

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

JULIANA YWASAKI LIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POPULACIONAL DE *Sotalia guianensis* DO
LITORAL DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2017

JULIANA YWASAKI LIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POPULACIONAL DE *Sotalia guianensis* DO
LITORAL DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira

COORIENTADOR: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2017

JULIANA YWASAKI LIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POPULACIONAL DE *Sotalia guianensis* DO
LITORAL DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 30 de Março de 2017

Banca Examinadora

Edwards Frazão Teixeira – (DSc, Ciência Animal) - FIOCRUZ

Filipe Brum Machado – (DSc, Genética) - UENF

Enrique Medina-Acosta – Coorientador (DSc, Parasit. Médica e Molecular) - UENF

Leonardo Serafim da Silveira – Orientador (DSc, Patologia Veterinária) - UENF

AGRADECIMENTOS

Durante esses anos dedicados ao doutorado eu felizmente pude contar com o apoio e ajuda de muitas pessoas. Cada palavra amiga, incentivo, puxão de orelha, auxílio científico ou pessoal, foram importantíssimos. Vou guardar com carinho e gratidão todos aqueles que tornaram possível o desenvolvimento desse projeto e a minha formação.

À minha mãe, Luiza Ywasaki, por ser uma mãe tão exigente, um exemplo de mulher, de força e de bondade. Reconheço todo o esforço que fez para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada por tudo.

Ao meu orientador, Dr. Leonardo Serafim, faltam palavras para agradecer todo o apoio durante esses 7 anos de orientação e amizade. Agradeço imensamente ser tão solícito e tão preocupado com seus alunos. A sua educação, calma e apoio jamais serão esquecidos.

Ao meu coorientador Enrique Medina-Acosta, por abrir as portas de seu laboratório, me acolher como aluna e me ensinar muito. Os anos de NUDIM com certeza me fizeram amadurecer e aprender muito. Obrigada por ser compreensivo, disponível e um exemplo de pesquisador e de ser humano.

À família NUDIM, que me acolheu e tornou meus dias mais divertidos e leves. Sem vocês acredito que não teria chegado inteira e sã até o final. Agradeço cada momento que tornou os dias mais alegres e as atividades mais prazerosas. Ronaldo, Douglas, Thaís, Filipe, Antônio, Vladimir, Cinthya, Thiago, Diego, Pedro, Érica, Alan, Luísa, Katrine, Graziela, Rebeka, Cristina, Jozimara, Cleyton, Cláudia, Maria e a Dra. Beatriz Garcia. Ronaldo e Douglas, um obrigada especial, pois é muito bom saber que existem pessoas como vocês no mundo e é melhor ainda torcer pelas suas conquistas. A todos do Nudim, meu muito obrigada pelos excelentes momentos compartilhados e trocas de conhecimento sobre outras áreas. Vou sentir falta de todos e lembrar de cada um com carinho.

À Dra. Thaís Louvain pela confiança, por todos os ensinamentos, auxílios e dicas na bancada, caronas, conversas, por sempre ter uma palavra de ânimo e incentivo, mas principalmente pela amizade que vou levar pra vida toda.

Ao Dr. Filipe Machado por toda a disponibilidade, ensinamentos, discussões e incentivo. Seus questionamentos me despertaram mais interesse na pesquisa.

As carinhosas golfinetes do NEPAS, Anna Paula, Carol, Letícia, Isis, Raíssa e Priscila, por serem tão amáveis companheiras de laboratório e de campo. Com vocês foi muito mais divertido dar os primeiros passos no mundo dos cetáceos. Foram muitas idas ao ORCA, muito cansaço, suor e boto fedido necropsiado. Jamais esquecerei as necropsias madrugada a dentro, as viagens para o Espírito Santo, saídas de barco para avistamento, nosso episódio de pica pau nas cataratas, hipotermia e tentativa de salvar a orca encalhada viva. Priscila, obrigada pela ajuda com as necropsias e por ter nos abrigado durante a disciplina da UFES, em Aracruz. Guardo cada memória no coração e desejo muito sucesso profissional a cada uma. Meu obrigada também aos outros alunos do LMPA, que nos auxiliaram diversas vezes, Fábio, Henrique, Hasssan, Késya e Gabi.

Ao Lupércio Barbosa, diretor do Instituto Orca, pela confiança depositada ao nosso grupo, por nos ceder espaço para coletar todas as amostras e principalmente pelos anos de dedicação a conservação dos cetáceos do Espírito Santo. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e por nos receber tão bem durante todos esses anos.

A todas as pessoas que já passaram pelo Instituto Orca, diretores, administrativos, estagiários, biólogos, funcionários, veterinários, voluntários e amigos do instituto, meu muito obrigada a todos vocês. Em especial agradeço ao Jerônimo, nosso querido amigo e funcionário do instituto, pau pra toda obra, que sempre nos ajudou em tudo com muita disposição.

Sou muito grata também a todos os professores que passaram pela minha formação acadêmica e me fizeram crescer como pesquisadora e como pessoa. Mesmo que só algumas conversas, aulas ou exemplos, fui moldada com um pouco de cada um de vocês.

Ao meu orientador da graduação Dr. Ronaldo Novelli, o maior naturalista nato que conheço, por todos os ensinamentos nos primeiros passos na vida científica e por me definir ética de uma forma que jamais esquecerei.

Às queridas Conceição e Jovana, um obrigada especial pela ajuda com as burocracias da pós, pela dedicação ao secretariado, pela disponibilidade e carinho com os alunos da Ciência Animal.

Gostaria de agradecer também a todos os funcionários da UENF, em especial do laboratório de Morfologia e Anatomia Patológica e do laboratório de Biotecnologia.

Aos colegas da pós, Wilder e Junior, por todas as discussões sobre estatística e pela excelente troca de conhecimento.

Ao David Janiger, pelo envio de artigos e pelo seu incrível trabalho de curadoria.

À *CSI- Cetacean Society International* pelo auxílio financeiro em congressos e principalmente ao Willian Rossiter “Tio Bill” por seu trabalho filantrópico inspirador, por ser tão generoso e incentivador das pesquisas com cetáceos nos países mais “carentes” de auxílios científicos.

Às amigas e amigos do grupinho mais maluco e mais querido, Thaísa, Lara, Gil, Michele, Manu, Andressa, Aline, Gabi, Douglas. Minha vida em campos não seria a mesma sem a presença constante de vocês.

Naiana e Carine, sem palavras pra agradecer por toda a amizade, amor e paciência em todos esses anos. Sou muito grata pela compreensão nos momentos difíceis e de estresse no doutorado, por sempre me convidarem para saidinhas ou comidinhas para me distrair e por estarem sempre presentes, como amigas incríveis.

Aos amigos, Leonardo e Marcela, com seus pequenos Maria e Leozinho, agradeço pela amizade, incentivo e por me darem de presente a oportunidade de ser “tia” dessas crianças linda e queridas. Mesmo a distância o carinho só aumenta.

A todos os funcionários, professores e coordenadores do Pré-Vestibular Social Teorema. Agradeço pela oportunidade de ter participado desse projeto maravilhoso onde me descobri verdadeiramente professora e cresci como profissional. Em especial, quero agradecer ao coordenador e amigo Paulo Cesar, pela dedicação a tudo que desenvolve, e pelo excelente trabalho na extensão .

Aos colegas do laboratório de genética da conservação da UFES de São Mateus, por me receberem, me auxiliarem na extração de DNA e por compartilharem comigo o conhecimento de vocês. Em especial à Drienne Faria, por me apresentar os programas de estatística de populações, pelo auxílio e tempo disponibilizado na última visita.

Às meninas da República Fiona Verde, Luana, Geórgia e Ana Luiza por terem me acolhido em São Mateus durante os meses que o projeto foi desenvolvido na UFES. Sem vocês, eu não teria sobrevivido em Guriri, e não teria guardado tão boas lembranças desse período.

À Lara de Almeida, por me receber tão bem em sua casa no Rio de Janeiro durante a realização da disciplina na UERJ.

Meu agradecimento muito especial aos meus amigos Mariana Scaramussa e Phillipe Machado, pela incrível amizade de anos, pela confiança, companheirismo e por me acolherem na casa de vocês nesta fase final da tese e sem bolsa. Obrigada por serem tão compreensíveis e queridos comigo. Tenho uma dívida de vida com vocês.

Aos meus amigos Gabi e Lucas pelas palavras de incentivo, pela amizade e por compartilharem comigo as experiências e o conhecimento de vocês. Lucas, obrigada pela leitura da minha tese.

Aos meus amigos de longe, Tamires Queiroz, Juliana Garcia, Delson e Paulinha, Suellen Gomes, pela amizade de anos e por tornarem minhas idas a SJC mais gostosas.

A minha prima, Cristiane Sayuri, por ser um exemplo de força e coragem, que não me deixou esquecer que o que vale a pena na vida é ter saúde, amigos e a família por perto. Obrigada por lutar tanto e por sempre querer fazer feliz as pessoas ao teu lado. Fica o convite para o nosso segundo salto de paraquedas.

A todos que tornaram este trabalho possível e me apoiaram durante esta jornada meu muito obrigada.

“De um jeito ou de outro, a vida nos oceanos vai achando seu equilíbrio”

Tadeu Schmidt

RESUMO

YWASAKI, Juliana Lima, DSc, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. Diversidade genética e populacional de *Sotalia guianensis* do litoral do Espírito Santo, Brasil. Orientador: Prof. Dr. Leonardo Serafim da Silveira. Coorientador: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta.

Sotalia guianensis é uma das espécies mais conhecidas da família *Delphinidae* que habita a costa brasileira. No entanto, atualmente está classificada pela IUCN como tendo dados insuficientes e pelo ICMBio como vulnerável. Investigações genéticas para a espécie são escassas no Brasil e nenhuma avaliação da população do litoral do Espírito Santo foi realizada até este momento. Por isso este trabalho investigou a diversidade genética e populacional do Boto-cinza nesta região. Um total de 90 espécimes foram analisados por 14 *loci* de microssatélites, multiplexados, com alguns testados ineditamente para a espécie. Para a sexagem, os marcadores ZFY/ZFX e SRY identificaram de forma eficiente uma proporção 3:1 de machos e fêmeas. Todos os marcadores utilizados na genotipagem foram considerados polimórficos e a maioria informativos, com um total de 78 alelos e média de 5,6 por locus. A taxa de sucesso de amplificação foi de 70,6%. Heterozigose observada variou de 0,061 a 0,701 e a heterozigose esperada variou de 0,060 a 0,81. O maior valor de endogamia foi 0,266406. Três *loci* estavam em desequilíbrio de Hardy-Weinberg mesmo com inferência de dados perdidos. Para as avaliações de estruturação, as amostras foram separadas em norte e sul. Foi identificado um $K=2$ por *cluster* Bayesiana, porém sem diferenciação estrutural. A matriz de distância de Nei gerou dois grandes agrupamentos, porém ambos foram compostos por indivíduos da região norte e sul. O índice F de Wrigth identificou o valor total de F_{st} : 0,009871, indicando baixa estruturação. A população de Botos-cinza do Espírito Santo foi considerada não estruturada, compondo um segmento populacional.

Palavras-chave: Boto-cinza, estrutura populacional, sintonia, desequilíbrio gamético.

ABSTRACT

YWASAKI, Juliana Lima, DSc, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2017. Genetic and populational diversity of *Sotalia guianensis* in coast of Espírito Santo, Brazil. Adviser: PhD Leonardo Serafim da Silveira. Co-Adviser: PhD Enrique Medina-Acosta.

Sotalia guianensis is one of the best known species of the Delphinidae family that inhabits the Brazilian coast. However, it is currently classified by the IUCN as insufficient data and by ICMBio as vulnerable. Genetic investigations for the species are rare in Brazil and no studies focused on population at the coast of Espírito Santo exist until this moment, so we investigated the genetic and population diversity of Guiana dolphin. A total of 90 specimens were analyzed by 14 microsatellite *loci*, multiplexed, some of which were tested on this specie for the first time. For sexing, ZFY/ZFX and SRY markers efficiently identified at a 3 males:1 female ratio. All markers used in genotyping were considered polymorphic and informative, with a total of 78 alleles and a mean of 5.6 per locus. The mean success rate of amplification was 70.6%. Observed heterozygosity varied 0.061 to 0.701 and the expected heterozygosity ranged 0.06 to 0.81. The highest value of inbreeding was 0.266406. Three *loci* were in Hardy-Weinberg disequilibrium even when inferring the missing data. For the structuring evaluations the samples were separated in north and south groups. We identified a $K = 2$ per Bayesian cluster, but without structural differentiation. The distance matrix of Nei generated two large groupings, however, both were composed by individuals from the north and south. The Wrigth F indices identified the total value of F_{st} : 0.009871, indicating low structuring. The Guiana dolphin population of Espírito Santo was considered unstructured, composing one population segment.

Keywords: Guiana dolphin, population structure, synteny, gametic disequilibrium.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 19 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 19 |
| 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 4.1. TAXONOMIA..... | 20 |
| 4.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Sotalia guianensis</i> | 21 |
| 4.3. MARCADORES MOLECULARES..... | 24 |
| 4.3.1. Marcadores Microssatélites | 25 |
| 4.4. ESTUDOS POPULACIONAIS COM DELFINÍDEOS..... | 27 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 5.1. ÁREA DE ESTUDO..... | 31 |
| 5.2. COLETA DE MATERIAL..... | 32 |
| 5.3. ANÁLISES GENÉTICAS..... | 32 |
| 5.3.1. Escolha dos Marcadores | 32 |
| 5.3.2. Extração de DNA | 35 |
| 5.3.3. Reação de QF-PCR | 36 |
| 5.3.4. Eletroforese capilar | 37 |
| 5.3.5. Sequenciamento Sanger | 38 |
| 5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 38 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 6.1. AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES..... | 40 |
| 6.2. MULTIPLEXAÇÃO DOS MARCADORES..... | 42 |
| 6.3. SEXAGEM..... | 46 |
| 6.4. DIVERSIDADE GENÉTICA..... | 49 |
| 6.5. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS..... | 55 |
| 6.6. SEQUENCIAMENTO SANGER..... | 60 |
| 6.7. MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO..... | 65 |

| | |
|---|------------|
| 6.8. DESEQUILÍBRIO DE GAMÉTICO E INTENSIDADE DAS ASSOCIAÇÕES INTERALÉLICAS..... | 70 |
| 6.9. ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL..... | 74 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 82 |
| APÊNDICES..... | 105 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa de distribuição da espécie <i>Sotalia guianensis</i> | 22 |
| Figura 2. Espécime de boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>)..... | 23 |
| Figura 3. Área de estudo e pontos de coleta (em vermelho) dos espécimes de <i>Sotalia guianensis</i> no litoral do estado do Espírito Santo..... | 31 |
| Figura 4. Eletroferograma do perfil octaplex, com os marcadores microssatélites Sota-01, Sota-02, Sota-04, Sota-05, Sota-09, Sota-10, Sota-11 e Sota-12, da espécie <i>Sotalia guianensis</i> | 43 |
| Figura 5. Eletroferograma do perfil tetraplex, com os marcadores microssatélites Sota-06, Sota-07, Sota-13 e Sota-14, da espécie <i>Sotalia guianensis</i> | 44 |
| Figura 6. Eletroferograma do perfil bplex da espécie <i>Sotalia guianensis</i> , com os marcadores para identificação de sexo, SRY e ZFY/ZFX..... | 45 |
| Figura 7. Perfil do eletroferograma obtido do sequenciamento do locus microssatélite Sota-10- F, fita foward, da espécie <i>Sotalia guianensis</i> . Possível observar a repetição do dinucleotídeo CA..... | 61 |
| Figura 8. Perfil do Eletroferograma obtido do sequenciamento do locus microssatélite Sota-10-R, fita reverse, da espécie <i>Sotalia guianensis</i> . Possível observar a repetição do dinucleotídeo TG..... | 62 |
| Figura 9. Perfil do Eletroferograma obtido do sequenciamento do locus microssatélite Sota-11-F, fita foward, da espécie <i>Sotalia guianensis</i> . Possível observar a repetição do dinucleotídeo CA..... | 63 |
| Figura 10. Perfil do Eletroferograma obtido do sequenciamento do locus microssatélite Sota-12-F, fita reverse, da espécie <i>Sotalia guianensis</i> . Possível observar a repetição do dinucleotídeo GT..... | 64 |
| Figura 11. Mapa de sintenia para os loci microssatélites da espécie <i>Tursiops truncatus</i> sob o genoma de <i>Bos taurus</i> | 67 |
| Figura 12. Análise bayesiana de agrupamento utilizando o programa Structure. (A) Valores de Delta K para cada valor de K. O maior valor de Delta K corresponde ao K=2 ótimo. (B) Cluster de estrutura, sem divisão clara em agrupamentos..... | 75 |

Figura 13. Dendograma de similaridade pela distância genética de Nei e agrupadas pelo método UPGMA para *Sotalia guianensis* do Espírito Santo, genotipadas por meio de 14 marcadores microssatélites e criada no programa MEGA..... 77

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Identificação e caracterização dos <i>loci</i> microssatélites..... | 34 |
| Tabela 2. Marcadores multiplexados e uniplex, quantidades de primers, fluorescência, temperatura de anelamento, fluorescência e número de ciclos da PCR..... | 37 |
| Tabela 3. Sexo dos espécimes de <i>Sotalia guianensis</i> identificados através dos marcadores ZFY/ZFX e SRY. Macho: M e Fêmea: F..... | 47 |
| Tabela 4. Parâmetros populacionais e diversidade genética dos <i>loci</i> microssatélites genotipados em <i>Sotalia guianensis</i> do litoral do Espírito Santo..... | 50 |
| Tabela 5. Frequência alélica dos espécimes de <i>Sotalia guianensis</i> do litoral do Espírito Santo, obtida através de 14 <i>loci</i> microssatélites..... | 56 |
| Tabela 6. Frequência de alelos privados de <i>Sotalia guianensis</i> , obtidas através de marcadores microssatélites, considerando duas populações dentro do Espírito Santo, sul até o município de Serra e norte a partir de Aracruz..... | 59 |
| Tabela 7. Homologia dos <i>loci</i> microssatélites de <i>Tursiops truncatus</i> sob o genoma de <i>Bos taurus</i> , através da conversão de coordenadas..... | 66 |
| Tabela 8. Associações interloci em desequilíbrio gamético global significativos..... | 70 |
| Tabela 9. Intensidade e significância dos desequilíbrios gaméticos interalélicos..... | 72 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|--|-----|
| Apêndice 1. Local e região de coleta dos espécimes de <i>Sotalia guianensis</i> .. | 105 |
| Apêndice 2. ZFY/ZFX validado em outras espécies, com a ferramenta <i>in-silico</i> PCR da Universidade Califórnia Santa Cruz..... | 107 |
| Apêndice 3. Tabela completa de genótipos de <i>Sotalia guianensis</i> por meio de 14 <i>loci</i> microsatélites..... | 110 |

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem.

