecido pela denominação comum “golfinho-rotador”. Esse animal apresenta um comportamento aéreo caracterizado por saltos e rotações em torno do próprio eixo corporal (FISH *et al.*, 2006), assim o nome que recebe tem relação com os movimentos apresentados por ele fora da água.

A espécie *S. longirostris* é subdividida em quatro subespécies, cada qual comum a uma determinada região: *S. l. longirostris* é pantropical oceânica; *S. l. orientalis* de águas oceânicas tropicais e costeiras do México no Oceano Pacífico Leste; *S. l. centroamericana* das águas costeiras do Pacífico da América Central; *S. l. roseiventris* de águas do oeste da Indonésia, Sul da China e Golfo da Tailândia (PERRIN, 1990; PERRIN *et al.*, 1999).

Os golfinhos-rotadores do oeste do Pacífico e dos Oceanos Índico e Atlântico são pertencentes à subespécie *S. l. longirostris*, que abrange também a região de Fernando de Noronha, um refúgio natural para esses animais (PERRIN *et al.*, 1991; PERRIN, 1999).

Neste Arquipélago, as pesquisas mais frequentes são referentes à ecologia comportamental e interações dos golfinhos-rotadores com outras espécies (SILVA JR, 1996; SAZIMA *et al.*, 2002, SILVA JR, 2005). Apenas dois trabalhos brasileiros podem ser citados revelando estudo direcionado ao conteúdo genético desses animais – Furtado-Neto *et al.*, 1998 e Farro, 2006.

Furtado-Neto *et al.* (1998) realizaram a identificação molecular de uma carcaça de golfinho da espécie *S. longirostris*, encontrada no Sul da Bahia. Farro (2006) em seu trabalho desenvolveu marcadores microssatélites para a determinada espécie de cetáceo e estudou a dinâmica populacional de golfinhos-rotadores no Arquipélago Fernando de Noronha. No entanto, ainda são escassos os estudos desenvolvidos envolvendo cetáceos no Brasil (OTT *et al.*, 2001).

Um importante fator que deve ser levado em consideração nas pesquisas sobre uma espécie-alvo é o conhecimento de sua biologia básica, o que envolve o grau de variabilidade genética, aspectos espaciais e temporais da estrutura populacional intraespecífica, para assim realizar a definição de estratégias apropriadas para a proteção e manejo de populações de animais silvestres (DIZON *et al.*, 1991).

Deste modo, a utilização de métodos moleculares em pesquisas de padrões de variação genética se torna uma ferramenta indispensável por contribuir aos programas de conservação

e indicar quais espécies necessitam de maiores esforços de preservação, além de colaborar no delineamento da viabilidade de uma população natural (JOHNSON *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, os principais elementos para as pesquisas moleculares de cetáceos foram: estrutura populacional (PASTENE *et al.*, 1997; BROWN GLADDEN *et al.*, 1999; HAYANO *et al.*, 2004; KRÜTZEN, 2004; NATOLI, *et al.*, 2004); relações filogenéticas e taxonômicas (WADA & NUMACHI, 1991; WANG *et al.*, 1999; YOSHIDA & KATO, 1999; ROSENBAUM *et al.*, 2000; GALES *et al.*, 2002; KINGSTON & ROSEL, 2004; ESCORZA-TREVIÑO, *et al.*, 2005; NATOLI, *et al.*, 2006; CABALLERO, *et al.*, 2007); identificação de espécies (BAKER & PALUMBI, 1996; FURTADO-NETO *et al.*, 1998; CUNHA *et al.*, 2005); monitoramento de pesca predatória (PALUMBI & CIPRIANO, 1998; BAKER *et al.*, 2000).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares destacam-se os microssatélites. Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995) esses marcadores apresentam as seguintes vantagens: alto nível de polimorfismo; geralmente são neutros em relação aos efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico; são codominantes, possuem uma grande quantidade de informação genética por loco; caracterizam o genótipo do indivíduo a partir de pequenas amostras de células ou tecidos.

Os microssatélites são muito distribuídos e um importante elemento do genoma dos vertebrados. Muitos estudos são direcionados a descobrir novos dados quanto à sua evolução e dinâmica molecular (NEFF & GROSS, 2001).

No grupo dos cetáceos algumas espécies já possuem microssatélites descritos na literatura: *Delphinapterus leucas* (BUCHANAN *et al.*, 1996); *Phocoena phocoena* (ROSEL *et al.*, 1999); *Eubalaena glacialis* (WALDICK *et al.*, 1999); *Tursiops aduncus* (KRÜTZEN *et al.*, 2001); *Tursiops truncatus* (CALDWELL *et al.*, 2002; ROSEL *et al.*, 2005); *Delphinus delphis* (COUGHLAN, *et al.*, 2006); *Stenella coeruleoalba* (MIRIMIN *et al.*, 2006); *Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis* (CUNHA & WATTS, 2007); *Stenella longirostris* (FARRO *et al.*, 2007).

No entanto, a disponibilidade de microssatélites espécie-específicos para alguns cetáceos é ainda restrita, sendo muito comum a utilização de *primers* heterólogos para o estudo molecular de espécies filogeneticamente próximas.

Um exemplo de trabalho com *primers* heterólogos que demonstrou eficiência nos resultados foi o realizado por Mirimin *et al.* (2006), quando foram desenvolvidos cinco *primers* de microssatélites para *Stenella coeruleoalba* os quais foram testados em espécies relacionadas filogeneticamente – *Delphinus delphis*, *Lagenorhynchus acutus*, *Tursiops*

*truncatus* e *Phocoena phocoena* – e mostraram serem polimórficos, inclusive um microssatélite, que apresentou monomorfismo para a espécie em foco, apresentou polimorfismo para três dentre as espécies relacionadas.

Porém a filogenia do grupo delfínídeos não está completamente elucidada e o uso destes *primers* heterólogos pode levar a uma diminuição no número de *loci* polimórficos e na presença de alelos nulos (não amplificados devido a mutações nas regiões flangeadoras) (DAKIN & AVISE, 2004; CUNHA & WATTS, 2007).

Alguns trabalhos relacionados ao uso de *primers* heterólogos, para espécies próximas, mostram a dificuldade de padronização da técnica como os realizados por Waldick *et al.* (2002) e o de Faria & Miyaki (2006) que obtiveram resultados não muito satisfatórios.

Waldick *et al.* (2002), realizaram um estudo populacional de baleias-francas (*Eubalaena glacialis*) testando um total de 27 *primers*, destes, 13 eram espécies-específicos e apresentaram polimorfismo, enquanto que os 14 restantes eram *primers* heterólogos e apenas três amplificaram.