°C - Graus Célsius.

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*.

cm – Centímetro.

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

DNAm - DNA mitocondrial.

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*.

Kg – Quilograma.

Km – Quilômetro.

uL – Microlitros.

m – Metro.

mm³ - Milímetros cúbicos.

n – Número.

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*.

NUDIM – Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular.

Pb – Pares de base.

PCR – *Polymerase Chain Reaction*.

PD – Poder de discriminação.

PIC – Conteúdo de informações polimórficas.

QF-PCR – Reação Quantitativa por Fluorescência em Cadeia da Polimerase.

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

rpm – Rotações por minuto.

SRY – *Sex determining region of Chr Y*.

STR – *Short Tandem Repeats*.

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense.

UCSC – Universidade da Califórnia Santa Cruz.

ZFY/ZFX – *Zinc finger protein, Y-linked/ Zinc finger protein, X-linked gene*.

1. INTRODUÇÃO

O boto-cinza, *Sotalia guianensis*, é um cetáceo odontoceto de pequeno porte da família *Delphinidae* (FLORES & DA SILVA, 2009). Distribui-se ao longo da costa atlântica tropical e subtropical da América do Sul e Central. No Brasil, sua ocorrência é até o estado de Santa Catarina (JEFFERSON *et al.*, 2008; FLORES & DA SILVA, 2009). Está classificada atualmente como “dados insuficientes” pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) o que se deve à falta de conhecimento básico sobre os botos-cinza e de estudos sistemáticos sobre as dimensões dos impactos causados por diferentes atividades antrópicas (IBAMA, 2001; REEVES *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2006; JEFFERSON *et al.*, 2008). Em 2014, no Brasil, a espécie foi inserida na lista de espécies ameaçadas de extinção e categorizada como “Vulnerável” (BRASIL, 2014).

Nas últimas décadas, diversos métodos moleculares têm sido aplicados a investigações de variabilidade genética em espécies de cetáceos. No entanto, este tipo de estudo ainda é escasso para *S. guianensis* (CABALLERO *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2010). Para uma melhor compreensão dos processos genéticos em cetáceos, relações populacionais e para caracterizar processos demográficos que influenciam na sua sobrevivência, estas investigações são consideradas fundamentais (MENDEZ *et al.*, 2008). A Comissão Internacional Baleeira recomendou que fossem realizados esforços para a obtenção de amostras e sequenciamento de material genético de todas as espécies, subespécies e estoques possíveis (IUCN, 2012).

Cunha *et al.* (2010) avaliou a distribuição de *S. guianensis* no Brasil através de marcadores mitocondriais, caracterizando pelo menos seis unidades distintas: Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Espírito Santo e Sudeste-sul (Rio de Janeiro a Santa Catarina). Os estudos com cetáceos nesta região são raros e nenhuma avaliação populacional focada em *S. guianensis* foi realizada, sendo considerada como uma única população. Portanto, esta pesquisa buscou analisar geneticamente a diversidade e estrutura populacional da espécie *S. guianensis* da costa do estado do Espírito Santo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética e estruturação populacional de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) ao longo do litoral do Espírito Santo, Brasil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Genotipar os indivíduos amostrados a partir de marcadores microssatélites;
- II. Caracterizar a diversidade genética;
- III. Mapear fisicamente os *loci* microssatélites;
- IV. Verificar desequilíbrios gaméticos e forças de ligação;
- V. Verificar a existência de estruturação populacional.

3. JUSTIFICATIVA

Os cetáceos têm sofrido muito com os impactos antrópicos, podendo sofrer declínios populacionais ou diminuição de fluxo gênico. A avaliação da diversidade genética e de estruturação populacional é essencial para a conservação das espécies de cetáceos e recomendada por diversos órgãos ambientais brasileiros e mundiais, principalmente para as espécies ameaçadas de extinção.

Pouco se conhece sobre a estrutura genética de *Sotalia guianensis*, além do déficit de outras informações biológicas, comportamento e caracterização do habitat, para algumas regiões do Brasil. Portanto, o conhecimento da diversidade genética e populacional dos indivíduos do Espírito Santo será valioso para esta espécie, que se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. TAXONOMIA

Os cetáceos são mamíferos que desenvolveram modificações estruturais no corpo para incremento da eficiência hidrodinâmica, adaptando-se a uma existência totalmente aquática. Além da morfologia, esses animais apresentam uma série de adaptações fisiológicas e comportamentais para a vida na água (DI BENEDITTO *et al.* 2010).

A subordem Cetacea, anteriormente ordem Cetacea se subdividia em duas subordens, os odontocetos e os misticetos (BARNES, 2002). Porém, estudos fósseis e moleculares recentes demonstram alta relação evolutiva entre cetáceos e o grupo dos artiodáctilos, considerados os mamíferos modernos mais próximos do grupo Cetacea (JEFFERSON *et al.*, 2008). Sendo assim, os cetáceos e seus familiares ungulados (artiodáctilos) foram classificados como duas subordens pertencentes à ordem Cetartiodactyla e os odontocetos e os misticetos passaram a constituir duas infraordens da subordem Cetacea (PERRIN, 2013).

Atualmente, 93 espécies de cetáceos são reconhecidas, divididas em dois grandes grupos, os golfinhos e baleias com dentes (odontocetos) e as baleias de barbatanas (misticetos) (PERRIN, 2009). Destas, 16% estão ameaçadas de extinção em algum grau (IUCN, 2015), sendo que para mais da metade das espécies totais, não se tem informações sobre o status de conservação. No Brasil, foram registradas 44 espécies de cetáceos (LODI & BOROBIA, 2013).

A família *Delphinidae* apresenta a maior riqueza de espécies e pertence à infraordem Odontoceti. Os delfínídeos geralmente apresentam o rostro longo e o número de dentes variável, podendo ser de dois até 120 pares. O comprimento total varia de 1,7 a 9,5 m e o peso de 50 a 7.000 kg. A nadadeira dorsal é geralmente evidente, curvada posteriormente e posicionada na porção mediana do corpo na grande maioria das espécies (FELDHAMER *et al.*, 1999).

Foram registrados para o Brasil 13 gêneros de delfínídeos: *Delphinus*, *Feresa*, *Globicephala*, *Grampus*, *Lagenodelphis*, *Lissodelphis*, *Orcinus*, *Peponocephala*, *Pseudorca*, *Sotalia*, *Stenella*, *Steno* e *Tursiops* (JEFFERSON, 1996).

A espécie *S. guianensis* já sofreu algumas alterações taxonômicas. No passado, para o gênero *Sotalia*, até cinco espécies foram abrangidas, três delas encontradas em rios e duas costeiras. Através de análises craniométricas e posteriormente confirmadas pela genética, foi reconhecido que somente duas espécies devem ser consideradas no gênero *Sotalia*, *Sotalia fluviatilis* (Tucuxi), que ocorre na bacia amazônica, e *Sotalia guianensis* (Boto-cinza), marinha e costeira (MONTEIRO-FILHO *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2005; CABALLERO *et al.*, 2007).

4.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Sotalia guianensis*

Sotalia guianensis (VAN BÉNÉDEN, 1864), distribui-se ao longo da costa atlântica tropical e subtropical da América do Sul e Central (Figura 1) (SILVA & BEST, 1996; FLORES & DA SILVA, 2009). O limite mais conhecido do extremo norte está no centro de Honduras em La Mosquitia (EDWARDS & SCHNELL, 2001). No Brasil, ocorre até a Baía norte em Florianópolis, Santa Catarina (SIMÕES-LOPES, 1988). Ocorre também no norte da Nicarágua, na Costa Rica em Gendoca-Manzanillo, e ao longo da costa caribenha do Panamá à Venezuela (ACEVEDO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Na Colômbia, é encontrado no Golfo de Morrosquillo (DUSSÁN-DUQUE *et al.*, 2006), Guiana (HERALD, 1967); Suriname (HUSSON, 1978) e Guiana Francesa (VAN WAEREBEEK, 1990). Um único registro é conhecido de Trinidad e Tobago (VAN BREE, 1975).



Figura 1. Mapa de distribuição da espécie *Sotalia guianensis*.

Não há evidências de grande descontinuidade em sua distribuição, embora não tenha sido observada em algumas áreas ou sua presença seja rara. Além disso, muitas regiões nunca foram pesquisadas (DA SILVA *et al.*, 2010). Apesar de ser distribuída na região costeira, o boto-cinza é comumente encontrado em áreas mais protegidas, como regiões de estuários ou baías (FLACH *et al.*, 2008), e normalmente com águas turvas (FLORES, 2003). A temperatura da água de seu habitat varia de 13° a 32 °C, respectivamente, nas extremidades sul e norte de sua distribuição. (EDWARDS & SCHNELL, 2001; FLORES, 2003).

A preferência do habitat foi determinada por meio da análise parâmetros como: temperatura, profundidade da água, salinidade, distância da costa, relevo do fundo do mar e substrato do fundo do mar (ROSSI-SANTOS *et al.*, 2006; FLACH *et al.*, 2008), indicando áreas a menos de 5 km da costa e baixas profundidades (ROSSI-SANTOS *et al.*, 2006). Seu habitat costeiro está sujeito a atividades antrópicas intensas como pesca, tráfego de barco, exploração de petróleo e desenvolvimento urbano (SANTOS & ROSSO, 2007).

É uma das menores espécies de golfinho, com um tamanho máximo registrado de 2,20 m (FLORES & DA SILVA, 2009), peso máximo de 121 kg (MONTEIRO-FILHO *et al.*, 2002). Sua coloração é cinza-escuro no dorso, rosado ou cinza claro nas porções ventrais, apresentando manchas cinza-claras nas laterais de seu corpo, podendo variar de acordo com sua faixa etária quanto mais jovem, mais rosado no ventre e quanto mais adulto mais cinza na região ventral (JEFFERSON *et al.*, 2008) (Figura 2).



Figura 2. Espécime de boto-cinza (*Sotalia guianensis*). Foto cedida pelo Instituto ORCA.

Não apresenta dimorfismo sexual aparente (LODI, 2003) e possui como característica morfológica marcante uma nadadeira dorsal triangular (FLORES & DA SILVA, 2009). A maturidade sexual ocorre entre os 170 e 175 cm de comprimento nos machos, com idade estimada de sete anos e entre 165 e 170 cm para fêmeas, com idade estimada de seis anos (MONTEIRO-FILHO *et al.*, 2002). A reprodução ocorre durante todo o ano, variando sazonalmente em diferentes localidades (RAMOS *et al.*, 2000). O tempo de gestação é de 11,5 a 12 meses e os filhotes nascem com um comprimento total entre 0,8-1,15 m (JEFFERSON *et al.*, 2008). O intervalo de parto é de cerca de dois anos, podendo ser inferior devido à perda do filhote ou a um menor período de lactação que varia entre seis a 10 meses (MONTEIRO-FILHO *et al.*, 2002).

Seus hábitos alimentares revelam uma alimentação variada em diferentes profundidades, com espécies de peixes pelágicas e demersais, cefalópodes e

crustáceos. Estudos revelam uma grande variedade alimentar, que varia conforme a região e a profundidade (DAURA-JORGE *et al.*, 2011).

São avistados geralmente em grupo pequenos, que podem variar em até 15 indivíduos, podendo também ser encontrados sozinhos (SANTOS & ROSSO, 2007). Contudo, maiores agregações já foram registradas nas baías do estado do Rio de Janeiro, na Baía de Ilha Grande com 450 indivíduos (LODI & HETZEL, 1998), na Baía de Paraty com cerca de 100 indivíduos (LODI, 2003). Em Santa Catarina, na Baía Norte, grupos de mais de 50 indivíduos foram registrados (DAURA-JORGE *et al.* 2005). No complexo estuarino de Paranaguá, os tamanhos dos grupos variaram de dois a 90 indivíduos (SANTOS *et al.*, 2010). Não há informações sobre habitat, tamanho de grupo e outros parâmetros para diversas regiões, como as áreas norte da América do Sul, Caribe e também em regiões brasileiras, como o estado do Espírito Santo.

Atualmente, o Boto-cinza é um dos cetáceos que mais sofre com ameaças antrópicas no Brasil, devido à ocupação da região costeira, perda de habitat, poluição e acidentes nas atividades pesqueiras (CRESPO *et al.*, 2010). Estando, inclusive, presente na lista de espécies ameaçadas de extinção e categorizada como vulnerável, no Brasil (ICMBIO, 2014).

4.3. MARCADORES MOLECULARES

Os pesquisadores estão cada vez mais utilizando métodos indiretos para avaliarem populações, como as análises genéticas. Consequentemente, os métodos modernos de análises moleculares têm desempenhado um papel importante na avaliação dos níveis de estruturação genética entre muitas populações de cetáceos costeiros e oceânicos (FONTAINE *et al.*, 2007).

Os marcadores moleculares são regiões do genoma ou segmentos específicos de DNA, que podem ou não fazer parte de um gene e apresentam um desenvolvimento rápido, sendo amplamente utilizados em vários organismos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Tais marcadores podem ser utilizados para

estimar diversos parâmetros de interesse dos ecologistas, como por exemplo: taxa de migração, tamanho da população, efeito gargalo, entre outros.

As vantagens que alguns 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 são codominantes, promovendo uma maior quantidade de informação genética por locus e utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de pequenas amostras de células ou tecidos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos populacionais, sendo os microssatélites os que mais se destacam entre eles, pois são codominantes, possuem um grande número de alelos (BUCHANAN *et al.*, 1996) e se distribuem amplamente no genoma (FARRO, 2006).

4.3.1 Marcadores Microssatélites

O microssatélite ou STR (*Short Tandem Repeats* - sequências curtas repetidas em tandem) é uma classe de marcadores no DNA genômico que possui padrão de herança mendeliana. Pode apresentar um alto grau de polimorfismo, o que permite a identificação de diversos alelos (VOWLES & AMOS, 2004).

São sequências de uma a seis bases repetidas em tandem e estão presentes no genoma de procaríotos e eucaríotos, em menor ou maior abundância, podendo ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes do genoma (TOTH *et al.*, 2000). Em mamíferos, as repetições mais comuns são as de dinucleotídeos (ROHRER *et al.*, 1994).

Antes da descoberta de microssatélites, o estudo da variação genética em cetáceos predominantemente se baseou em diferenças de aloenzimas e DNAmT (ÁRNASON & GULBERG, 1994). Tanto as aloenzimas como a análise RFLP do DNAmT apresentam heterozigose relativamente baixa em comparação com os *loci* microssatélites, que exibem alta heterozigose devido a uma elevada taxa de mutação (WEISSENBACH *et al.*, 1992; BUCHANAN *et al.*, 1994).

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

O polimorfismo dos microssatélites é oriundo de eventos que causam o deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante o processo de replicação, responsável pela elevada taxa mutacional (ELLENGREN, 2004). Neste evento durante a replicação de uma região microssatélite, as fitas de DNA se separam e se associam de forma incorreta, o que gera cópias com diferentes tamanhos ou números de repetições, seja pela inserção ou deleção de unidades (BARBOSA, 2010). O tamanho do alelo e o tipo de repetição influenciam nos padrões de adições e exclusões de bases, sendo que alelos maiores são mais propensos a mutação e por isso exibem um número maior de polimorfismo (BUSCHIAZZO & GEMMELL, 2006).

Uma de suas características é a conservação dos microssatélites entre espécies de um mesmo gênero (MOHINDRA *et al.*, 2005). Para os cetáceos e delfinídeos, esta conservação permite que os marcadores desenvolvidos sob o genoma de uma determinada espécie possam ser utilizados em outras (marcadores heterólogos) com proximidade filogenética (SCHOLOTTERER *et al.*, 1991; DAKIN & AVISE, 2004). A disponibilidade de primers para microssatélites desenvolvidos especificamente em algumas espécies de cetáceos é ainda restrita, como é o caso da *S. guianensis*, sendo comum estudos com a utilização de primers heterólogos.

Diversos estudos já demonstraram o uso de marcadores heterólogos e confirmaram o sucesso de amplificação em espécies cruzadas (CALDWELL *et al.*, 2002; BUCHANAN *et al.*, 2003; COUGHLAN *et al.*, 2006; MIRIMIN *et al.*, 2006; FRASIER *et al.*, 2006), inclusive para a espécie *S. guianensis* (GRAVENA *et al.*, 2009; HOLLATZ *et al.*, 2011).

Os microssatélites podem ser aplicados em diferentes tipos de estudos: filogenéticos, forenses, de paternidade, genética de populações, conservação e manejo dos recursos biológicos. Eles têm sido adotados amplamente em estudos genéticos de espécies de cetáceos, contribuindo para a investigação das populações (COUGHLAN *et al.*, 2006). A facilidade na obtenção de microssatélites combinada com os altos níveis de heterozigose indicam claramente que esses marcadores têm

grande potencial como marcadores para a genética populacional (BUCHANAN *et al.*, 2003).

4.4. ESTUDOS POPULACIONAIS COM DELFINÍDEOS

A imensa escala dos oceanos, sua conectividade e dinamismo, tornam a conservação marinha uma questão desafiadora, somado a logística e processos jurisdicionais (SLOAN, 2002). O desenvolvimento urbano nas regiões costeiras exercem grande pressão nos ecossistemas marinhos (IPCC, 2002).

As espécies de cetáceos estão constantemente expostas a impactos causados pelos homens, por serem vulneráveis a variações de habitat e diretamente afetadas pelas atividades pesqueiras, como a captura acidental (CURREY *et al.*, 2009; REEVES *et al.*, 2013). Diferenças genéticas e estruturações podem ocorrer naturalmente em populações livres, como resultado da interação de fatores biológicos, ambientais e comportamentais, além das interferências antrópicas (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Algumas espécies, como *T. truncatus*, são capazes de movimentos ao longo de várias centenas de quilômetros, mas as estimativas de alcance variam muito entre populações e indivíduos, sendo provavelmente influenciadas pela disponibilidade de recursos no ambiente (DEFRAN *et al.*, 1999). A observação direta de padrões de cruzamento e separação de grupos é considerada extremamente difícil para a maioria das espécies de cetáceos (PARSONS *et al.*, 2006), limitadas ainda pela dificuldade de estudos contínuos e pela incompreensão de barreiras identificadas por meio de fluxo gênico (ROSEL *et al.*, 1995).

As análises genéticas são uma importante fonte para a avaliação da diversidade genética de cetáceos com risco de extinção, investigações de estruturação, dinâmica populacional, incertezas taxonômicas e definição de unidades de manejo (BAKER *et al.*, 2013; FRUET *et al.*, 2014). Além disso, podem auxiliar nos estudos biológicos e comportamentais de cetáceos, como padrões de estruturação, de acasalamento, relações de parentesco e proporções sexuais (CYPRIANO-SOUZA *et al.*, 2010). Com o aperfeiçoamento e o uso generalizado de métodos moleculares

modernos, um número crescente de estudos tem sido capaz de detectar discretos padrões de estrutura em populações (ANSMANN *et al.*, 2012).

Para *S. guianensis*, no Brasil, somente duas avaliações genéticas foram realizadas: Cunha *et al.* (2010), através de marcadores mitocondriais identificaram 6 unidades de manejo para a costa brasileira entre os estados do Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Espírito Santo e na área Sudeste-sul (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina); e Hollatz *et al.* (2011), que avaliaram as populações das Baías de Sepetiba e Paraty e não encontraram diferenças significantes para os indivíduos destas regiões. Na região norte da América Sul e Caribe, Caballero *et al.* (2007), propuseram duas unidades significativas, uma para a área de Colômbia e Venezuela e outra para a Guiana, Suriname e Guiana Francesa.

Para outras espécies em outras regiões, mais investigações foram realizadas, como o estudo de estrutura genética populacional realizado em populações oceânicas e costeiras de *T. truncatus*, juntamente a dados morfológicos, no qual, Segura *et al.* (2006) chegaram à conclusão de que na Califórnia existem diferenças nestas populações, talvez devido ao isolamento recente ou ao fluxo genético, sendo esta uma importante informação para apoiar medidas de decisão de gestão e conservação, uma vez que a procura por esta espécie protegida está crescendo nos mercados mexicanos.

Natoli *et al.* (2007) realizaram um estudo sobre o impacto das redes de captura de tubarões na África do Sul na população costeira e oceânica de *T. aduncos*. Neste estudo, foram utilizados marcadores mitocondriais e nucleares. Os autores concluíram que, considerando as elevadas taxas de captura acidental nestas redes, juntamente com o baixo nível de diversidade genética e com as evidências de possível diferenciação genética entre populações costeiras, seria aconselhável retirar as redes de capturas de tubarões.

Chen *et al.* (2010), com objetivo de auxiliar na conservação e manejo do boto *Neophocaeca phocaenoides* da região do Indo-Pacífico, na China, analisou, através de dez *loci* microssatélites, a estrutura genética em três regiões (Rio Yangtze, Mar Amarelo e Mar Meridional da China), sugerindo que os botos habitantes destas águas poderiam ser tratados como unidades distintas, importante para o manejo e implementação de programas de conservação.

Espera-se que espécies marinhas altamente móveis em áreas sem claras barreiras geográficas assumam baixos níveis de diferenciação genética. No entanto, a variação em pequena escala no habitat pode levar a variação de recursos e estimular a diferenciação local por divergência adaptativa (ANSMANN *et al.*, 2012). Estudos recentes mostraram que algumas espécies altamente móveis, com distribuições contínuas de habitat, podem exibir uma estrutura populacional significativas (VIRICEL *et al.*, 2014).

Ansmann *et al.* (2012) mencionaram que, apesar da alta capacidade de movimentação a longa distância e padrões de variação não constantes, encontraram estruturação genética distinta na Baía de Moreton, Austrália, entre *T. truncatus* costeiros em uma área geográfica relativamente pequena e sem barreiras ambientais claras à dispersão. Os resultados demonstraram o uso diferencial de habitat e indicaram um padrão nomeado de “isolamento por distância ambiental”, sendo que o uso preferencial de habitat parece ter sido determinado artificialmente pelos tipos de atividade pesqueira, levando a uma divisão em comunidades sociais, que nunca foram observadas em interação. Esses impactos humanos mostraram ter uma gama de efeitos sobre a composição de grupos sociais (RUTLEDGE *et al.*, 2010) e sobre o comportamento social (STERCK, 1998) de uma variedade de espécies. Ansmann *et al.* (2012) concluiu que a estruturação social e genética dentro e entre grupos simpátricos de *T. truncatus* é impulsionada por uma variedade complexa de fatores inter-relacionados que podem incluir variação de habitat local, disponibilidade de recursos, uso diferencial de nicho, aprendizagem social e distúrbios antropogênicos.

Outros estudos em grandes escalas geográficas com populações de diferentes regiões foram realizados (ROSEL *et al.*, 2009; ANSMANN *et al.*, 2012), com a utilização de marcadores microssatélites, que aumentou consideravelmente o potencial de compreensão da estrutura da população em grandes e pequenas escalas geográficas (CHEN *et al.*, 2010).

No Chile, Perez-Alvarez *et al.* (2015) identificaram duas populações de golfinhos chilenos, altamente diferenciadas entre a região norte e a região sul, onde aparentemente não há barreiras geográficas nos seus mais de 6000 km de litoral, sendo proposto que a diferenciação encontrada pode ser reflexo de distintas adaptações ecológicas, como o habitat e uso de recursos.

Hartl & Clark (2010) citam que as variações na genética populacional podem sofrer interferências de fatores que delineiam estruturas, como a deriva genética, o fluxo gênico, a mutação e a seleção. Afirmam também que quanto maior for a deriva, as mutações e a seleção, maior será a estruturação genética. E quanto mais acentuado for o fluxo gênico, menor a probabilidade de estruturação populacional.

Muitos autores que identificaram estrutura genética em populações de cetáceos associaram a diferenciação a diversos fatores, como disponibilidade de recursos ou habitats em pequenas distâncias geográficas (MÖLLER *et al.*, 2007; MENDEZ *et al.*, 2010), a características oceanográficas como correntes, salinidade ou temperatura (NATOLI *et al.*, 2005; BILGMANN *et al.*, 2007; MENDEZ *et al.*, 2010 e MÖLLER *et al.*, 2011), o comportamento social (STORZ, 1999), entre outros.

O acompanhamento da diversidade genética é tão crucial para a preservação das espécies que a IUCN considera uma das prioridades globais para a conservação, devido aos processos ambientais contínuos e a diversidade estar associada a perpetuação de uma espécie (IUCN, 2012).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDO

O estado do Espírito Santo localiza-se no sudeste do Brasil, sendo todo seu limite leste banhado pelo Oceano Atlântico, dispondo de uma costa com aproximadamente 436 km de extensão. A área de abrangência do estudo compreendeu toda a extensão do estado, com limite norte no município de Conceição da Barra ($18^{\circ}35'34''\text{S } 39^{\circ}43'55''\text{W}$) até o extremo sul em Presidente Kennedy ($21^{\circ}05'56''\text{S } 41^{\circ}02'48''\text{W}$). Os locais e regiões de coleta dos espécimes estão indicados no mapa (Figura 3) (Apêndice 1).



Figura 3. Área de estudo e pontos de coleta (em vermelho) dos espécimes de *Sotalia guianensis* no litoral do estado do Espírito Santo. Linha tracejada representando a divisão entre região norte e sul.

5.2. COLETA DE MATERIAL

Foram coletados 90 exemplares de *S. guianensis* provenientes de encalhes no litoral do estado do Espírito Santo, durante o período de 2004 a 2014. As coletas dos espécimes foram realizadas pelo Instituto Organização e Consciência Ambiental - ORCA, com bases nos municípios de Guarapari e Vila Velha, ES.

Os animais encalhados nas praias eram transportados para a sede do Instituto ORCA, onde se realizavam as necropsias e coletas de fragmentos de tecido muscular para as análises moleculares. Os fragmentos foram congelados ou acondicionados em tubos com etanol 70% e armazenados a -20 °C.

5.3. ANÁLISES GENÉTICAS

5.3.1. Escolha dos Marcadores

Realizou-se uma busca na literatura de primers microssatélites desenvolvidos e testados em cetáceos, com foco nos delfinídeos. Os marcadores foram avaliados de acordo com os parâmetros heterozigose, número de alelos, tamanho em pares de base, amplificação positiva pela ferramenta online *In-Silico* PCR (*University of California Santa Cruz - KENT et al., 2002*) e Primer-BLAST (*National Center for Biotechnology Information – NCBI - YE et al., 2012*).

Foram escolhidos 14 marcadores microssatélites (Tabela 1). Destes, somente cinco foram desenhados sob o genoma de *S. guianensis* (CUNHA & WATTS, 2007). Dos outros nove marcadores heterólogos, cinco não haviam sido testados anteriormente em *S. guianensis* (ROSEL *et al., 2005*), sendo amplificados pela primeira vez neste estudo.

Para a sexagem dos espécimes foram escolhidos os genes ZFY/ZFX e SRY (Tabela 1), presentes nos cromossomos sexuais. SRY oriundo de Richard *et al.* (1994). Para o desenho dos primers de ZFY/ZFX foram utilizados os programas livres e online: *OligoPerfect™ Designer* da *Invitrogen™* e o *OligoCalc - Oligonucleotide*

Properties Calculator. O ZFY/ZFX foi validado em outras espécies (Apêndice 2), por meio da ferramenta *In-Silico* PCR.

Tabela 1. Identificação e caracterização dos *loci* microssatélites.

| Locus | Referência | Faixa de amplimer (pb) ^a | Repetição ^a | PCR <i>In-Silico</i> (pb) ^b | Número de repetições - NCBI ^c | Sequência primer - Foward | Sequência primer - Reverse |
|--------------|--|--|---|---|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| Sota-01 | Sgui-005 Cunha & Watts (2007) | 131-139 | [GT] ₁₉ | 135 | 17 | AGCACAAATCACAACGAAGACC | TTGCCTCAGTTCAGGAAGCC |
| Sota-02 | Sgui-006 Cunha & Watts (2007) | 210-215 | [GT] ₂₁ | 207 | 21 | CTATGATGGACGGTTGAAGG | TCTCTTGGTCATTGCCTTCC |
| Sota-03 | Sgui-011 Cunha & Watts (2007) | 398-446 | [GT] ₂₆ | 409 | 24 | ACAGAGAAGCAAGTGGGAAACC | TTCCCCGCCACTAAGATTCC |
| Sota-04 | Sgui-017 Cunha & Watts (2007) | 150-166 | [CA] ₂₂ | 154 | 22 | GTGGTGGAGTAGAGGATAGG | ACATTGGGCTTCAACGCACG |
| Sota-05 | Sgui-018 Cunha & Watts (2007) | 234-252 | [GT] ₂₉ | 246 | 29 | CTGGAAAAAGAGTAGTTGGC | GTGCAAGACCTCAAAATCC |
| Sota-06 | Ig10A1 Gravena <i>et al.</i> (2009) | 239-265 | (([CT] ₁₁ CC[CT] ₁₂) | 244 | (([CT] ₁₁ CC[CT] ₁₂) | GGGCGAGAAAAGGGTCAA | GGGTCCCCTACTATCCTTT |
| Sota-07 | Ig8H1 Gravena <i>et al.</i> (2009) | 295-307 | (([CT] ₆ [GT] ₂₀ [GA] ₁₈ CA[GA] ₃ CA[GA] ₂ CA[GA] ₅) | 197 | (([CT] ₆ [GT] ₂₀ [GA] ₁₈ CA[GA] ₃ CA[GA] ₂ CA[GA] ₅) | TGTTGCTGCTTTTACTGTGA | CAGATACTGTGAAGGAATGA |
| Sota-08 | GATA98 Hollatz <i>et al.</i> (2011) | 92-134 | [GATA] _n | 89 | 11 | TGTACCCTGGATGGATAGATT | TCACCTTATTTTGTCTGTCTG |
| Sota-09 | Ttru AAT44 Caldwell <i>et al.</i> (2002) | 92 | [AAT] _n | 89 | 10 | CCTGCTCTTCACTCCCTCACTAA | CGAAGCACCAACAAGTCATAGA |
| Sota-10 | Ttr11 Rosel <i>et al.</i> (2005) | 193-223 | [CA] ₂₁ | 212 | 23 | CTTTCAACCTGGCCTTTCTG | GTTTGGCCACTACAAGGGAGTGAA |
| Sota-11 | Ttr19 Rosel <i>et al.</i> (2005) | 171-213 | [CA] ₁₇ | 185 | 16 | TGGGTGGACCTCATCAAATC | GTTTAAGGGCTGTAAGAGG |
| Sota-12 | Ttr63 Rosel <i>et al.</i> (2005) | 83-151 | [CA] ₃₄ | 132 | 34 | CAGCTTACAGCCAAATGAGAG | GTTTCTCCATGGCTGAGTCATCA |
| Sota-13 | TtrFF6 Rosel <i>et al.</i> (2005) | 155 –159 | [CA] ₂₀ | 154 | 20 | AAGTAAGTGCTCCTTTGACTGG | GTTTGGCAGAGAGATATTAGGACAG |
| Sota-14 | TtrRC11 Rosel <i>et al.</i> (2005) | 145-151 | [CT] ₁₆ | 148 | 16 | CACTTATACCTCTGGAATC | ACATAGACTGGATTTGTCC |
| SRY | - Richard <i>et al.</i> (1994) | 154 | não aplicável | 154 | não aplicável | TGTGGTCTCGTGATCAAAGG | TGCATGGCTCGTAGTCTCTG |
| ZFY/ZFX | - Este estudo | 220/223 | não aplicável | 225 | não aplicável | CCCAGATGATGTTTAGCTTCTG | TTGGCATCTAGACTGCTTCA |

a Conforme relatado na literatura.

b Tamanho do amplimer a partir do banco de dados de sequências nucleotídicas.

c A partir das sequências indicadas na coluna PCR *In-Silico*.