Faria & Miyaki (2006) evidenciou a dificuldade na amplificação de *primers* heterólogos para a família Psittacidae, principalmente quando existia uma distância entre os táxons, destacou o alto custo financeiro, bem como o trabalho em realizar construção de bibliotecas genômicas das espécies e isolamento de microssatélites.

No entanto, para o melhor estudo e compreensão da biologia molecular de algumas espécies se faz necessário o desenvolvimento de marcadores espécie-específicos, mesmo com o grande investimento e trabalho requerido.

Para a espécie *Stenella longirostris* foram publicados oito microssatélites desenvolvidos por Farro *et al.* (2007), o desenvolvimento desses marcadores visa contribuir para o monitoramento da diversidade genética desses animais em Fernando de Noronha e possibilitar um melhor estudo da filogeografia da espécie no Brasil, além de poder ser testado em outras espécies de cetáceos como *primers* heterólogos.

Na pesquisa de Farro (2006) realizada junto ao laboratório CAGEM foram desenvolvidas bibliotecas genômicas para a espécie *Stenella longirostris* e isolados dezessete *primers* de microssatélites. Deste total, alguns *primers* necessitam de melhor caracterização a padronização.

## 2 OBJETIVO

Diante do exposto, este projeto teve como objetivo a caracterização e validação de um conjunto de *primers* de microssatélites para golfinhos-rotadores, desenvolvidos por Farro (2006).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Considerações sobre Fernando de Noronha.

O Arquipélago de Fernando de Noronha situa-se nas coordenadas geográficas 3°51' Sul e 32°25' Oeste, distante em 360 km de Natal (RN), 545 km do Recife (PE), cerca de 2.700 km do litoral da África e cerca de 425 km da linha do Equador.

Fernando de Noronha apresenta um clima tropical com duas estações pluviométricas bem definidas: período seco, de agosto a janeiro (pluviosidade não ultrapassa oito mm<sup>3</sup>/dia) e período chuvoso, de fevereiro a julho (pluviosidade pode atingir 193,3 mm<sup>3</sup>/dia). Os ventos alísios sudeste e leste predominam na região (COSTA, 1991).

O Arquipélago é constituído pelos topos das montanhas de uma cordilheira de origem vulcânica, de longa e complexa história, cuja base repousa a 4000 metros de profundidade: a Dorsa Mediana do Atlântico (Figura 1).



**Figura 1-** Arquipélago de Fernando de Noronha

O Arquipélago possui 21 ilhas, com uma área total de 26 km<sup>2</sup> e uma única ilha habitada, com o mesmo nome do Arquipélago. A Ilha de Fernando de Noronha tem 17 km<sup>2</sup> distribuídos longitudinalmente na direção sudoeste-noroeste, formando duas faces com 11 km de extensão, sendo a noroeste – Mar de Dentro – voltada para o continente brasileiro e protegida dos ventos predominantes e a sudeste – Mar de Fora – voltada para o continente africano e apresenta mar mais agitado (FARRO, 2006).

Na extremidade oeste do Mar de Dentro está localizada a Baía dos Golfinhos, enseada com as águas mais calmas, transparentes e profundas do Arquipélago (com 0 a 25 m de profundidade), a qual possui encostas íngremes e pedregosas, sem praias de areias, com praias de seixos rolados ou com águas chegando diretamente no penhasco.

No interior da enseada destaca-se a concentração de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*), que permanecem na Baía grande parte do dia, descansando e realizando comportamentos sociais, como acasalamento, amamentação, “brincadeiras” entre outros. E no final do dia, retornam para águas mais profundas, onde se alimentam de peixes, lulas e camarões.

Devido ao grande interesse dos turistas em visitar a ilha, é realizado um rígido controle na enseada dos golfinhos quanto à presença de embarcações, de pessoas e de qualquer tipo de atividade que possa prejudicar os golfinhos, segundo as normas da Portaria nº 05 de 25 de Janeiro de 1995, anexada ao Decreto nº 78, de 05 de Abril de 1991 – IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Além dessas normas, o Arquipélago é quase que inteiramente uma unidade de conservação, por causa da implantação da Área de Proteção Ambiental (APA) de Fernando de Noronha, criada em 1986, e do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha, PARNAMAR – FN, criado em 1988. E, diante as características ambientais do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha, a UNESCO, em 2001, decretou-o Patrimônio Natural da Humanidade, junto com a reserva Biológica do Atol das Rocas, criando o sítio Ilhas Atlânticas Brasileiras.

### 3.2 Golfinhos-rotadores

Os golfinhos-rotadores (Figura 2) são cetáceos de pequeno porte, com comprimento e peso máximos registrados de 2,3 m e 87 kg, respectivamente. A espécie apresenta padrão de coloração com um gradiente de tons de cinza, mais escuro no dorso, clareando em direção ao ventre. Pode ocorrer uma variação dependendo da população quanto à presença de uma faixa de coloração negra que se estende da região dos olhos até a base da nadadeira peitoral. Tal padrão ocorre nos golfinhos-rotadores do oeste do Pacífico e Oceanos Índico e Atlântico, que diferenciam a subespécie *Stenella longirostris longirostris*, na qual estão inseridos os golfinhos de Fernando de Noronha (PERRIN *et al.*, 1991; PERRIN, 1998).



**Figura 2** - Golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris longirostris*)

Os golfinhos-rotadores apresentam agrupamentos sociais muito fluídos, quanto ao tamanho e constituição dos grupos. Segundo NORRIS & DOHL (1980), certa segregação por idade e sexo entre os grupos de *Stenella longirostris* pode ocorrer da seguinte maneira: concentração de indivíduos mais vulneráveis (fêmeas, jovens e filhotes) no centro e de indivíduos maiores (geralmente machos) na periferia do grupo.

O período gestacional da espécie é de cerca de 10 meses com intervalo aproximado de três anos entre os nascimentos. As fêmeas atingem a maturidade sexual em média com quatro a sete anos de idade, enquanto que os machos atingem a maturidade entre sete e dez anos (PERRIN, 1998). O comportamento sexual dos golfinhos-rotadores consiste em um sistema de acasalamento promíscuo e polígamo. Esta estratégia resulta em uma estrutura social muito fluída, que permite vivência harmônica em grupo.

Os principais predadores de golfinhos-rotadores são tubarões, orcas (*Orcinus orca*), falsas orcas (*Pseudorca crassidens*) e baleias piloto (*Globicephala spp.*) (NORRIS *et al.*, 1985, PERRIN & GILPATRICK JR., 1994).