5.3.2. Extração de DNA

A etapa de extração de DNA genômico foi realizada no Laboratório de Genética da Conservação da Universidade Federal do Espírito Santo, campus São Mateus, em parceria com a professora Ana Paula Cazerta Farro.

Para a extração foi utilizado um protocolo de extração salina (BRUFORD *et al.*, 1992).

Um pequeno pedaço de tecido muscular de aproximadamente 3 mm³ foi picotado e colocado em microtubo de 1,5 ml com solução de lise: 410 µL de tampão de extração (0,5mL de Tris 1M, 1,0mL de NaCl 5M, 1,0mL de EDTA 0,5M e 47,5mL de ddH₂O), 80 µL de SDS 10% e 10 µL de proteinase K. Esta solução foi deixada no banho seco a 55 °C durante a noite toda para digestão, totalizando uma média de 14 horas. Passado este tempo de digestão, a solução foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos na centrífuga Hettich MIKRO 120, e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 ml, no qual foram adicionados 180 µL de NaCl (5M). A solução foi invertida 50 vezes para homogeneização e centrifugada novamente a 13000 rpm por 5 minutos. Depois disso, o sobrenadante transferido para um tubo de 1,5 ml contendo 1 mL de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 13000 rpm por 7 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante. Foi adicionado 250 µL de etanol 80% e a solução invertida por 50 vezes. Em seguida, centrifugou-se na mesma condição anterior. O sobrenadante foi descartado novamente, adicionado 250 µL de etanol 80% e a solução invertida e centrifugada na mesma condição anterior. Depois disso, o sobrenadante foi descartado. Todo o álcool foi removido colocando os tubos invertidos em um pedaço de papel e em seguida no banho seco a 55°C por aproximadamente 10 minutos. Por fim, o DNA foi ressuscitado com a adição de 50 µL de ddH₂O e armazenado a -20 °C.

O DNA extraído foi submetido à quantificação utilizando os aparelhos de espectrofotometria Nanodrop - ND200, Uniscience e NanoDrop 2000c™ - (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

5.3.3. Reação de QF-PCR

A reação quantitativa fluorescente em cadeia de polimerase (QF-PCR) foi realizada no aparelho termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para a multiplexação dos marcadores, foram realizados testes de amplificação, observando o tamanho dos fragmentos e as fluorescências, para que durante a análise os picos amplificados não se sobrepusessem. Os marcadores que amplificaram em conjunto foram balanceados variando as concentrações de cada primer do multiplex, objetivando a melhor leitura dos genótipos (Tabela 2).

A concentração de DNA utilizada na amplificação variou por amostra, sendo que a alíquota de aproximadamente 20 ng de DNA foi tipicamente determinada como padrão. Quando os resultados da amplificação não eram satisfatórios, uma concentração maior era utilizada, variando até 100 ng. Foi realizado um teste de curva de concentração de DNA e qualidade da amplificação, observando que a concentração de DNA > 100 ng não variava significativamente os resultados da amplificação.

As reações foram realizadas com os seguintes reagentes: 5 µL de Tampão de reação (0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂), completando com H₂O para o volume final de 5,0 µL), 0,5 U de Taq polimerase, 2,0 µL de DNA genômico (aproximadamente 20ng de DNA), primer (volume variável, Tabela 2), e água ultrapura completando o volume final em 12,5 µL.

As condições de amplificação da PCR foram: 11 minutos a 95°C para ativação da enzima Taq polimerase, 1 minuto a 95°C para separar a fita, 1 minuto na temperatura ideal de anelamento, variável por marcador, 1 minuto a 72°C, com extensão final a 60°C por 60 minutos. As temperaturas de anelamento foram testadas para melhor análise e diminuição de amplificações inespecíficas. As combinações dos marcadores, quantidade de primers, fluorescência, temperatura de anelamento e número de ciclos estão dispostos na Tabela 2, com os resultados da multiplexação.

Tabela 2. Marcadores multiplexados e uniplex, quantidades de primers, fluorescência, temperatura de anelamento, fluorescência e número de ciclos da PCR.

| | Primer | Concentração (µM) | Fluorescência | Temp. anelamento °C | Ciclos |
|-------------|---------|-------------------|---------------|---------------------|--------|
| Multiplex 1 | Sota-01 | 0,48 | NED | 58 | 30 |
| | Sota-02 | 0,8 | FAM | | |
| | Sota-04 | 0,48 | FAM | | |
| | Sota-05 | 0,8 | PET | | |
| | Sota-09 | 0,16 | VIC | | |
| | Sota-10 | 0,8 | NED | | |
| | Sota-11 | 0,8 | PET | | |
| Multiplex 2 | Sota-12 | 0,80 | PET | 58 | 36 |
| | Sota-06 | 2,4 | VIC | | |
| | Sota-07 | 1,6 | NED | | |
| | Sota-13 | 1,6 | VIC | | |
| Biplex | Sota-14 | 2,4 | PET | 59 | 30 |
| | SRY | 1,6 | PET | | |
| Uniplex | ZFY/ZFX | 1,6 | FAM | 58 | 30 |
| | Sota-03 | 0,8 | FAM | | |
| Uniplex | Sota-08 | 0,8 | FAM | 58 | 30 |

5.3.4. Eletroforese capilar

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese capilar de alta performance no sequenciador automático *ABI 310* (Applied Biosystems), utilizando o polímero POP 4 (4% de acrilamida), calibrada com a *Matrix Standard Set DS-33* (Applied Biosystems). Em tubos de 500 µL foram adicionadas alíquotas de 0,55 µL do produto de amplificação da PCR de cada amostra, 9,0 µL de formamida *Hi-Di™ Formamide* e 0,1 µL do peso molecular *GeneScan™ 500LIZ® Size Standard*, marcado com fluoróforo LIZ™ (fluorescência laranja). Os perfis alélicos foram analisados na plataforma GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems).

5.3.5. Sequenciamento Sanger

Foram escolhidos 4 *loci* para o sequenciamento, não testados previamente na espécie *S. guianensis*. Sota-10, Sota-11, Sota-12 e Sota-13. Os *loci* foram amplificados em uniplex, com primers *forward* e *reverse* não marcados com fluorescência. As condições da PCR foram as mesmas utilizadas na genotipagem de cada locus. Os marcadores Sota-10 e Sota-13 foram sequenciadas em ambas as fitas, e Sota-11 e Sota-12 somente a fita *forward* foi sequenciada.

Os produtos da PCR foram purificados com EXOSAP-IT (Affymetrix) e encaminhados para a empresa Helixxa (<http://www.helixxa.com.br/pesquisa.php>), que realizou o sequenciamento. A empresa realizou o sequenciamento Sanger, seguindo protocolo próprio. O resultado foi enviado em arquivo ABIF e analisado no programa UGene.

5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os índices descritores populacionais e de diversidade genética, como o número de alelos por locus (N_a), frequência mínima e máxima, heterozigose observada (H_o), heterozigose esperada (H_E), conteúdo de informação polimórfica (PIC), poder de discriminação (PD), foram calculados pelo programa Power Stat v.12, extensão do Excel (TEREBA, 1999).

Testes para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (teste exato de Fisher 30.000 iterações e correção Holm-Sidak) e desequilíbrio de ligação global foram calculados através do software DGA 1.0 (LEWIS & ZAYKIN, 2001). A frequência e a intensidade do desequilíbrio interalélico foram determinadas com o MIDAS v.1 (*Multiallelic Interallelic Disequilibrium Analysis Software*) (GAUNT *et al.*, 2006), que estimou-se a força dos desequilíbrios interalélicos, com correção de Yates (teste qui quadrado), restringindo a análise para valores de $p < 0,05$, de acordo com a metodologia descrita em Machado *et al.* (2011) e fórmulas de Zapata *et al.* (2001).

Os genótipos dos indivíduos foram comparados a fim de se verificar a presença de reamostragem com o programa CERVUS v. 3.1 (KALINOWSKI *et al.*, 2007).

Nas análises da estruturação populacional foram utilizados os índices F de Wright, Bootstrapping para F_{ST} (30.000 repetições aleatórias e intervalo de confiança de 95%, assumindo EHW) e alelos privados, calculados com o software DGA (LEWIS & ZAYKIN, 2001). A análise de *cluster* bayesiana estimou o número mais provável de *clusters* (K) pelo programa Structure (EARL & VONHOLDT, 2012), o modelo foi executado com o número provável de clusters (K) ajustados para valores de 1 a 10, com 50 repetições, usando um período de burn-in de 100.000 iterações seguido de 500.000 iterações de Monte Carlo (MCMC) de cadeia de Markov, que gerou um gráfico de estruturação. A distância Nei foi calculada pelo software GeneAlex 6.5, extensão do excel (PEAKALL, & SMOUSE, 2006) utilizando a matriz de distância para entrada no programa MEGA V7.0.14 (TAMURA *et al.*, 2011), gerando um dendograma pelo método de agrupamento de pares com média aritmética não ponderada (UPGMA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES

Todos os primers funcionaram para *S. guianensis* e apresentaram uma média de sucesso de amplificação de 70,6%. O número amostral variou por marcador, sendo o Sota-06 o locus de menor número amostral, com 44 indivíduos e Sota-04 o maior com 79 indivíduos, totalizando 90 espécimes.

Admitiu-se que a quantidade de DNA insuficiente em algumas amostras foi possivelmente o motivo da não amplificação de um ou outro marcador, principalmente para aqueles marcadores multiplexados; efeito do alto nível de decomposição das carcaças utilizadas ou mal acondicionamento das amostras mais antigas da coleção, dificultando assim a obtenção de um DNA em quantidades e qualidade significativa, além de muito variáveis, para todos os marcadores através da metodologia de extração salina de DNA genômico.

Outros métodos, como kits de extração de DNA comerciais para amostras degradadas ou fenol-clorofórmio, podem ser um diferencial na obtenção de DNA genômico de melhor qualidade para as análises. Budowle & Brown (2001) confirmaram que a extração por fenol-clorofórmio, considerado um método tradicional, garante uma purificação superior a outros embora seja considerado trabalhoso e demorado, o que requer maior técnica em seu desenvolvimento.

Em diversos estudos é possível observar uma diferença no número amostral total e o número de indivíduos genotipados para cada marcador, inclusive nos autores com primers utilizados neste trabalho, como Rosel *et al.* (2005), Gravena *et al.* (2009) e Hollatz *et al.* (2011). Diferentes metodologias de extração de DNA genômico, condições da PCR, características dos marcadores, conservação do DNA, entre outros fatores, podem resultar em variações nas amostras amplificadas por locus.

Primers são inicialmente desenvolvidos para específicas espécies, com objetivo de estudos direcionados. Contudo, os mesmos podem ser utilizados em outras espécies. A amplificação bem sucedida em espécies cruzadas de cetáceos fornece evidências de sequências de DNA conservadas nas regiões flaqueadoras dos microssatélites (VALSECCHI & AMOS, 1996). Caldwell *et al.* (2002)

desenvolveram oito *loci* polimórficos de microssatélites de *T. truncatus* do noroeste do Atlântico. Estes mesmos primers foram utilizados com sucesso em *Cephalorhynchus commersonii*, *Delphinus delphis*, *Delphinapterus leucas*, *Eschrichtius robustus*, *Globicephala macrorhynchus*, *Lagenorhynchus obliquidens*, *Orcinus orca*, *Steno bredanensis* e *Stenella clymene*. Buchanan *et al.* (2003) desenvolveram 15 microssatélites de uma baleia Beluga (*D. leucas*), com o objetivo de estudar as populações canadenses. Todos os primers foram polimórficos para beluga e testados também em outros espécimes, *Monodon monoceros*, *Phocoenoides dalli*, *Phocoena phocoena*, *O. orca*, *L. albirostris*, *L. obliquidens*, *Orcaella brevirostris*, *G. melas*, *Pseudorca crassidens*, *Balaenoptera physalus*, *Megaptera novangliae*, *E. robustus*, *Balaena mysticetus*, *Physeter macrocephalus* e *Mesoplodon bidens*. Com exceção da família *Monodontidae*, *D. leucas* e *M. monoceros* que amplificaram 100% dos *loci*, as outras espécies amplificaram em média 75% dos marcadores. Coughlan *et al.* (2006) isolaram 13 *loci* de microssatélites a partir da espécie *D. delphis*, mais conhecido como golfinho comum. Todos os *loci* foram testados em outras espécies, *Stenella coeruleoalba*, *P. phocoena*, *L. acutus* e *T. truncatus*, mostrando polimorfismo na maioria das combinações. Mirimin *et al.* (2006) isolaram cinco microssatélites tetranucleotídeo para *S. coeruleoalba* e testaram em outras espécies, amplificando com sucesso em *L. acutus*, *T. truncatus* e *P. phocoena*. Frasier *et al.* (2006) desenvolveram uma biblioteca genômica para identificar microssatélites tetranucleotídeo de baleia Franca, *Eubalaena glacialis*, do Atlântico Norte. Dezesesseis *loci* caracterizados foram polimórficos, sendo 12 para as baleias Francas do Atlântico Norte e 15 para as Francas do Atlântico Sul (*Eubalaena australis*). Posteriormente estes *loci* foram combinados com outros 21 para análises de populações destas espécies.

Todos os testes de amplificação dos primers heterólogos são realizados com objetivo de serem úteis em estudos de outras espécies de cetáceos (COUGHLAN *et al.*, 2006). Presumindo que quanto mais próximas evolutivamente as espécies estejam, maior o número de marcadores microssatélites transferidos, devido à uma maior homologia dos genomas. Desta forma, a transferibilidade dos marcadores entre espécies pertencentes ao mesmo gênero geralmente é maior do que espécies de gêneros ou famílias diferentes (BARBARÁ *et al.*, 2007).

6.2. MULTIPLEXAÇÃO DOS MARCADORES

Com o objetivo de reduzir o número de genotipagens, os custos com reagentes e o tempo gasto nos experimentos, sistemas de genotipagem chamados de multiplex têm sido desenvolvidos (GUICHOUX *et al.*, 2011). Este sistema que se baseia na amplificação ou detecção simultânea de vários *loci* em uma única reação de PCR ou corrida de eletroforese, possui como principais vantagens a redução no tempo de genotipagem de um grande número amostral, produção de dados precisos com a adição de marcadores controles, além da fácil aquisição, armazenamento, manipulação e exportação dos dados (BRONDANI *et al.*, 2007).

A partir do tamanho dos fragmentos disponibilizados na literatura e a combinação das cores dos fluorocromos foi realizada uma série de testes, combinando os marcadores, equilibrando as quantidades de primers e reagentes da PCR e a temperatura de anelamento. As composições permitiram que os fragmentos amplificados com os mesmos fluorocromos não se sobrepusessem, facilitando a leitura dos resultados, diminuindo o número de análises e os gastos com reagentes. Na tabela 2, sessão metodológica estão dispostos todos os marcadores utilizados, as multiplexações e também as reações uniplex, quantidades de primers, fluorescência utilizada para cada, temperaturas de anelamento e o número de ciclos da PCR.

A multiplexação resultou em um octaplex (Figura 4), um tetraplex (Figura 5) e um bplex para a análise do sexo (Figura 6).