Os golfinhos-rotadores habitam geralmente águas calmas (ilhas ou bancos) e tropicais de superfície, caracterizado pela mistura de camadas de águas superficiais, com pequena variação anual da temperatura, nos locais em que baixas e altas profundidades estão próximas. (PERRIN, 1998, PERRIN & GILPATRICK JR., 1994).

### 3.3 Marcadores Moleculares

Marcadores genéticos podem ser utilizados para estimar diversos parâmetros de interesse dos ecologistas, como por exemplo: taxa de migração, tamanho da população, efeito gargalho, entre outros.

A rapidez e a praticidade na utilização de marcadores moleculares garantem um acúmulo de informações em um curto período de tempo, permitindo o contínuo aperfeiçoamento de novas técnicas relacionadas.

Marcadores moleculares são regiões do genoma ou segmentos específicos de DNA que podem ou não fazer parte de um gene, apresenta um desenvolvimento rápido e sua utilização tem sido ampla em vários organismos e com muitas facilidades (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As vantagens que estes marcadores apresentam são: possuem um alto nível de polimorfismo; geralmente neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico; em geral, codominantes, promovendo uma maior quantidade de informação genética por loco; utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de pequenas amostras de células ou tecidos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

A primeira técnica desenvolvida que permitia a detecção de fragmentos específicos de DNA foi o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”). E, a partir do surgimento da PCR (MULLIS & FALOONA, 1987), novas classes de marcadores moleculares surgiram como o RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA”), o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e os microssatélites.

### 3.4 Marcadores moleculares microssatélites

Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são uma classe de marcadores de DNA codominantes que possui padrão de herança mendeliana, que pode apresentar um alto grau de polimorfismo, o que permite a identificação de diversos alelos (VOWLES & AMOS, 2004; MOHINDRA *et al.*, 2005).

Os locos de microssatélites são seqüências de 1 a 6 bases repetidas em tandem e estão presentes no genoma de procariotos e eucariotos, em menor ou maior abundância, e podem ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes do genoma (TOTH *et al.*, 2000; ZANE *et al.*, 2002; MORGANTE *et al.*, 2002).

Os microssatélites mais comuns são primeiramente os dinucleotídeos (repetições de duas bases), seguidos pelos mononucleotídeos e tetranucleotídeos, sendo menos abundante os trinucleotídeos. Os dinucleotídeos com repetições de bases (AC)<sub>n</sub> (onde “n” representa o número de repetições) são comuns em mamíferos e em plantas, aqueles com repetições (AT)<sub>n</sub> (ELLEGREN, 2004).

Os SSRs são classificados segundo WEBER (1989) em três tipos quanto a sua estrutura: perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção em sua seqüência de repetição (ex:ATATATATA); imperfeitas, quando possuem um par de bases ou uma pequena seqüência interrompendo a série de repetição (ex:ATATATGCCTATATATA); compostas, formada por mais de uma unidade repetitiva (ex:ATATATATACACACACA). Segundo KUTIL & WILLIAMS (2001), microssatélites compostos são menos freqüentes, porque apresentam mais imperfeições e deleções e, provavelmente, representam a última fase antes da degradação.

A técnica utilizada para a análise do polimorfismo dos microssatélites se baseia na reação da polimerase em cadeia (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), na qual se utiliza um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases) para a amplificação de um determinado segmento de DNA, os quais são complementares a seqüências únicas que, nesse caso, flanqueiam um microssatélite (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Uma das características dos SSRs é que as regiões que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre as espécies de um mesmo gênero permitindo a transferência de microssatélites entre espécies (MOHINDRA *et al.*, 2005).

No entanto, como os microssatélites são geralmente encontrados em regiões não codificantes, a estratégia de desenhar *primers* universais em seqüências conservadas torna-se problemática para os microssatélites, devido a alta taxa de substituição nucleotídica nessa região (ZANE *et al.*, 2002). Portanto, um fator limitante para o emprego de microssatélites é a necessidade do desenvolvimento de *primers* específicos, que exige a construção de uma biblioteca genômica do organismo em questão.

Diversos microssatélites que podem ser utilizados para espécies relacionadas filogeneticamente tem sido amplificados em aves (PRIMMER *et al.*, 2005, SANTOS *et al.*, 2006), tartarugas marinhas (FITZSIMMONS, 1995) moscas (HUTTUNEN & SCHLOTTERER, 2002) tubarões (OVENDEN *et al.*, 2006), entre outros. Em cetáceos também existem diversos estudos envolvendo a questão (ROSEL *et al.*, 2005; COUGHLAN *et al.*, 2006; MIRIMIN *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de microssatélites apresenta diversas aplicações que se aplicam em diferentes áreas como estudos filogenéticos, forenses, de paternidade, genética de populações, conservação e manejo dos recursos biológicos. Desta maneira, a utilização de *primers* de microssatélites tem sido adotada amplamente em estudos de investigações genéticas de espécies de cetáceos e contribui intensamente para pesquisas envolvendo população ou o indivíduo (COUGHLAN *et al.*, 2006).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O material utilizado foi coletado pelo método de amostragem descrito por HARLIN *et al.* (1999), o qual demonstrou não acarretar grande trauma ao animal (por ser uma técnica de baixa invasividade, com o uso de esponjas compostas de fibra sintética). Todo o material biológico utilizado neste trabalho foi coletado por Farro (2006), sendo que a quantidade de pele foi suficiente para análises de DNA mitocondrial e DNA nuclear.

Esse material apresenta um total de 171 amostras de tecido epidérmico de golfinhos-rotadores no Arquipélago de Fernando de Noronha e estão disponíveis para demais estudos no laboratório CAGEM (UNESP – Botucatu). Deste total, 161 amostras apresentavam pele visível sendo 79 amostras da primeira coleta, que corresponde à estação chuvosa (agosto) no ano de 2004 e 82 na segunda, durante a estação seca (fevereiro) em 2006.

Neste trabalho, para a realização da avaliação do polimorfismo e da análise dos fragmentos gerados com a amplificação dos seis *primers* de microssatélites foram selecionados indivíduos que apresentaram maiores quantidades de tecido epidérmico, de acordo com a classificação que a amostra recebeu quanto ao material aderido à esponja: não apresentava material epidérmico visível na esponja (--); pele visível na esponja (+-); grande quantidade de pele visível (++). Além de utilizar uma amostra de DNA extraído de um golfinho-rotador encontrado encalhado na orla.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Extração de DNA

Algumas amostras de tecido epidérmico estavam armazenadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e outras em álcool 70%. Para a extração de DNA das amostras foi utilizado o método com a resina Chelex® (Sigma) no qual 200µL da resina a 5% foram acrescentados a uma pequena quantidade de pele retirada da esponja, com o auxílio de um palito de dente (autoclavado), em um tubo *ependorf*. Os tubos foram deixados em banho-maria à 65°C *overnight*. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a uma temperatura de 95°C por 15 minutos. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido a um novo tubo.