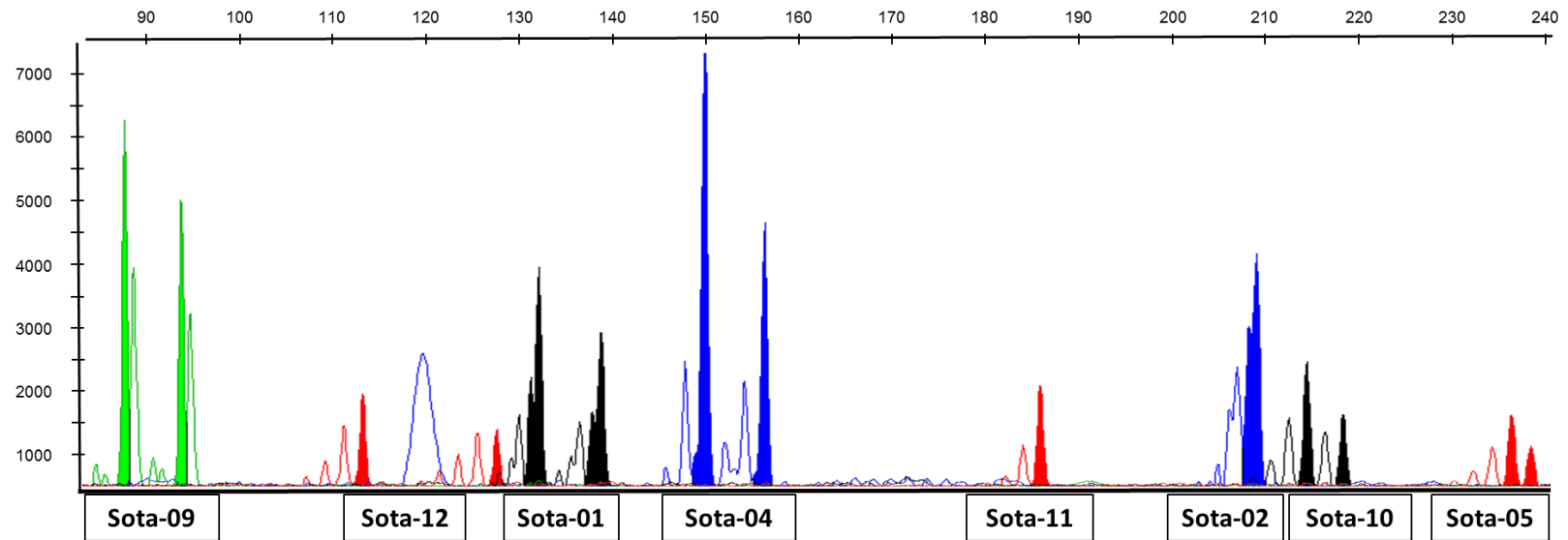


Figura 4. Eletroferograma perfil octaplex, com os marcadores microssatélites Sota-01, Sota-02, Sota-04, Sota-05, Sota-09, Sota-10, Sota-11 e Sota-12, da espécie *Sotalia guianensis*. Gerado na plataforma GeneMapper ID v3.2 Applied Biosystems.

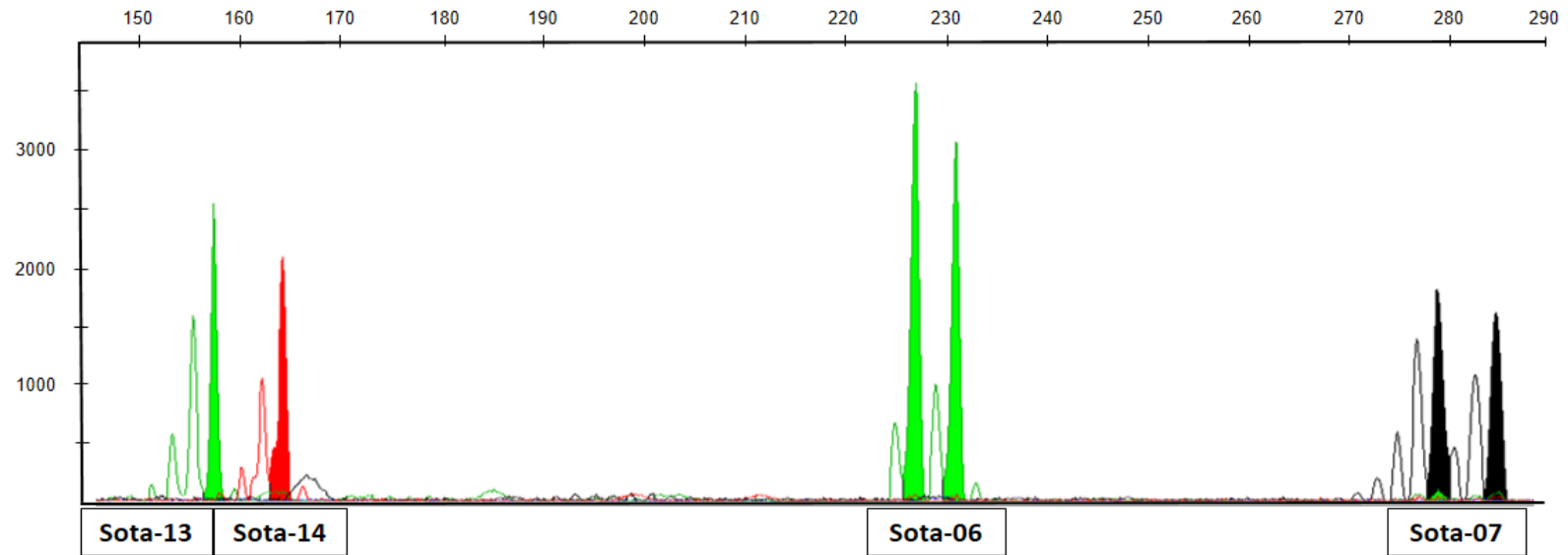


Figura 5. Eletroferograma do perfil tetraplex, com os marcadores microssatélites Sota-06, Sota-07, Sota-13 e Sota-14, da espécie *Sotalia guianensis*. Gerado na plataforma GeneMapper ID v3.2 *Applied Biosystems*.

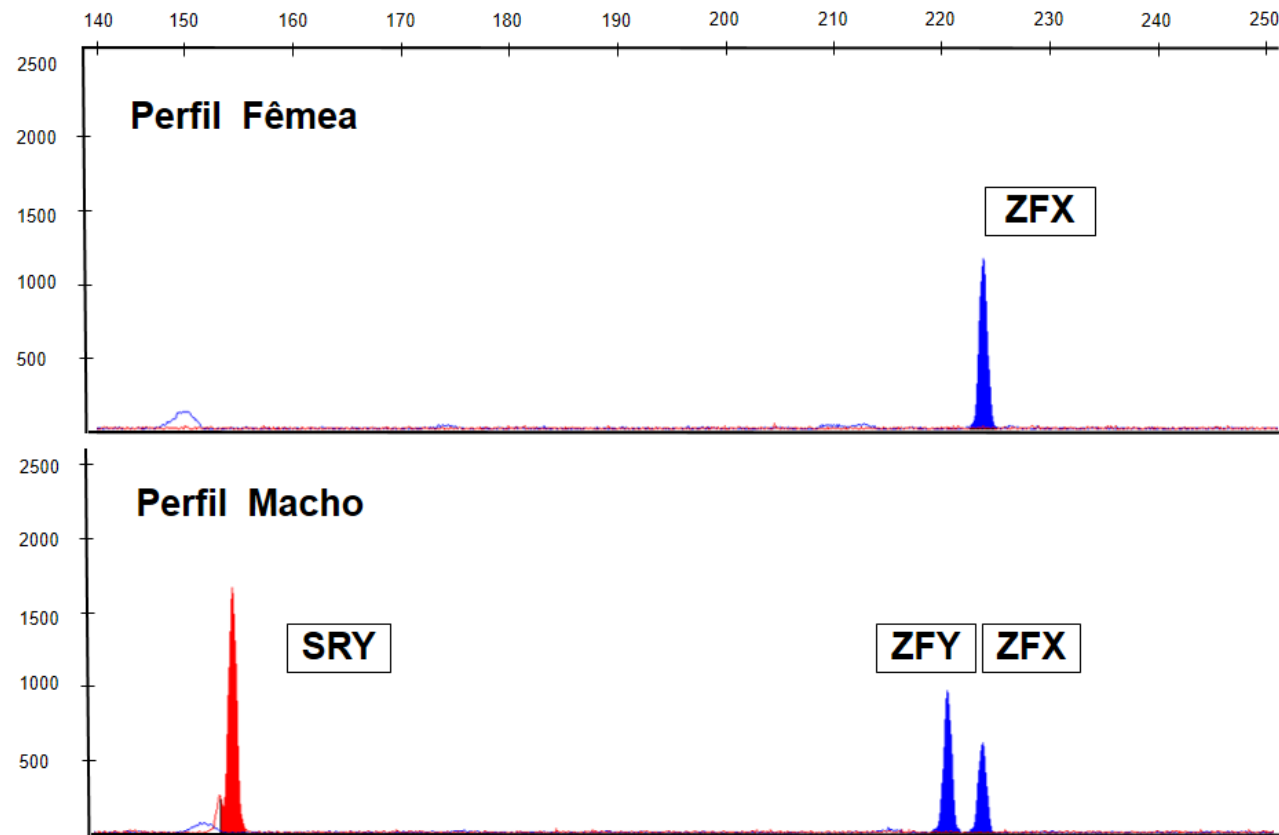


Figura 6. Eletroferograma do perfil bplex, da espécie *Sotalia guianensis*, com os marcadores para identificação de sexo, SRY e ZFY/ZFX. Gerado na plataforma GeneMapper ID v3.2 Applied Biosystems™. Perfil fêmea, com amplificação de pico único azul e perfil macho, com amplificação de dois picos azuis, confirmado pela amplificação do pico SRY vermelho, presente somente em machos.

Frasier *et al.* (2006) caracterizou 16 marcadores microssatélites tetranucleotídeos para as baleias do gênero *Eubalaena*, *Eubalaena glacialis* e *Eubalaena australis*. Para analisar a estrutura de populações das baleias do Atlântico Norte e Sul, somou-se aos 16 *loci* desenvolvidos outros 19 *loci* microssatélites, totalizando 35 *loci* para genotipagem. Com o objetivo de reduzir o tempo e o custo da genotipagem, desenvolveram a multiplexação dos 35 *loci*, que proporcionou um método definido como rápido, robusto e rentável.

Os cuidados com a padronização dos multiplex devem seguir estratégias para minimizar erros, como a sobreposição de alelos e ampliações inespecíficas, desta forma o potencial de multiplexação aumenta, assegurando a diminuição de gastos com reagentes e o tempo para o preparo das reações (GUICHOUX *et al.*, 2011).

6.3. SEXAGEM

Os marcadores ZFY/ZFX e SRY identificaram com sucesso os sexos dos espécimes (Tabela 3). O resultado foi de 69 machos e 21 fêmeas. Aproximadamente uma proporção de 3:1 de machos/fêmea.

Tabela 3. Sexo dos espécimes de *Sotalia guianensis* identificados através dos marcadores ZFY/ZFX e SRY. Macho: M e Fêmea: F.

| Amostras | Sexo | Amostras | Sexo | Amostras | Sexo |
|----------|------|----------|------|----------|------|
| SOT.01 | F | SOT.31 | F | SOT.61 | M |
| SOT.02 | F | SOT.32 | M | SOT.62 | M |
| SOT.03 | M | SOT.33 | M | SOT.63 | M |
| SOT.04 | M | SOT.34 | M | SOT.64 | M |
| SOT.05 | M | SOT.35 | M | SOT.65 | F |
| SOT.06 | M | SOT.36 | M | SOT.66 | F |
| SOT.07 | M | SOT.37 | M | SOT.67 | M |
| SOT.08 | M | SOT.38 | M | SOT.68 | F |
| SOT.09 | M | SOT.39 | M | SOT.69 | M |
| SOT.10 | M | SOT.40 | M | SOT.70 | M |
| SOT.11 | F | SOT.41 | M | SOT.71 | M |
| SOT.12 | M | SOT.42 | M | SOT.72 | M |
| SOT.13 | M | SOT.43 | M | SOT.73 | M |
| SOT.14 | M | SOT.44 | M | SOT.74 | M |
| SOT.15 | F | SOT.45 | M | SOT.75 | M |
| SOT.16 | M | SOT.46 | M | SOT.76 | M |
| SOT.17 | M | SOT.47 | F | SOT.77 | M |
| SOT.18 | M | SOT.48 | M | SOT.78 | F |
| SOT.19 | M | SOT.49 | F | SOT.79 | F |
| SOT.20 | M | SOT.50 | M | SOT.80 | F |
| SOT.21 | M | SOT.51 | M | SOT.81 | M |
| SOT.22 | M | SOT.52 | F | SOT.82 | M |
| SOT.23 | M | SOT.53 | M | SOT.83 | F |
| SOT.24 | F | SOT.54 | M | SOT.84 | M |
| SOT.25 | M | SOT.55 | M | SOT.85 | M |
| SOT.26 | M | SOT.56 | M | SOT.86 | M |
| SOT.27 | F | SOT.57 | M | SOT.87 | F |
| SOT.28 | F | SOT.58 | M | SOT.88 | M |
| SOT.29 | F | SOT.59 | M | SOT.89 | M |
| SOT.30 | M | SOT.60 | M | SOT.90 | F |

A identificação do sexo de cetáceos sem uso de técnicas moleculares revelaram-se difíceis e pouco confiáveis. Além da dificuldade de reconhecimento no ambiente e a pouca ou ausência de dimorfismo sexual, muitos estudos recorrem as carcaças encalhadas em praias, que frequentemente são encontradas com níveis de decomposição avançados, sem a possibilidade de avaliação correta do sexo morfológico, até mesmo após serem necropsiados (JAYASANKAR *et al.*, 2008).

Improbabilidade de determinação morfológica do sexo é um obstáculo para o entendimento de importantes aspectos biológicos (IWC, 1991), populacionais, comportamentais, reprodutivos e demográficos, se tornando um parâmetro relevante para a conservação e gestão de várias espécies (HUGHES, 1998).

Estudos com identificação genética de sexo, de baleias ou golfinhos encontraram, para a maioria, uma proporção sexual de 1:1 (VALSECCHI *et al.*, 2002; PATENAUDE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2016). No entanto, em muitas populações o número de machos e fêmeas pode não ser igual, desviando da razão de 1:1. Esses desvios podem acelerar os efeitos da endogamia na taxa de extinção (MILLS & SMOUSE, 1994). Para *S. guianensis*, em estudos do litoral sergipano, baseados em encalhes, o número de machos era maior que o de fêmeas (HUBNER *et al.*, 2007).

Nesta pesquisa, observamos uma diferença significativa no desvio da proporção sexual, no qual, o número de machos é três vezes o número de fêmeas, o que indicamos como resultado da metodologia oportunista, com coleta de espécimes encontrados em praias. Ademais, sabe-se que em espécies sujeitas a ações antrópicas, como as atividades pesqueiras, a maioria dos indivíduos com acidentes em redes de pesca são jovens e machos (ARCHER *et al.*, 2001), o que aumenta o nível de animais machos encontrados nas praias.

Villesen *et al.* (2006) pontuaram critérios para definir um marcador molecular para sexo como perfeito: 1- amplificar os produtos em uma única etapa, afim de ser rápido e menos custoso; 2- evidenciar ao menos um locus que existe em ambos os sexos, proporcionando um controle; 3- amplificar produtos pequenos (100-300pb), favoráveis em DNA degradado e 4- amplificar em outras espécies. Dado os fatores e a disponibilidade online de sequências genômicas de diversos mamíferos e outros cetáceos, e da conservação do genoma entre eles, os marcadores ZFY/ZFX e SRY amplificados *in-silico* em outras espécies de cetáceos e primatas pode ser considerado um bom marcador sexual e útil em estudos populacionais.

Cunha & Solé-Cava (2007) informam que este tipo de sexagem é confiável e funciona na maioria das amostras degradadas sendo muito conveniente para *Sotalia* spp. e outros cetáceos, principalmente das regiões tropicais, pois as carcaças em decomposição são fontes consideráveis de material de estudo. Em vista disso, para a melhor compreensão populacional, a identificação de gênero através da análise de marcadores moleculares está se tornando uma poderosa ferramenta no estudo de populações de cetáceos (SHAW *et al.*, 2003).

6.4. DIVERSIDADE GENÉTICA

Os parâmetros populacionais e diversidade genética, com o número amostral, número de alelos, frequência mínima, frequência máxima, valores de heterozigose observada (H_o), heterozigose esperada (H_E), conteúdo de informações polimórficas (PIC), poder de discriminação (PD), coeficiente de endogamia (F), valor de p para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), e status de locus em equilíbrio ou desequilíbrio de Hardy-Weinberg está apresentado na Tabela 4. Todos os genótipos estão disponíveis no Apêndice 3.

Tabela 4. Parâmetros populacionais e diversidade genética dos *loci* microssatélites genotipados em *Sotalia guianensis* do litoral do Espírito Santo.

| Locus | N. amostral | N. alelos | Frequência mínima | Frequência máxima | H _E | H _O | PIC | PD | F | p-valor (a) | p-valor (b) | EHW |
|---------------------|-------------|-----------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|------|------|-----------|-------------|-------------|---------|
| Sota-01 | 70 | 5 | 0,02 | 0,46 | 0,677903 | 0,571429 | 0,62 | 0,80 | 0,130393 | 0,000000 | 0,002796 | Não |
| Sota-02 | 73 | 5 | 0,01 | 0,88 | 0,236939 | 0,260274 | 0,21 | 0,40 | -0,095746 | 1,000000 | 1,000000 | Sim |
| Sota-03 | 66 | 10 | 0,01 | 0,42 | 0,764400 | 0,590909 | 0,73 | 0,90 | 0,229331 | 0,003025 | 0,007346 | Não |
| Sota-04 | 79 | 6 | 0,02 | 0,34 | 0,769562 | 0,564103 | 0,73 | 0,90 | 0,266406 | 0,051897 | 0,043479 | Sim/Não |
| Sota-05 | 50 | 10 | 0,01 | 0,35 | 0,792158 | 0,727273 | 0,74 | 0,91 | 0,082839 | 0,990217 | 0,999171 | Sim |
| Sota-06 | 44 | 3 | 0,13 | 0,57 | 0,573929 | 0,568182 | 0,49 | 0,73 | 0,002663 | 0,912681 | 0,995781 | Sim |
| Sota-07 | 47 | 4 | 0,03 | 0,68 | 0,496683 | 0,446809 | 0,45 | 0,69 | 0,105794 | 0,703339 | 0,982019 | Sim |
| Sota-08 | 69 | 6 | 0,01 | 0,36 | 0,743246 | 0,632353 | 0,69 | 0,88 | 0,145412 | 0,188190 | 0,573572 | Sim |
| Sota-09 | 77 | 4 | 0,02 | 0,56 | 0,592899 | 0,611765 | 0,51 | 0,75 | -0,054148 | 0,998372 | 0,995044 | Sim |
| Sota-10 | 71 | 6 | 0,02 | 0,58 | 0,587873 | 0,571429 | 0,53 | 0,77 | 0,031098 | 0,936332 | 0,997558 | Sim |
| Sota-11 | 49 | 3 | 0,01 | 0,97 | 0,060383 | 0,061224 | 0,06 | 0,12 | -0,005262 | 1,000000 | 1,000000 | Sim |
| Sota-12 | 77 | 9 | 0,01 | 0,29 | 0,814871 | 0,701299 | 0,78 | 0,93 | 0,139063 | 0,042355 | 0,042355 | Não |
| Sota-13 | 65 | 4 | 0,05 | 0,42 | 0,667263 | 0,553846 | 0,60 | 0,83 | 0,172606 | 0,829128 | 0,998953 | Sim |
| Sota-14 | 52 | 3 | 0,04 | 0,69 | 0,438200 | 0,461538 | 0,38 | 0,60 | -0,090620 | 0,987996 | 0,999286 | Sim |
| Total/ Média | 90 | 78/5,5 | | | 0,586879 | 0,524404 | | | 0,103410 | | | |

Número amostral de *S. guianensis* por locus, número de alelos, frequência máxima e mínima de alelo, heterozigose esperada (H_E) e observada (H_O), conteúdo de informações polimórficas (PIC), poder de discriminação (PD), coeficiente de endogamia (F), valor de *p* do equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado através do teste de Fisher, com correção de Holm-Sidak (a- descarte de dados perdidos e b- inferência de dados perdidos).

Para os valores de PIC, Botstein *et al.* (1980) classificam marcadores com PIC superior a 0,5 como muito informativos. Logo, os marcadores escolhidos para este estudo foram em maioria considerados informativos, variando entre 0,06 a 0,78. Dos 14 *loci* amplificados somente Sota-02 (0,21) e Sota-11 (0,06) foram considerados pouco informativos pelos valores do PIC, que apresentaram 5 e 3 alelos, respectivamente, e baixa heterozigose. O maior valor de PIC (0,78), correspondeu ao marcador Sota-12 que apresentou 9 alelos. O poder de discriminação variou entre 0,12 a 0,93, sendo os menores valores para os locu Sota-02 e Sota-11, com 0,40 e 0,12 respectivamente. Para o coeficiente de endogamia verificou-se a média total de 0,107, sendo o locus Sota-04 o de maior valor, com $F=0,26$.

A heterozigose observada, variou de 0,06 (Sota-11) a 0,72 (Sota-05), com valor médio de 0,52, enquanto a heterozigose esperada variou de 0,06 (Sota-11) a 0,81 (Sota-012), com valor médio de 0,58. O locus Sota-11, com menor valor de heterozigose observado e esperado, foi um dos que apresentou menor número de alelos (3), contrastando com os valores encontrados em Rosel *et al.* (2005) para *T. truncatus*, de 8 alelos e heterozigose esperada de 0,68 e observada de 0,63. Reiterando que este marcador amplificado pela primeira vez em *S. guianensis* e embora o uso de primers heterólogos seja comum, mesmo que ao nível de família, é esperado que para uma espécie ou outra o marcador apresente maior ou menor nível de polimorfismo.

Para todos os *loci* a heterozigose observada apresentou valores menores que o esperado, inclusive se comparado com as taxas descritas na literatura, sendo este um evento comum e observado na maioria dos estudos populacionais. Cunha & Watts (2007), através de 12 marcadores isolados no gênero *Sotalia*, encontrou heterozigose baixa variando entre 0,040 e 0,704 o observado e entre 0,093 e 0,818 o esperado, e a variação de dois e 14 alelos. Quando comparados os mesmo marcadores amplificados em *S. guianensis* nos diferentes estudos, observamos diferenças entre os valores de heterozigose. Neste estudo, para Sota-01, Sota-02, Sota-03, Sota-04 Sota-05, encontramos os valores: 0,571, 0,260, 0,590, 0,564 e 0,727; em Cunha & Watts (2007) encontramos respectivamente para os mesmos marcadores os seguintes valores: 0,533, 0,444, 0,567, 0,704 e 0,704. O déficit encontrado no Sota-02 foi igualmente registrado em Cunha & Watts (2007), sendo mencionado o efeito Wahlund como possível explicação para a baixa de heterozigose, devido a

amostragem coletada em duas áreas distintas, Rio de Janeiro e Pará, consideradas no estudo de Cunha *et al.* (2010) como duas unidades de manejo distintas. Neste estudo, apesar de testarmos a estrutura da população em duas regiões, Norte e Sul do Espírito Santo, as áreas são consideradas próximas.

Os mesmos 12 marcadores foram testados para *S. fluviatilis*, e embora pertençam ao mesmo gênero, 2 marcadores não amplificaram, 2 foram monomórficos e outro apresentou heterozigose observada baixa de 0,200 e apenas dois alelos. Citam inclusive que, apesar destes 4 que não funcionaram para *S. fluviatilis*, o número menor de alelos encontrados nos oito *loci* em comparação com *S. guianensis* foi possivelmente devido ao tamanho amostral limitado (CUNHA & WATTS, 2007). Neste estudo, não atribuímos a baixa de heterozigose de alguns *loci* a presença de alelos nulos ou endogamia, pois os valores não foram considerados significativos para endogamia. Contudo, os outros efeitos, precisam ainda serem avaliados para a região, que carece de mais estudos. A deficiência de heterozigose já foi detectada em outros estudos de cetáceos (ROONEY *et al.*, 1999; WALDICK *et al.*, 1999; WALDICK *et al.*, 2002; ADAMS & ROSEL, 2006; COUGHLAN *et al.*, 2006), não sendo considerada um evento raro, e geralmente explicada por uma das possíveis causas indicadas para os estudos populacionais com microssatélite: a existência de alelos nulos, acasalamentos preferenciais, efeito Wahlund, amostragem não randômica, seleção e endogamia (ADAMS & ROSEL, 2006) e baixa amostragem (CASTILHO *et al.*, 2015).

Para os *loci* Sota-06 e Sota-07, encontramos os valores de heterozigose observada de 0,568 e 0,446. Os mesmos *loci*, amplificados em *S. guianensis* apresentado por Gravena *et al.* (2009) obtiveram 0,750 e 1,000. Os valores de heterozigose para estes *loci* foram maiores nos indivíduos oriundos do estuário do Rio Amazonas, outra unidade de manejo considerada distinta do Espírito Santo. O estudo de Hollatz *et al.* (2011) analisou indivíduos da Baía de Sepetiba e de Paraty utilizando 5 marcadores utilizados neste estudo. Os valores de heterozigose observada para estes marcadores nas 3 regiões avaliadas, Baía de entrada e Baía interna em Sepetiba e Baía de Paraty, foram respectivamente: 0,353, 0,409 e 0,615 para Sota-03, 0,800, 0,696 e 0,308 para Sota-04, 0,500, 0,609 e 0,800 para Sota-05, 0,650, 0,783 e 0,600 para Sota-08 e 0,550, 0,652 e 0,714 para Sota-09. Podemos observar que para todos os valores, a heterozigose dos botos do Espírito Santo se encontrou dentro da faixa encontrada para os indivíduos do Sudeste de Hollatz *et al.* (2011), e

que mesmo para os grupos de regiões muito próximas, como os indivíduos da baía de entrada e da baía interna de Sepetiba, considerados não estruturados geneticamente, existem variações na heterozigose.

Os valores de p descritos para o equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de exato de Fisher, ajustados pelo fator Holm-Sidak (a- descarte de dados perdidos e b- inferência de dados perdidos), indicam a presença (sim) ou ausência (não) do equilíbrio por locus, sendo considerados em equilíbrio Hardy-Weinberg os valores $> 0,05$ e em desequilíbrio os valores $< 0,05$. Somente três *loci*, Sota-01, Sota-03 e Sota-12, sem inferência de dados, não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg e com inferência dos dados perdidos, os mesmos *loci* e também Sota-04.

O teorema de Hardy-Weinberg presume que uma população tem tamanho infinito e que os indivíduos desta acasalam aleatoriamente. Quando se observam desvios nas proporções esperadas de equilíbrio, significa que alguma das pressuposições foi descumprida. As principais variações nas frequências alélicas nas populações podem ser resultados de processos contínuos, como mutações, migrações, seleção natural e deriva genética (FALCONER & MACKAY, 1997). Ademais, diversos eventos populacionais poderiam ser responsáveis por um desequilíbrio, como a endogamia, tamanho populacional pequeno e estável, fundação de uma população por poucos indivíduos seguido de rápido crescimento, a mistura entre populações com frequências de alelos distintas e até o pequeno tamanho amostral (CASTILHO *et al.*, 2015).

O polimorfismo dos microssatélites está relacionado com a natureza gênica, os tipos e números de repetições do locus, e se possuem interrupções entre as repetições (ELLEGREN, 2004). Neste estudo, os tamanhos dos amplicons obtidos e o número de alelos corresponderam aproximadamente, em maioria, com o tamanho esperado descrito na literatura. A média de alelos foi de 5,5, sendo os marcadores Sota-06, Sota-11 e Sota-14 com os menores valores de alelos (3), e os marcadores Sota-03 e Sota-05 com os maiores valores de alelos (10). Alguns apresentaram pequenas diferenças no tamanho do amplicon ou no número de alelos, no entanto, todos os marcadores já testados em *S. guianensis* são oriundos de populações de diferentes localidades e podem variar. Sota-01 foi o único marcador que apresentou o tamanho do amplicon e o número de alelos idêntico ao apresentado por Cunha e Watts (2007) para espécimes do Rio de Janeiro e Pará. Sota-06 e Sota-07 apresentaram os

tamanhos dos amplicons abaixo e fora da faixa de valores esperados. Além dos diferentes números de alelos, contudo, os valores apresentados por Gravena *et al.* (2009) contaram com a genotipagem de um número amostral pequeno, com 8 indivíduos apenas, e de indivíduos do estuário do Rio Amazonas sendo um indicativo desta diferença no tamanho dos amplicons, visto que a região ainda é carente de estudos populacionais para a espécie e não temos disponíveis dados comparáveis. O marcador Sota-03, apesar de ter sido desenvolvido em *S. guianensis* apresentou um polimorfismo abaixo do esperado, com apenas 5 alelos, do total de 14 descritos em Cunha e Watts (2007) para as localidades Rio de Janeiro e Pará. Os marcadores Sota-10, Sota-11, Sota-12 e Sota-13 e Sota-14 apresentaram o número de alelos abaixo do esperado, além disso, Sota-14 apresentou o tamanho do amplicon acima do esperado, sendo que estes foram desenvolvidos em *T. truncatus* e amplificados em *S. guianensis* pela primeira vez neste trabalho, não sendo possível uma comparação de resultados para este marcador.

Observamos diferenças nos tamanhos de amplicons e diversidade alélica para este trabalho em comparação com outras espécies, corroborando Krützen (2001), que afirmou que os marcadores desenhados para outras espécies, conhecidos como heterólogos, quando transferidos de uma espécie para outra podem perder variabilidade. Estas diferenças podem ser encontradas na maioria de outros trabalhos que utilizam marcadores heterólogos. Ainda assim, todos os marcadores utilizados nesta pesquisa foram polimórficos em *S. guianensis* da costa do Espírito Santo (>3 alelos por locus). Barbará *et al.* (2007) afirmaram que a transferibilidade dos primeiros heterólogos é maior em espécies pertencentes ao mesmo gênero ou família, devido à proximidade evolutiva e homologia dos genomas. Todavia, *S. guianensis* ainda não teve seu genoma sequenciado, impossibilitando uma maior investigação sobre a homologia genômica entre gênero e família. Ademais, sabe-se que a diversidade alélica é dependente do tamanho amostral (GALOV *et al.*, 2011) e que os tamanhos dos amplicons disponibilizados na literatura não especificam algumas informações convenientes a comparação entre espécies, regiões e populações, como o número de repetição para um alelo específico e quais os alelos específicos dentro da faixa de amplicon. A não disponibilização dessas informações e do genótipo completo nas pesquisas afeta o aprofundamento das investigações populacionais.

As diferenças genéticas de *Sotalia* spp. entre as regiões brasileiras relatadas em Cunha *et al.* (2010) com marcadores mitocondriais, revelam a existência de variações por áreas geográficas. Isto condiz com as variações obtidas nesta investigação sobre diversidade genética por meio dos microssatélites, quando comparados a amostragens de localidades distintas, além das variações encontradas por espécies.

Torggler *et al.* (1995) afirmaram que a variação genética é a base da evolução, com a seleção natural incidindo sobre diversos parâmetros populacionais e causando a variação entre as populações e entre espécies. Desta forma, com maiores variabilidades, maiores chances da perpetuação das espécies (YEEH *et al.*, 1996).

6.5. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

O alelo mais frequente encontrado para a população do Espírito Santo foi o alelo 186 do locus Sota-11, com 97%, e um total de 3 alelos, seguido dos alelos, 208 do locus Sota-02, com 87%, total de 5 alelos, alelo 64 do locus Sota-14, com 70% e 3 alelos. Os menos frequentes foram os alelos 106 e 108 do locus Sota-08, o alelo 108 do Sota-12, alelo 200 e 228 do locus Sota-2, alelo 206 do locus Sota-11, alelo 246 do Sota-05 e alelo 404 e 418 do locus Sota-03, todos com apenas 1% de frequência.

As frequências alélicas totais obtidas por locus para *S. guianensis* estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5. Frequência alélica dos espécimes de *Sotalia guianensis* do litoral Espírito Santo, obtida através de 14 *loci* microssatélites.

| Alelo (pb) | Sota-01 | Sota-02 | Sota-03 | Sota-04 | Sota-05 | Sota-06 | Sota-07 | Sota-08 | Sota-09 | Sota-10 | Sota-11 | Sota-12 | Sota-13 | Sota-14 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 88 | | | | | | | | 0,2353 | 0,5412 | | | | | |
| 92 | | | | | | | | 0,2500 | | | | | | |
| 94 | | | | | | | | | 0,1118 | | | | | |
| 96 | | | | | | | | 0,1397 | | | | | | |
| 97 | | | | | | | | | 0,3235 | | | | | |
| 100 | | | | | | | | 0,3529 | | | | | | |
| 103 | | | | | | | | | 0,0235 | | | | | |
| 106 | | | | | | | | 0,0074 | | | | | | |
| 108 | | | | | | | | 0,0147 | | | | 0,0130 | | |
| 112 | | | | | | | | | | | | 0,2468 | | |
| 120 | | | | | | | | | | | | 0,0325 | | |
| 126 | | | | | | | | | | | | 0,0325 | | |
| 128 | | | | | | | | | | | | 0,0519 | | |
| 130 | | | | | | | | | | | | 0,0779 | | |
| 131 | 0,2143 | | | | | | | | | | | | | |
| 132 | | | | | | | | | | | | 0,2922 | | |
| 133 | 0,0214 | | | | | | | | | | | | | |
| 134 | | | | | | | | | | | | 0,1494 | | |
| 135 | 0,0500 | | | | | | | | | | | | | |
| 136 | | | | | | | | | | | | 0,1039 | | |
| 137 | 0,2500 | | | | | | | | | | | | | |
| 139 | 0,4643 | | | | | | | | | | | | | |
| 150 | | | | 0,3333 | | | | | | | | | 0,1615 | |
| 154 | | | | 0,0192 | | | | | | | | | 0,0538 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|--------|--|--------|--------|--|--------|--------|--------|--------|
| 156 | | | 0,1859 | | | | | | 0,3692 |
| 158 | | | 0,1923 | | | | | | 0,4154 |
| 162 | | | | | | | | | 0,0288 |
| 164 | | | 0,0449 | | | | | | 0,7019 |
| 166 | | | 0,2244 | | | | | | 0,2692 |
| 186 | | | | | | | | 0,9694 | |
| 196 | | | | | | | | 0,0204 | |
| 200 | 0,0068 | | | | | | | | |
| 206 | 0,0822 | | | | | | | 0,0102 | |
| 208 | 0,8699 | | | | | | | | |
| 210 | | | | | | | 0,0214 | | |
| 212 | | | | | | | 0,0357 | | |
| 214 | | | | | | | 0,5857 | | |
| 216 | 0,0342 | | | | | | 0,2571 | | |
| 218 | | | | | | | 0,0357 | | |
| 220 | | | | | | | 0,0643 | | |
| 227 | | | | | | 0,5682 | | | |
| 228 | 0,0068 | | | | | | | | |
| 229 | | | | | | 0,1250 | | | |
| 231 | | | | | | 0,3068 | | | |
| 232 | | | | 0,1136 | | | | | |
| 234 | | | | 0,0227 | | | | | |
| 236 | | | | 0,2576 | | | | | |
| 238 | | | | 0,3258 | | | | | |
| 240 | | | | 0,1515 | | | | | |
| 242 | | | | 0,0152 | | | | | |
| 244 | | | | 0,0227 | | | | | |
| 246 | | | | 0,0076 | | | | | |