DNAs extraídos com esse protocolo não precisam ser quantificados, uma vez que o rendimento de DNA é baixo, e pode ser utilizado diretamente para realização das reações de PCR.

#### 4.2.2 *Primers de microssatélites*

Os seis *primers* de microssatélites utilizados neste trabalho foram desenvolvidos por Farro (2006) e as seqüências, unidade de repetição e tipo de classificação encontram-se na Tabela 1.

Esses oligonucleotídeos foram isolados de bibliotecas genômicas, construídas a partir de DNA extraído de tecido muscular de golfinho-rotador. O protocolo utilizado foi um adaptado pelo Laboratório de Análise Genética e Molecular – CBMEG – UNICAMP/IAC, modificação do realizado por KIJAS *et al.*, 1994 e apresenta as seguintes etapas: digestão com enzima de restrição; extração dos fragmentos de restrição do gel; ligação do DNA digerido aos adaptadores; preparação das partículas magnéticas (beads); verificação de seleção dos fragmentos; reação de ligação de DNA ao vetor (pGEM®-T); transformação de células competentes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*; confirmação dos clones positivos via PCR; inoculação e extração plasmidial. Em seguida, foi realizado o seqüenciamento, para posterior análise das seqüências limpas (com microssatélites, mas sem vetor e adaptadores) com o programa WEBTROLL para localização da região de repetição e desenhos dos *primers* nas regiões flanqueadoras.

Os seis *primers* de microssatélites avaliados foram, primeiramente, diluídos em água miliQ autoclavada para uma concentração de 100  $\mu$ M. A partir desta solução estoque, uma nova diluição foi realizada para que os *primers* ficassem em uma concentração final de 10  $\mu$ M.

**Tabela 1-** Loci microsatélites desenhados para a espécie *Stenella longirostris* com seus respectivos alelos e graus de heterozigosidade.

Loci	Seqüências (5'-3')	Unidade de Repetição	Tipo
<b>Slo5</b>	F - GAGGACTAAGGCTAATTTCCTCA R - TCACACGTCAGAACCATGTC	(GT) <sub>16</sub>	Perfeito
<b>Slo6</b>	F - ATGAAAATGAGCCAGACTACCTG R - CGTGTGTGTATGTATGATTCAGC	(TG) <sub>14</sub> (CA) <sub>6</sub>	Composto
<b>Slo7</b>	F - TATGAGCCTACAGGAGCAGTCA R - GTGCAAGCCCCACACACAC	(CT) <sub>21</sub>	Perfeito
<b>Slo8</b>	F - GAGGTAAGTCCAGCGTTTCAC R - GTTCTGTCTGCCGTGTGTGTT	(A) <sub>17</sub>	Perfeito
<b>Slo10</b>	F - CATCTCTATCAGCCATGTCCAA R - GTCTCTTTGGGGTTTGTAGGG	(TG) <sub>22</sub>	Perfeito
<b>Slo12</b>	F - AGATTCTGTGAGAAAACGAC R - CAGCCTACACTCAAAGAAAAGGG	(TC) <sub>8</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>2</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>4</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>7</sub>	Interrompido e Composto

### 4.2.3 Análise dos *primers* – formação de *hairpins* e dímeros

Para analisar as seqüências dos *primers* quanto à formação de self-dímeros, heterodímeros e *hairpins*, foi utilizado o site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) – Integrated DNA Technologies

### 4.2.4 Amplificação do DNA e eletroforese

Os testes dos *primers* foram efetuados para diferentes temperaturas de anelamento no termociclador PTC – 100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA).

As reações foram confeccionadas com os seguintes reagentes: 10 ng de DNA; 1X de Tampão para PCR, 0,75 – 4,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,83 mM de dNTP, 0,42 µM dos *primers forward* e *reverse*, e 0,75 u de Taq polimerase (5 u/µL, INVITROGEN) e água deionizada autoclavada para um volume final de 12µL.

Os parâmetros de ciclagem de PCR foram os seguintes: 95°C por 5 min; seguidos de 31 ciclos de 94°C por 30 s, anelamento dependendo do *primer* (t°C = X) por 30 s e 72 °C por 30 s. Ao final dos ciclos, as reações foram incubadas a 72°C por 10 minutos.

A amplificação foi verificada em gel de agarose, onde no produto da PCR foram adicionados 6µl de solução desnaturante (95% (v/v) de formamida, 10 mmol de EDTA, 0,1% (p/v) azul de bromofenol e 0,1% (p/v) xileno cianol). Para confirmação da amplificação, 12µl do produto da reação de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, usando como tampão Tris-borato de EDTA (TBE 1x pH 8,0). Também foi aplicada no gel uma amostra padrão de DNA, com tamanhos de fragmentos conhecidos (*Ladder* 100bp e/ou 1Kb, Invitrogen).

Depois de confirmada a amplificação, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida: as amostras foram submetidas a um tratamento térmico de 95°C por 10' para desnaturação e uma alíquota de 2,5 µl foi aplicada no gel de poliacrilamida desnaturante a 6% (acrilamida/bisacrilamida 29:1, 7M uréia), em placa de seqüenciamento vertical de 38 x 50 cm, com tampão Tris-borato de EDTA (TBE 1x pH 8,0). Também foi aplicada no gel uma amostra padrão de DNA, com tamanhos de fragmentos conhecidos (*Ladder* 10bp Invitrogen). A eletroforese foi conduzida à potência de 95 W, primeiro efetuando-se o aquecimento da placa até aproximadamente 45°C, seguindo-se corrida por um período que variou de 1 h 30min até 2 h 30min, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado. A coloração do gel foi realizada utilizando nitrato de prata,

seguinte o procedimento: solução de fixação (etanol 10%, ácido acético PA glacial 0.75%) por 5 min; solução de nitrato de prata (0.012M) por 20 min; e revelador (NAOH 0.75M) com formaldeído (1.2mL/L) por cerca de 15 min ou até o aparecimento das bandas.

#### **4.2.5 Análise dos fragmentos**

Os géis de agarose contendo os fragmentos amplificados para cada *primer* foram visualizados por um transiluminador de luz U.V., no sistema de foto-documentação digital Eagle-Eye (Stratagene®).

Os géis de poliacrilamida foram visualizados em luz branca e fotografados. A análise do polimorfismo desse gel foi realizada através da observação das imagens obtidas procurando encontrar diferentes alelos gerados por cada *primer*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração do DNA

As amostras utilizadas encontravam-se armazenadas em DMSO ou em álcool 70%, foi verificado que a extração de DNA funcionava, de maneira eficiente, para ambos os tipos de solução de preservação.

A fim de economizar material de tecido epidérmico para futuras extrações foi necessário utilizar um método de extração de DNA com maior eficiência e selecionar os indivíduos que apresentavam maiores quantidades de pele nas esponjas. Por ser um material raro, de espécies naturais de um Arquipélago com proteção ambiental, além de requerer grande financiamento, foi utilizado para este trabalho um grupo de três indivíduos da coleta, para a padronização dos primers e, então, uma posterior aplicação em mais indivíduos para a análise populacional.

O método de extração com a resina Chelex® demonstrou resultados satisfatórios, com alta eficiência, por promover a obtenção de uma solução com maior volume final e exigir menor quantidade de pele, corroborando com a proposta de Farro (2006).

### 5.2 *Primers* de microssatélites

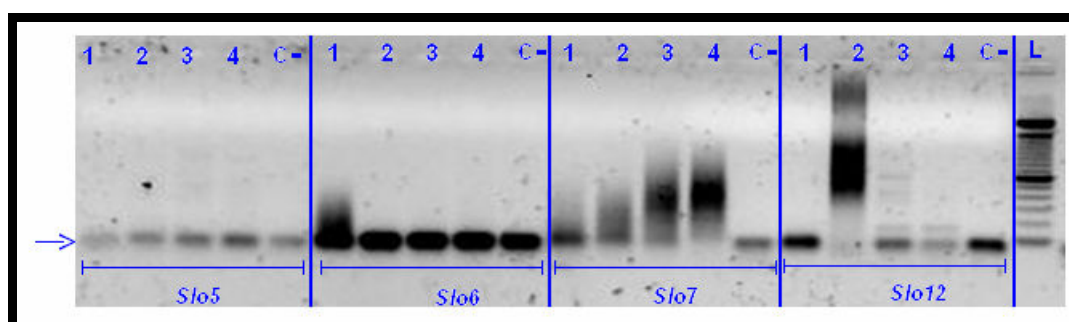
Para cada um dos seis *primers* de microssatélites avaliados foram estabelecidos protocolos envolvendo a temperatura de anelamento e a concentração de cloreto de magnésio das reações. Na tabela 2 são apresentados os testes realizados para cada conjunto de microssatélites. O objetivo em alterar as temperaturas de anelamento e concentração de magnésio foi evitar a amplificação de produtos inespecíficos na reação.

**Tabela 2** - *Primers* avaliados em diversas temperaturas de anelamento e concentrações de MgCl<sub>2</sub>

Primer	T(°C) anelamento	Concentração MgCl <sub>2</sub> (mM)
Slo 5	49; 50; 53; 55; 58	1,2; 2; 3; 4
Slo 6	49; 50; 53; 55; 58	1,2; 2; 3; 4
Slo 7	49; 50; 53; 55; 58	1,25; 2; 2,5
Slo 8	58; 59; 60	1,25
Slo 10	58; 59; 60	0,75; 1; 1,25
Slo 12	49; 50; 53; 55; 58	1,2; 2; 3; 4

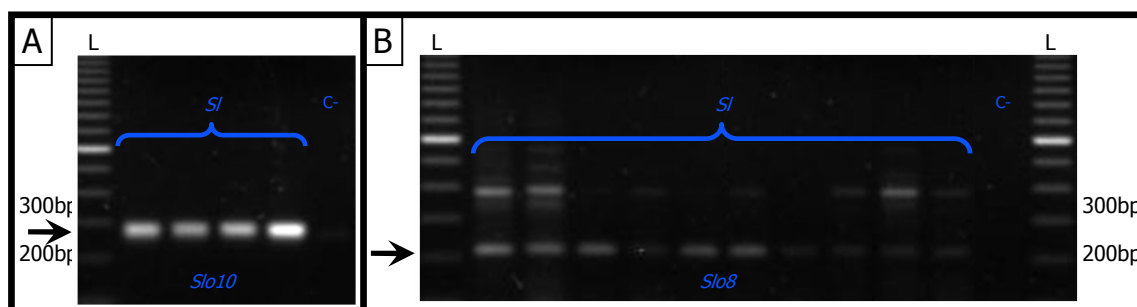
Após estes testes não foi observado nenhum fragmento amplificado com o *primer Slo5* (figura 3), mesmo com a redução da especificidade da reação (diminuição de temperatura para 49°C e aumento de cloreto de magnésio para 4mM), o mesmo aconteceu no trabalho de Farro (2006) para este microsatélite.

Os pares de *primers Slo6, Slo7 e Slo12* amplificaram bandas inespecíficas, que persistiam mesmo após vários ajustes na reação (Figura 3). Em Farro (2006), a autora não amplificou o *primer Slo7* mesmo com modificações das reações e para os outros *primers* citados, ela considerava a necessidade de ajustes na reação para melhor serem avaliados.



**Figura 3** - Gel de agarose 1, 5% com a amplificação dos *primers Slo5, Slo6, Slo7 e Slo12* na temperatura de anelamento de 50°C e MgCl<sub>2</sub> a 2 mM: os números 1,2 e 3 correspondem aos indivíduos *S. longirostris* coletados em Fernando de Noronha; o número 4 é o golfinho-rotador encalhado; C- controle negativo; L - ladder 100bp (Invitrogen) e a seta indica o excesso de *primers*.

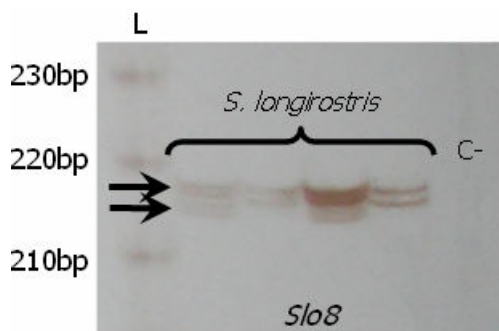
O *primers Slo8* e *Slo10* amplificaram no gel de agarose. O *primer Slo8* foi testado para um número maior de indivíduos, amplificou uma banda com o tamanho esperado e outra banda inespecífica, a qual persistia mesmo com diversas modificações na reação (Figura 4b). O *primer Slo10* apresentou-se monomórfico nos indivíduos testados em gel de agarose, com uma banda do tamanho esperado (Figura 4b).