Quando os espécimes do Espírito Santo foram divididos em duas possíveis populações, norte e sul, considerando um modelo heurístico baseado na localização/designação, observou-se a existência de 8 *loci* exibindo pelo menos um alelo privado, com frequências $<0,07$ (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de alelos privados de *Sotalia guianensis*, obtidas através de marcadores microssatélites, considerando duas populações dentro do Espírito Santo, sul até o município de Serra e norte a partir de Aracruz.

| Locus | Alelo | Frequência | População |
|---------|-------|------------|-----------|
| Sota-01 | 135 | 0,07 | Sul |
| Sota-02 | 200 | 0,01 | Sul |
| Sota-02 | 228 | 0,02 | Norte |
| Sota-03 | 418 | 0,01 | Sul |
| Sota-03 | 404 | 0,01 | Sul |
| Sota-05 | 246 | 0,01 | Sul |
| Sota-05 | 234 | 0,03 | Sul |
| Sota-05 | 252 | 0,03 | Sul |
| Sota-08 | 106 | 0,01 | Sul |
| Sota-08 | 108 | 0,02 | Sul |
| Sota-11 | 206 | 0,01 | Sul |
| Sota-12 | 108 | 0,01 | Sul |
| Sota-14 | 162 | 0,04 | Sul |

Na população norte foi encontrado apenas um alelo exclusivo, o alelo 228 do locus Sota-02 que aparece na frequência de 2%. Na população sul, observamos 12 alelos exclusivos, sendo o alelo 135 de Sota-01 com 7%, alelo 200 de Sota-02 com 1%, alelo 418 e 404 de Sota-03 com 1%, alelo 246, 234 e 252 de Sota-05 com 1%, 3% e 3% respectivamente, alelo 106 e 108 de Sota-08 com 1% e 2% respectivamente, alelo 206 de Sota-11 com 1%, alelo 108 de Sota-12 com 1% e alelo 162 de Sota-14 com 4%.

Hollatz *et al.* (2011), avaliou as populações de *S. guianensis* da Baía de Sepetiba, região de entrada e interior, e a Baía de Paraty. Encontraram cinco alelos privados (dois para a região de entrada e seis no interior) na Baía de Sepetiba e seis para os indivíduos de Paraty e somando outras análises de estruturação não admitiram duas unidades geneticamente distintas. Natoli *et al.* (2004) analisaram nove diferentes populações de *T. truncatus* em sete regiões mundiais e encontraram alelos privados e diferenças significativas entre todas as populações.

Szpiech & Rosenberg (2011) afirmaram que a frequência dos alelos privados de microssatélites, nos alelos de tamanhos maiores e menores de um locus (alelos extremos de um gráfico unimodal), aumentam em função da diferenciação genética entre populações. Gusson *et al.* (2006) cita que populações com alta densidade demográfica apresentam maiores níveis de diversidade genética, o que pode aumentar as chances de ocorrência de mutações e surgimento de novos alelos, sendo as variações nas frequências alélicas em diferentes regiões geográficas ocasionadas pelas diferenças de habitat e aleatoriamente, sem influência de outros fatores seletivos, causando um isolamento de unidades populacionais.

O número de alelos privados e as frequências obtidas neste estudo foram baixas e pouco indicativas de uma distinção entre as áreas, considerando o número amostral desproporcional, com 62 indivíduos oriundos da região sul e 28 da Região Norte.

6.6. SEQUENCIAMENTO SANGER

Para identificar o número de repetições dos *loci* microssatélites, sem amplificação prévia em *S. guianensis*, foram sequenciados pelo menos um alelo para os *loci* Sota-10 a Sota-13.

O locus Sota-10, alelo 216 pb correspondeu a [CA]₂₄. O locus Sota-11, alelo 186 pb correspondeu a [CA]₁₆. O locus Sota-12, alelo 132 pb correspondeu a [GT]₃₃. O locus Sota-13, alelo 158 pb correspondeu a [CA]₂₀.

O resultado do sequenciamento pode ser observado nas figuras 8 (Sota-10-F), 9 (Sota-10-R), 10 (Sota-11-F) e 11 (Sota-12-F).

O número de repetições evidenciados no sequenciamento destes quatro *loci* em *S. guianensis* condisse com o número de repetições disponibilizada na literatura para outra espécie, o golfinho nariz de garrafa, *T. truncatus*. A faixa de amplicons disponibilizada na literatura não identificava exatamente qual o alelo possuía o número de repetições citadas, mas todos os *loci* sequenciados evidenciaram um número de repetições próximo ou igual.

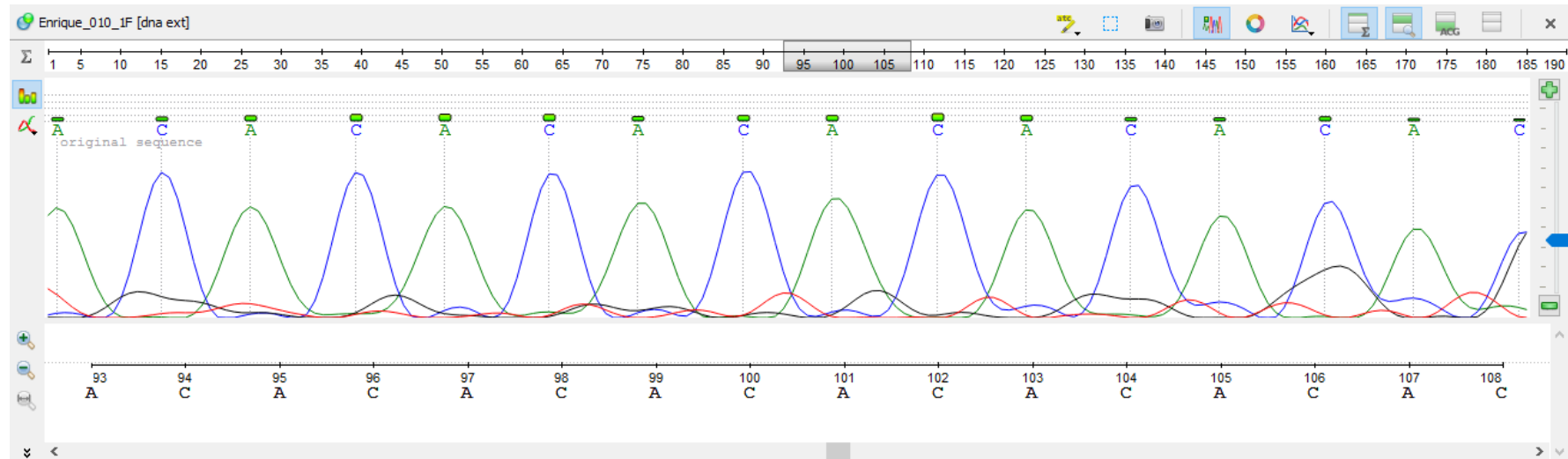


Figura 7. Perfil do eletroferograma obtido do sequenciamento do locus microssatélite Sota-10- F, fita foward, da espécie *Sotalia guianensis*. Possível observar a repetição do dinucleotídeo CA. Analisado no sequenciador e verificado no programa Unipro-UGENE.

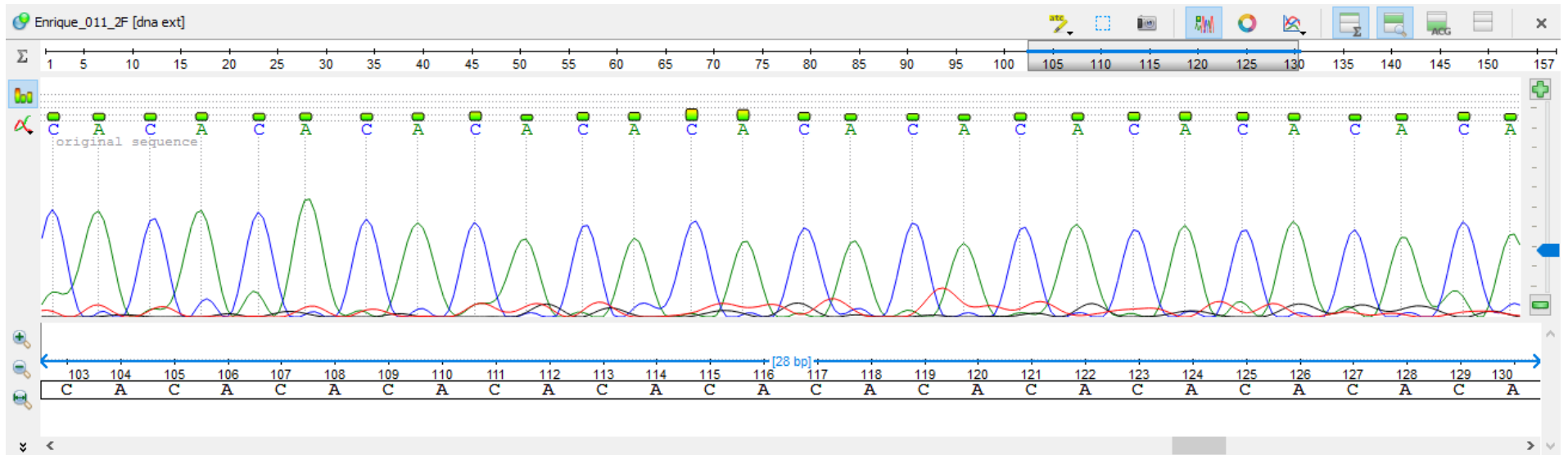


Figura 9. Perfil do Eletroferograma obtido do sequenciamento do locus microsatélite Sota-11-F, fita foward, da espécie *Sotalia guianensis*. Possível observar a repetição do dinucleotídeo CA. Analisado no sequenciador e verificado no programa Unipro-UGENE.

6.7. MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO

O genoma de *S. guianensis* ainda não foi sequenciado até o presente momento, dificultando a identificação de quaisquer outras informações sobre o genoma nuclear da espécie e mapeamento cromossômico, ficando a cargo das espécies próximas. A espécie mais estudada da família *Delphinidae* é o golfinho nariz de garrafa, *T. truncatus* que possui regiões do seu genoma sequenciado. Sabe-se que o número diploide de cromossomos é $42 + XX / 42 + XY$ (EROĞLU, 2015), no entanto, seu genoma ainda não foi montado a nível cromossômico.

As forças interalélicas não aleatórias entre *loci* fisicamente ligados podem influenciar os parâmetros populacionais, por isso inferiu-se a posição física dos *loci* utilizados neste estudo, com a análise de sintenia entre *T. truncatus* (Baylor Ttru_1.4 / turTru2 - LINDBLAD-TOH *et al.*, 2011) e a vaca (*Bos taurus*) (bosTau8 UMD 3.1.1 cow – ELSIK *et al.*, 2009), a espécie de mamífero terrestre mais próximo dos golfinhos com genoma sequenciado e montado (FOOTE *et al.*, 2015).

Foram descritas as porcentagem de bases e extensão encontradas para os *loci* amplificados *in-silico* no genoma de *T. truncatus* e convertidos para o genoma de *B. taurus*. Para alguns *loci* que não encontraram homologia suficiente entre as espécies a partir dos amplimers, ampliou-se a extensão em 10.000 pares de bases no início e no fim da sequência. A homologia variou de 100% (Sota-01 e Sota-11) a 41,5% (Sota-12) (Tabela 7). Treze *loci* foram mapeados com precisão, sendo cinco *loci* mapeados no cromossomo 5 e outros dois no cromossomo 2. Sota-07 apresentou homologia com sequências ainda não mapeadas. A partir destas conversões foi possível montar um mapa de sintenia, com a posição física dos *loci* utilizados neste trabalho sob os cromossomos de *B. taurus* (Figura 11).

Tabela 7. Homologia dos *loci* microssatélites em *Tursiops truncatus* sob o genoma de *Bos taurus*, através da conversão de coordenadas.

| Marcador | Posição física convertida na espécie <i>Bos taurus</i> | Homologia do amplicon | Homologia do amplicon estendido |
|----------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Sota-01 | chr16:30635710-30715804 | 100,0% de bases, 100,0% de extensão | 65,0% de bases, 98,8% de extensão |
| Sota-02 | chr5:78104781-78198979 | insuficiente | 33,5% de bases, 66,0% de extensão |
| Sota-03 | chr11:43546691-43547352 | 97,5% de bases, 98,6% de extensão | 8,2% de bases, 8,4% de extensão |
| Sota-04 | chr2:136194161-136341975 | 90,3% de bases, 100,0% de extensão | 89,4% de bases, 100,0% de extensão |
| Sota-05 | chr5:79902524-80199373 | insuficiente | 54,7% de bases, 93,8% de extensão |
| Sota-06 | chr5:22624296-22624467 | 74,1% de bases, 82,3% de extensão | 83,3% de bases, 100,0% de extensão |
| Sota-07 | chrUn_AAFC03050822:4970-5249 | 56,4% de bases, 100,0% de extensão | 41,2% de bases, 58,2% de extensão |
| Sota-08 | chr5:13663658-13811635 | 65,2% de bases, 100,0% de extensão | 56,8% de bases, 96,3% de extensão |
| Sota-09 | chr13:79285338-79503653 | insuficiente | 46,9% de bases, 69,7% de extensão |
| Sota-10 | chr5:21514042-21601844 | 74,5% de bases, 100,0% de extensão | 69,8% de bases, 100,0% de extensão |
| Sota-11 | chr3:63985450-64061499 | 100,0% de bases, 100,0% de extensão | 80,3% de bases, 94,6% de extensão |
| Sota-12 | chr2:20420794-20492406 | 41,5% de bases, 41,5% de extensão | 72,0% de bases, 100,0% de extensão |
| Sota-13 | chr8:33251566-33524350 | 77,4% de bases, 98,7% de extensão | 52,4% de bases, 82,1% de extensão |
| Sota-14 | chr6:96243359-96273978 | 95,3% de bases, 100,0% de extensão | 78,3% de bases, 98,2% de extensão |

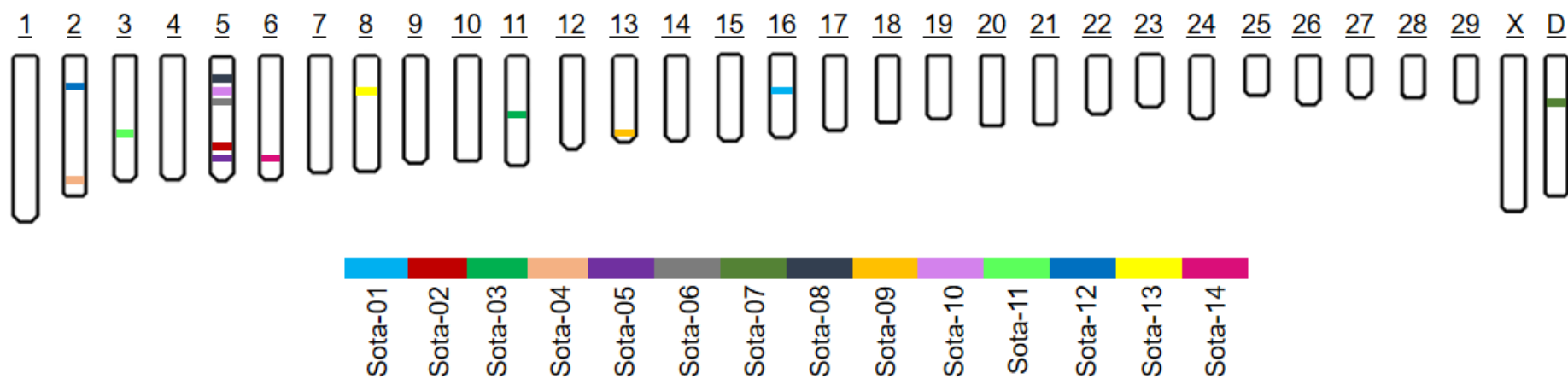


Figura 11. Mapa de sintenia para os *loci* microssatélites da espécie *Tursiops truncatus* sob o genoma de *Bos taurus*. O cromossomo D representa seqüências não mapeadas para um cromossomo particular.