**Figura 4** - Gel de agarose 1,5% com a amplificação dos primers *Slo10* (A) e *Slo8* (B) com indivíduos da espécie *S. longirostris*. As setas indicam a amplificação do fragmento de tamanho esperado. L: ladder 100bp (Invitrogen); C-: controle negativo.

O gel de agarose foi utilizado para verificação de amplificação em locos de microssatélite, mas para análise de tamanhos de fragmentos apresentava-se ineficiente, por não separar as bandas com pequenas diferenças de tamanho. O gel de poliacrilamida consegue separar os fragmentos menores com melhor resolução, sendo possível diferenciar fragmentos com até dois pares de bases de diferença entre eles. Desta maneira, o polimorfismo foi avaliado utilizando gel de poliacrilamida para os *primers Slo8* e *Slo10*.

O *primer Slo10* manteve o padrão de banda monomórfica também em gel de poliacrilamida, não sendo possível verificar a presença de outros alelos, o que não descarta a possibilidade do uso desse *primer* em estudos de genética de população uma vez que o número de indivíduos testados quanto ao polimorfismo foi muito pequeno. Enquanto o *primer Slo8*, em análise do gel de poliacrilamida, apresentou dois alelos para os indivíduos testados (figura 5), mostrando-se polimórfico.



**Figura 5**-Gel de poliacrilamida 6% com a amplificação do primer *Slo8* com indivíduos da espécie *S. longirostris*. As setas indicam a posição de dois alelos. L: ladder 10bp (Invitrogen); C-: controle negativo.

Farro (2006) avaliou a população de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha com nove microssatélites, constatou baixa heteroziguidade para quase todos os *loci* e alto coeficiente de endogamia. No entanto, esses fatores não estão associados a uma baixa variabilidade genética para a população já que o número de alelos dos *loci* avaliados por Farro (2006) foi relativamente alto e as frequências variáveis.

Com isso, apesar do primer *Slo10* ter-se apresentado monomórfico para os indivíduos testados da espécie *Stenella longirostris*, não se descarta a possibilidade desse microssatélite apresentar outros alelos quando avaliados em populações de outras localidades. Enquanto que o primer *Slo8*, o qual demonstrou-se polimórfico, poderá ser usado em estudos sobre a dinâmica populacional dos golfinhos-rotadores.

Quanto aos outros primers testados (*Slo5*, *Slo6*, *Slo7* e *Slo12*), os quais não apresentaram resultados satisfatórios, é importante ressaltar que, para garantir maior eficiência no desenvolvimento desses microssatélites alguns fatores devem ser seguidos, tais como: temperaturas de anelamento semelhantes entre eles; equilíbrio entre especificidade de seqüência e comprimento do primer (longo o suficiente para manter a especificidade a uma região alvo, mas não tão longo a fim de impedir o anelamento); não deixar que os primers formem *hairpins* ou dímeros com ele mesmo ou com seu par, pois estas estruturas não participam da hibridação com o DNA molde e podem causar dano na eficiência da polimerase (que estenda produtos indesejados).

Os primers desenhados por Farro (2006) foram avaliados com o auxílio do programa GENE RUNNER V. 3.05 quanto à formação de estruturas inespecíficas, os microssatélites que apresentassem *hairpins* ou dímeros acima de uma temperatura de 20°C seria descartados. A fim de verificar a existência das estruturas inespecíficas e as respectivas temperaturas de ocorrência foi utilizado, neste trabalho, o site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) - Integrated DNA Technologies. Com este recurso, foi constatada a formação de *hairpins* para os primers *Slo7* (*forward* – temperatura do *hairpin* 41.3°C e *reverse* – *hairpin* 32°C), *Slo8* (*forward* – *hairpin* 30°C) e *Slo12* (*reverse* – *hairpin* 29.4°C) o que contraria Farro

(2006), pois os *hairpins* formados estão a uma temperatura acima de 20°C e podem ter efeito significativo na reação de PCR.

Microssatélites são recursos importantes para avaliar a diversidade genética presente na espécie *Stenella longirostris*. Ainda são escassos os estudos desse tipo para golfinhos-rotadores, mas são necessários para a melhor compreensão da variabilidade genética da população e para o monitoramento dos planos de conservação dessas espécies. Em Farro (2006) dos 22 pares de microssatélites isolados das bibliotecas genômicas, oito estão disponíveis para estudos da dinâmica populacional. No presente trabalho, foram realizados vários testes de amplificação com os *primers*, sendo que dois deles (*Slo8* e *Slo10*) apresentaram bandas significativas, o microssatélite *Slo10*, monomórfico, poderá ser testado em mais indivíduos para analisar se o padrão permanece e o SSR *Slo8*, polimórfico, poderá ser utilizado nos estudos de análises populacionais para a espécie *Stenella longirostris*, bem como ser aplicado em espécies relacionadas filogeneticamente, como *primers* heterólogos. E, desta forma, os *primers* de microssatélites caracterizados neste trabalho contribuirão para a melhor compreensão da biologia da espécie, bem como no planejamento e monitoramento da população de *Stenella longirostris*.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ A extração com a resina Chelex® demonstrou ser eficiente, por promover uma solução com maior volume final e exigir menor quantidade de pele;
- ✓ Os *primers Slo5, Slo6, Slo7 e Slo12* não apresentaram produtos amplificados, com todos os testes realizados;
- ✓ O *primer Slo8 e Slo10* amplificaram fragmentos de microssatélites;

## 7 REFERÊNCIAS

- BAKER, C.S.; PALUMBI, S.R. Population structure, molecular systematic and forensic identification of whales and dolphins. In: AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. (Eds) *Conservation genetics: case histories from nature*. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 10-49.
- BAKER, C.S.; LENTO, G.M.; CIPRIANO, F.; PALUMBI, S.R. Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proceedings of the Royal Society London*, v. 267, p. 1191-1199, 2000.
- BROWN GLADDEN, J.G.; FERGUNSON, M.M.; FRIESEN, M.K.; CLAYTON, J.W. Population structure of North American beluga whales (*Delphinapterus leucas*) based on nuclear DNA microsatellite variation and contrasted with the population structure revealed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Biology*, v. 8, p. 347-363, 1999.
- BUCHANAN, F.C.; FRIESEN, M.K.; LITTLEJOHN, R.P.; CLAYTON, J.W. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 571-575, 1996.
- CABALLERO, S.; TRUJILLO, F.; VIANNA, J.A.; BARRIOS-GARRIDO, H.; MONTIEL, M.G.; BELTRÁN-PEDREROS, S.; MARMONTEL, M.; SANTOS, M.C.; ROSSI-SANTOS, M.; SANTOS, F.R.; BAKER, C.S. 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, 2007.
- CALDWELL, M.; GAINES, M.S.; HUGHES, C.R. Eight polymorphic microsatellite *loci* for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Molecular Ecology Notes*, v. 2, p. 393-395, 2002.
- COSTA, K.M.P. *Hidrologia e Biomassa Primária da Região Nordeste do Brasil entre as latitudes de 8°00'00'' e 2°44'30'' S e as Longitudes de 35°56'30'' e 31°56'30'' W*. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Departamento de Oceanografia. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1991.
- COUGHLAN, J.; MIRIMIN, L.; DILLANE, E.; ROGAN, E.; CROSS T.F. Isolation and characterization of novel microsatellite *loci* for the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) and cross-amplification in other cetacean species. *Molecular Ecology Notes* v. 6, 490–492, 2006.
- CUNHA, H.A.; da SILVA, V.M.F.; LAILSON-BRITO JR, J.; SANTOS, M.C.O.; FLORES, P.A.C.; MARTIN, A.R.; AZEVEDO, A.F.; FRAGOSO, A.B.L.; ZANELATTO, R.C.; SOLÉ-CAVA, A.M. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 490-494, 2005.
- CUNHA, H.A.; WATTS, P.C. Twelve microsatellite *loci* for marine and riverine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*). *Molecular Ecology Notes* v.7, p.1229–1231, 2007.

- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, p. 504-509, 2004.
- DIZON, A.E.; SOUTHERN, S.O.; PERRIN, W. Molecular analysis of mtDNA types in exploited populations of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). *International Whaling Commission*, v. 13, p. 183-202, 1991.
- ELLEFREN, H. Microsatellites; simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews – Genetics*, v. 5, p. 435-445, 2004.
- ESCORZA-TREVIÑO, S.; ARCHER, F.I.; ROSALES, M.; LANG, A.; DIZON, A.E. Genetic differentiation and intraspecific structure of Eastern Tropical Pacific spotted dolphins, *Stenella attenuata*, revealed by DNA analyses. *Conservation Genetics* v. 6, p.587–600, 2005.
- FARIA, P.J.; MIYAKI, C.Y. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 231-240, 2006.
- FARRO, A. P. C.; ROLLO JR, M. M.; SILVA JR, J. M.; MARINO, C. L. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Springer Science* 2007.
- FARRO, A.P.C. Variabilidade genética de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*) a partir de marcadores microssatélites 2006. f.103. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas*. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília - DF: Embrapa-Cenargen 1998. 220p.
- FISH, F.E.; NICASTRO, A.J.; WEIHS, D. Dynamics of the aerial maneuvers of spinner dolphins. *The Journal of Experimental Biology* v. 209, p. 590-598, 2006.
- FITZSIMMONS N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellite *loci* over 300 Million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology. Evolution*. v.12, n.3, p.432-440, 1995.
- FURTADO-NETO, M.A.A.; QUEIROZ, E.L.; ZERBINI, A.N.; CARR, S.M. Uso de seqüências do mtDNA para identificação de um exemplar de golfinho-rotador, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), encalhado no estado da Bahia, Brasil. *Arquivos de Ciências doMar*, v.31, p. 83-91, 1998.
- GALES, N.J.; DALEBOUT, M.L.; BANNISTER, J.L. Genetic identification and biological observation of two free-swimming beaked whales: Hector's beaked whale (*Mesoplodon hectori*, Gray, 1871), and Gray's beaked whale (*Mesoplodon grayi*) Von Haast, 1876. *Marine Mammal Science*, v. 18, p. 544-551, 2002.

- GRAY, J.E. *Spicilegia zoologica*; or original figures and short systematic descriptions of new and unfigured animals. London: Treüttel, Würtz and Co. and W. Wood, 1828. 7 p.
- HARLIN, A.D. Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal Science*, v. 15, p. 409-425, 1999.
- HAYANO, A.; YOSHIOKA, M.; TANAKA, M.; AMANO, M. Population differentiation in the Pacific White-sided Dolphin *Lagenorhynchus obliquidens* inferred from mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *Zoological Science* v.21, p.989-999, 2004.
- HUTTUNEN, S.; SCHLÖTTERER, C. Isolation and characterization of microsatellites in *Drosophila virilis* and their cross species amplification in members of the *D. virilis* group. *Molecular Ecology Notes*, v.2, p.593–597, 2002.
- JOHNSON, W.E.; EIZIRICK, E.; ROELKE-PARKER, M.; O'BRIEN, S.J. Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation. In: GITTLEMAN, J.L.; FUNK, S.M.; MACDONALD, D.; WAYNE, R.K. (Eds) *Carnivore Conservation*. Cambridge: Cambridge, Univ. Press / The Zoological Society of London, 2001.
- KIJAS, J.M.; FOWLER, J.C.; GARBETT, C.A.; THOMAS, M.R. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*, v. 16, p. 656-662, 2002.
- KINGSTON, S. E.; ROSEL, P. E. Genetic Differentiation among Recently Diverged Delphinid Taxa Determined Using AFLP Markers *Journal of Heredity* v.95, n.1, p.1-10, 2004.
- KRÜTZEN, M.; SHERWIN, W.B.; BERGGREN, P.; GALES, N. Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay Western Australia. *Marine Mammal Science*, v. 20, n.1, p.28-47, 2004.
- KUTIL, B. L.; WILLIAMS, C.G. Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. *Journal of Heredity* v.92, p.327-32, 2001.
- MIRIMIN, L.; COUGHLAN, J.; ROGAN, E.; CROSS, T. F. Tetranucleotide microsatellite loci from the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833). *Molecular Ecology Notes* v. 6, p. 493–495, 2006.
- MOHINDRA, V.; NARAIN, L.; PUNIA, P.; GOPALAKRISHNAN, A.; MANDAL, A.; KAPOOR, D.; PONNIAH, A. G; LAL, K. K. Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of *Labeo dyocheilus* (McClelland, 1839). *J. Appl. Ichthyol.* v.21 p. 478–482, 2005.

- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Natures Genetics*, v.30, p.194-200, 2002.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymological*, v. 55 p. 335-350, 1987.
- NATOLI, A.; PEDDEMORS, V.M.; HOELZEL, A.R. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses *Journal of Evolutionary Biology*. v.17, p.363–375, 2004.
- NATOLI, A.; CAÑADAS, A.; PEDDEMORS, V. M.; AGUILAR, A.; VAQUERO, C.; FERNÁNDEZ-PIQUERAS, P.; HOELZEL, A. R. Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus* sp.) *Journal of Evolutionary Biology*. v.19, p. 943–954, 2006.
- NEFF, B. D.; GROSS, M. R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, v.55, n.9, p.1717–1733, 2001.
- NORRIS, K.S.; DOHL, T.P. Behaviour of the Hawaiian Spinner Dolphin *S. longirostris*. *Fishery Bulletin*, v. 77, p. 821-849, 1980.
- NORRIS K. S.; WÜRSIG, B.; WELLS, R.S.; WÜRSIG, M.; BROWNLEE, S.M.; JOHNSON, C.; SOLOW, J. *The Behaviour of the Hawaiian Spinner Dolphin, Stenella longirostris*. La Loja: Southwest Fisheries Center, Administrative Report, 1985. 221 p.
- OTT, P.H.; FREITAS, T.R.O.; FLORES, P.A.C.; WHITE, B.N. Mitochondrial DNA variation among southern right whales (*Eubalaena australis*) from two wintering grounds (Brazil and Argentina) in the South West Atlantic Ocean, in 14<sup>th</sup> Biennial Conference on the biology of marine mammals, Vancouver B.C., Canadá, 2001. 164 p.
- OVENDEN, J.R.; STREET, R.; BRODERICK, D. New microsatellite loci for Carcharhinid sharks (*Carcharhinus tilstoni* and *C.sorrah*) and their cross-amplification in other shark species. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 415-418, 2006.
- PALUMBI, S.R.; CIPRIANO, F., Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *The Journal of Heredity*, v. 89, p. 459-464, 1998.
- PASTENE, L.A.; GOTO, M.; ITOH, S.; WADA, S.; KATO, H. Intra- and inter-oceanic patterns of mitochondrial DNA variation in the Bryde's whale, *Balaenoptera edeni*. *International Whaling Commission*, v. 47, p. 569-574, 1997.
- PERRIN, W.F. Subspecies of *Stenella longirostris* (Mammalia: Cetacea: Delphinidae). *Proceedings Biology Society Wash.*, v. 103, p. 453-463, 1990.

- PERRIN, W.F.; AKIN, P.A.; KASHIWADA, J.V. Geographic Variation in External Morphology of the Spinner Dolphin *Stenella longirostris* in the Eastern Pacific and Implications for Conservation. *Fischery Bulletin, USA*, v. 89, p. 411-428, 1991.
- PERRIN, W.F.; GILPATRICK JR, J.W. Spinner Dolphin *Stenella longirostris* (Gray, 1828). In: RIDGWAY, S.H.; HARRISON, R. (Eds) *Handbook of marine mammals: the first book of dolphins*. London: Academic Press, cap.5, p. 99-128, 1994.
- PERRIN, W.F. *Stenella longirostris*. *Mammalian Species*, v.599, p.7, 1998.
- PERRIN, W.F.; DOLAR, M.L.L.; ROBINEAU, D. Spinner dolphins (*Stenella longirostris*) of the western Pacific and Southeast Asia: Pelagic and shallow-water forms. *Marine Mammal Science*, v. 15, p. 1029-1053, 1999.
- PRIMMER, C.R.; PAINTER, J.N.; KOSKINEN, M.T.; PALO, J.U.; MERILÄ, J. Factors affecting cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, v.36, p.348–360, 2005.
- ROSEL, P.E.; FRANCE, S.C.; WANG, J.Y.; KOCHER, T.D. Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, v. 8, p. S41-S54, 1999.
- ROSEL, P. E.; FORGETTA, V.; DEWAR, K. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) *Molecular Ecology Notes* v. 5, p. 830–833, 2005.
- ROSENBAUM, H.C.; BROWNELL, R.L.; BROWN, M.W.; SCHAEFF, C.; PORTWAY, V.; WHITE, B.N.; MALIK, S.; PASTENE, L.A.; PATENAUDE, N.J.; BAKER, C.S.; GOTO, M.; BEST, P.B.; CLAPHAM, P.J.; HAMILTON, P.; MOORE, M.; PAYNE, R.; ROWNTREE, V.; TYNAN, C.T.; BANNISTER, J.L.; DESALLE, R. Worldwide genetic differentiation of *Eubalaena*: questioning the number of right whale species. *Molecular Biology*, v. 9, p. 1793-1802, 2000.
- SANTOS, M.S.; GONÇALES, E.C.; BARBOSA, M.S.R.; SILVA, A.; SCHNEIDER, M.P.C. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 307-309, 2006.
- SAZIMA, I.; SAZIMA, C.; SILVA JR, J.M. Golfinhos e cangulos: reciclagem no mar. *Ciência Hoje*, p. 80-82, 2002.
- SILVA JR, J.M. Aspectos do comportamento do Golfinho-rotador, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), no arquipélago de Fernando de Noronha. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 1996. 131p.
- SILVA JR, J.M. Ecologia comportamental do golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) em Fernando de Noronha. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005. 120p.
- TÓTH, G., Z.; GÁSPARI, C.; JURKA, J. *Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis*. *Genome Res.* v.10, p.967–981, 2000.

- VOWLES, E.J.; AMOS, W. Evidence for widespread convergent evolution around human microsatellites. *Plos Biology*, v.2, p. 1157-1167, 2004.
- WADA, S.; NUMACHI, K. Allozyme analyses of genetic differentiation among the populations and species of the Balaenoptera. *International Whaling Commission.*, v. 13, p. 124-154, 1991.
- WALDICK, R.C.; BROWN, M.W.; WHITE, B.N. Characterization and isolation of microsatellite *loci* from the endangered North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, v.8, p. 1753-1768, 1999.
- WALDICK, R.C.; KRAUS, S.; BROWN, M.W.; WHITE, B.N. Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, v.11, p. 2241-2249, 2002.
- WANG, J.Y.; CHOU, L.S.; WHITE, B.N. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in chinese waters. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 1603-1612, 1999.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, Mar. 1989.
- YOSHIDA, H.; KATO, H. Phylogenetic relationships of Bryde's whales in the western north pacific and adjacent waters inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine Mammal Science*, v. 15, p. 1269-1286, 1999.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATERNELLO, T. *Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology*, v.11, p. 1-16, 2002.