Os mapas genéticos e cromossômicos desenvolvidos a partir de modernas técnicas de ligação e mapeamento físico revelaram uma alta conservação do genoma de mamíferos, mesmo entre espécies que divergiram dezenas de milhões de anos atrás (WIENBERG *et al.*, 1997). O delineamento de segmentos homólogos entre mamíferos pode auxiliar na determinação da ordem de genes dentro dessas regiões conservadas e por consequência ser útil no desenvolvimento de mapas genéticos comparativos. Além disso, é útil para analisar as mudanças que ocorreram na organização do genoma durante a evolução dos mamíferos e poderia ser usado para investigar as relações filogenéticas que existem entre estas ordens (BIELEC *et al.*, 1998).

As espécies podem diferir com relação ao número e morfologia de seus cromossomos, devido aos blocos sintênicos estarem reunidos em diferentes combinações. Blocos que estão juntos em uma espécie podem também estar separados em diferentes cromossomos de outra (YANG *et al.*, 1997). Para os cetáceos, o número diploide predominante de cromossomos é $2n=44$ autossomos, admitindo que todos da família *Delphinidae* também possuem $2n=44$ autossomos, apesar de que nem todas as espécies foram avaliadas especificamente (EROĞLU, 2015).

Estudos citogenéticos antigos realizados em 37 espécies de cetáceos indicaram que a macroestrutura cromossômica desse grupo poderia ser considerada conservada (ÁRNASON, 1974). Solinas-Toldo *et al.* (1995) identificaram 36 blocos de sintenia conservada entre o homem e o golfinho, e 50 blocos para humanos e vacas. Bielec *et al.* (1998) avaliaram o grau de conservação e rearranjo cromossômico entre o homem e *T. truncatus*, no entanto, uma padronização não foi claramente estabelecida. Verificaram que os 22 autossomos humanos e o cromossomo X se mantiveram conservados em 36 segmentos cromossômicos do golfinho, representando quase todo o seu cariótipo, de $2n=44$. Indicaram que 13 pares dos cromossomos do *Tursiops* (1,4,6,7,10,14,15,16,18,19, 20, 21 e X) foram identificados em um único cromossomo humano, 6 pares (2,3,5,8,12 e 17) em dois cromossomos e 2 (9 e 13) em três cromossomos. E apenas um par, (11), não foi identificado. A maioria das comparações genômicas foram realizadas com o humano, uma vez que blocos sintênicos conservados nos cromossomos humanos podem ser reconhecidos

em todas as espécies, além de ser a espécie mais estudada (FERGUSON-SMITH & TRIFONOV, 2007).

Os padrões de hibridação observados nos golfinhos também são encontrados nos cromossomos de bovinos, suínos e felinos, sugerindo que esses podem estar presentes antes mesmo da divergência dos mamíferos placentários (WIENBERG *et al.*, 1997). Homologia cromossômica foi estabelecida entre 4 pares de cromossomos de *Inia geoffrensis* e *T. truncatus*, evidenciando que alguns pares cromossômicos se mantiveram conservados entre a linhagem que originou *I. geoffrensis*, uma das mais antigas espécies fluviais e *T. truncatus*, uma das espécies de delfínidos marinhos mais recentes (MCGOWEN *et al.*, 2009).

Foote *et al.* (2015) sequenciou e montou os genomas da orca, do peixe-boi e da morsa, além de aumentar a cobertura anterior do genoma de *Tursiops* ssp., utilizando novas plataformas de análise. Previu-se um conjunto de 16.878 genes ortólogos para o genoma dos quatro mamíferos marinhos e outros seis para humanos, alpacas, vacas, cachorros, elefantes e gambá. Após a análise, incluíram 14.883 ortólogos codificadores de proteínas para a orca, 10.597 para o golfinho, 15.396 para a morsa e 14.674 para o peixe-boi.

Rosel *et al.* (2005), avaliando a utilidade dos seus marcadores microssatélites em cetáceos, aproveitou a montagem do genoma de *B. taurus* e da sequência completa do genoma humano, para determinar a localização de seus novos marcadores e determinaram os ortólogos em humanos e bovinos. Verificaram que os marcadores foram distribuídos entre vários cromossomos e em diferentes regiões (espaços intergênicos, introns e exons), indicando uma aleatória amostragem do genoma do golfinho (*T. truncatus*).

Podemos observar que a maioria dos estudos sobre ortologia e sintenia se baseavam em estudos cromossômicos que evidenciavam a hibridização. Atualmente, com as ferramentas moleculares online e muitos genomas sequenciados disponíveis, as avaliações acerca da sintenia se tornaram mais rápidas e simples, sendo possível ainda fazer inferências de sintenia, através da homologia entre espécies sequenciadas e não sequenciadas, do mesmo modo como realizamos neste estudo. Importante também para análises mais detalhadas sobre desequilíbrio de ligação e associações interalélicas.

6.8. DESEQUILÍBRIO GAMÉTICO E INTENSIDADE DAS ASSOCIAÇÕES INTERALÉLICAS

Dentre os 14 *loci* microssatélites avaliados, existiam 91 combinações de pares de *loci*. Destes, somente 14 combinações exibiram desequilíbrio gamético global (Tabela 8). Um número maior (13) de pares de *loci* em desequilíbrio global foram observados para a análise que considerou os dados perdidos (a). Quando os dados perdidos foram inferidos (b), um número menor (9) de pares em desequilíbrio foi observado.

Tabela 8. Associações *interloci* em desequilíbrio gamético global significativos.

| Associação interloci | Desequilíbrio gamético global * | | | | Pares de cromossomos | Sintenia |
|----------------------|---------------------------------|----|---------------------|----|----------------------|----------|
| | <i>p</i> -value (a) | GD | <i>p</i> -value (b) | GD | | |
| Sota-01 / Sota-03 | 0,000000 | + | 0,000000 | + | 16/11 | Não |
| Sota-01 / Sota-04 | 0,048792 | + | 0,067846 | | 16/2 | Não |
| Sota-01 / Sota-08 | 0,011111 | + | 0,091748 | | 16/5 | Não |
| Sota-01 / Sota-12 | 0,013767 | + | 0,041140 | + | 16/2 | Não |
| Sota-01 / Sota-13 | 0,002834 | + | 0,903574 | | 16/8 | Não |
| Sota-03 / Sota-04 | 0,000000 | + | 0,000000 | + | 11/2 | Não |
| Sota-03 / Sota-05 | 0,044359 | + | 0,097611 | | 11/5 | Não |
| Sota-03 / Sota-08 | 0,044901 | + | 0,045984 | + | 11/5 | Não |
| Sota-03 / Sota-12 | 0,000000 | + | 0,005879 | + | 11/2 | Não |
| Sota-03 / Sota-13 | 0,000000 | + | 0,409614 | | 11/8 | Não |
| Sota-04 / Sota-05 | 0,024303 | + | 0,011374 | + | 2/5 | Não |
| Sota-04 / Sota-08 | 0,000000 | + | 0,008663 | + | 2/5 | Não |
| Sota-04 / Sota-12 | 0,050712 | | 0,000000 | + | 2/2 | Sim |
| Sota-08 / Sota-12 | 0,005679 | + | 0,016858 | + | 5/2 | Não |

*Significância do desequilíbrio gamético observado (GD), com $p < 0,05$. Sendo a- descarte de dados perdidos e b- inferência de dados perdidos. Estimado por teste exato de Fisher.

Baseado na análise de sintenia podemos identificar quais pares de *loci* em desequilíbrio gamético são sintênicos. Não cromossomos de *B. taurus*. Dentre os pares de *loci* que exibiram desequilíbrio gamético global, identificou-se somente o par Sota-04 e Sota-12 que estavam sintênicos, quando os dados perdidos foram inferidos.

Os outros *loci* sintênicos no cromossomo 5 (Sota-02, Sota-05, Sota-06, Sota-08 e Sota-10) não mostraram nenhuma associação em desequilíbrio gamético.

Para ampliar a avaliação de desequilíbrio gamético, investigou-se as associações e intensidades interalélicas não aleatórias, medindo os coeficientes D' para evidenciar as forças de atração ($D'+$) e de repulsão ($D'-$), sendo os predicados verbais classificados em: desequilíbrio fraco, moderado e forte (Medina-Acosta, 2013) (Tabela 9). Foi possível observar um total de 15 associações interalélicas multialélicas não aleatórias significativas, sendo 12 associações de atração ($D'+$ variou de 0,78168 a 0,35299192) e 3 associações de repulsão ($D'-$ variou de -0,51726 a -1). Dentre as 15 associações interalélicas, somente uma associação (Sota-05 alelo 238 / Sota-13 alelo 158) exibiu os alelos mais frequentes para ambos os *loci*. Para todas as 15 pares de associações interalélicas significativas, somente duas exibiram desequilíbrio global, evidenciando que somente a análise de desequilíbrio global não é suficiente para avaliar todas as forças evolutivas em equilíbrio de *loci* ligados ou não ligados fisicamente. A necessidade de ampliação das avaliações de desequilíbrio gamético global é evidenciado em outros estudos com outros sistemas biológicos (MEDINA-ACOSTA, 2010; MACHADO *et al.*, 2012). Somente a associação Sota-02 / Sota-05, (alelos 208 e 232, respectivamente), dos cinco *loci* sintênicos no cromossomo 5 exibiram desequilíbrio interalélico, sendo o alelo 208 do locus Sota-02 o alelo mais frequente, além de estarem bem próximos fisicamente, indicando possivelmente que o uso conjunto destes *loci* podem diminuir seu poder de discriminação (MEDINA-ACOSTA & MACHADO, 2011). Por outro lado, os *loci* (Sota-04 e Sota-12), sintênicos no cromossomo 2, não exibiram desequilíbrio gamético interalélico, sugerindo que estes *loci* podem segregar independentemente.

Tabela 9. Intensidade e significância dos desequilíbrios gaméticos interalélicos.

| Associação interloci | Significância do desequilíbrio global * | | Pares de alelos | Amostras | Intensity of sign-based disequilibrium ** | | | Alelo mais frequente | Sintênicos | |
|----------------------|---|-------------|-----------------|----------|---|------------|----------------|----------------------|------------|-----|
| | Valor-p (a) | Valor-p (b) | | | D'(+) | Chi-square | r ² | | | |
| Sota-01 / Sota-03 | 0,000000 | 0,000000 | 135/436 | 52 | 0,72613 | 7,21452 | 0,34448 | No | Não | Não |
| Sota-03 / Sota-07 | 0,495746 | 0,710373 | 412/284 | 42 | 0,61940 | 4,07365 | 0,13951 | Sim | Não | Não |
| Sota-03 / Sota-12 | 0,000000 | 0,005879 | 426/134 | 59 | 0,47369 | 5,22822 | 0,14112 | Não | Não | Não |
| Sota-05 / Sota-12 | 0,258474 | 0,392709 | 248/134 | 58 | 0,78168 | 5,47780 | 0,17015 | Não | Não | Não |
| Sota-05 / Sota-13 | 0,895194 | 0,999531 | 232/156 | 54 | 0,56004 | 4,81929 | 0,13139 | Não | Não | Não |
| Sota-05 / Sota-13 | 0,895194 | 0,999531 | 238/158 | 54 | 0,56004 | 6,48749 | 0,14971 | Sim | Sim | Não |
| Sota-07 / Sota-12 | 0,965779 | 0,984843 | 284/134 | 43 | 0,40038 | 4,14850 | 0,14872 | Não | Não | Não |
| Sota-08 / Sota-09 | 0,725295 | 0,999841 | 88/97 | 65 | 0,35299 | 4,16850 | 0,08547 | Não | Não | Não |
| Sota-08 / Sota-09 | 0,725295 | 0,999841 | 96/94 | 65 | 0,35299 | 4,76249 | 0,11354 | Não | Não | Não |
| Sota-08 / Sota-14 | 0,913830 | 1,000000 | 88/166 | 48 | 0,37911 | 4,15593 | 0,12192 | Não | Não | Não |
| Sota-09 / Sota-10 | 0,999526 | 0,999708 | 94/218 | 69 | 0,75173 | 5,06237 | 0,15121 | Não | Não | Não |
| Sota-10 / Sota-12 | 0,854317 | 0,613087 | 218/128 | 62 | 0,55240 | 4,33081 | 0,18591 | Não | Não | Não |
| Associação interloci | Valor-p (a) | Valor-p (b) | Pares de alelos | Amostras | D'(-) | Chi-square | r ² | Alelo mais frequente | Sintênicos | |
| Sota-02 / Sota-05 | 0,988590 | 0,999997 | 208/232 | 63 | -0,51726 | 8,52609 | 0,19736 | Sim | Não | Sim |
| Sota-03 / Sota-10 | 0,667554 | 0,840657 | 428/214 | 59 | -100,000 | 4,06854 | 0,10986 | Não | Sim | Não |
| Sota-08 / Sota-14 | 0,913830 | 1,000000 | 88/164 | 48 | -0,56052 | 8,67303 | 0,22870 | Não | Sim | Não |

* Significância do desequilíbrio gamético, sendo a- descarte de dados perdidos e b- inferência de dados perdidos. Estimado por teste exato de Fisher.

** Intensidade dos desequilíbrios gaméticos interalélicos, determinados por D'(+) e D' (-). Valores de r² para comparação.

Slatkin (2008) descreveu o desequilíbrio de ligação como uma simples associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*, e sua detecção não assegura uma ligação ou falta de equilíbrio. Inicialmente, as definições giravam em torno das frequências de gametas, permitindo o correto cenário de *loci* em diferentes cromossomos. Portanto, se um dos locus possui mais que dois alelos, somente a estatística de desequilíbrio global não seria suficiente para quantificar uma falta de equilíbrio. Assim sendo, os alelos em *loci* multialélicos não podem ser admitidos como um bloco homogêneo e além do desequilíbrio global, as análises de intensidade do desequilíbrio dependente de alelos específicos são muito necessários (ZAPATA *et al.*, 2001). Um outro aspecto importante é a aplicação de mapas de sintonia de *loci* microssatélites para análises de parentesco, assim como desenvolvido neste estudo.

Medina-Acosta (2013) indicou que as intensidades das associações podem ser determinadas pela estatística qui-quadrado com correção de Yates, valores de D, positivo e negativo, indicando frequências de associações mais elevadas ou menos elevadas que o esperado, e também r^2 , como uma alternativa de avaliação dependente de frequências, todos com significância $<0,05$. Afirma também que a magnitude do desequilíbrio pode ser afetada pela frequência e força *interloci*, atuando como indicador de frequências aleatórias extremas, taxa de mutação do alelo, varredura seletiva, deriva genética, fluxo gênico, taxa de recombinação, adição e história demográfica das populações. Gupta *et al.* (2005) mencionaram que vários fatores podem influenciar o desequilíbrio de ligação, sendo alguns responsáveis inclusive pelo seu aumento, como pequenos tamanhos populacionais, subdivisão populacional, seleção natural, entre outros. E alguns outros fatores podem ser responsáveis pela diminuição do desequilíbrio, como o acasalamento aleatório, elevadas taxas de recombinação e mutação. Apesar de seu estudo ser oriundo de estudos com plantas, ainda assim podemos admitir que diversos fatores naturais podem alterar as taxas de desequilíbrio de frequências gaméticas em populações animais.

Zapata *et al.* (2001) avaliaram um desequilíbrio de ligação em humanos através de alguns marcadores. Seus estudos revelaram que o desequilíbrio se estende por regiões maiores do genoma humano do que se acreditava anteriormente. Em seus estudos também demonstraram que a distribuição do desequilíbrio entre *loci* não estão necessariamente ligados no mesmo cromossomo ou em regiões de altas

frequências de recombinação. Medina-Acosta (2013) confirmou por meio de estudos com mapeamento e associação de genomas humanos, com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e microssatélites, que a variância de D' , ou seja, a força de desequilíbrio, não pode ser explicada somente pelo comprimento físico entre *loci*.

Os eventos recombinatórios são representantes de um importante processo de evolução na determinação do equilíbrio ou desequilíbrio gamético. Recomenda-se para as análises de parentesco, composição de grupos e padrões de dispersão em cetáceos, avaliar as associações interalélicas em desequilíbrio significativo e as intensidades destas associações.

6.9. ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL

Para as análises de estruturação, os espécimes foram divididos heurísticamente de acordo com a região de coleta, norte e sul, considerando como limite a coordenada geográfica at 20°03'18.8"S 40°11'26.8"W, entre os municípios de Serra e Aracruz.

O teste de estruturação por agrupamento Bayesiana estimou o valor ótimo de $K=2$ (Figura 12A), de acordo a metodologia de Evanno *et al.* (2005), indicando uma possível estruturação em 2 grupos. No entanto, todos os genótipos foram agrupados em um único *cluster*, sem separação entre os indivíduos do norte e do sul (Figura 12B).

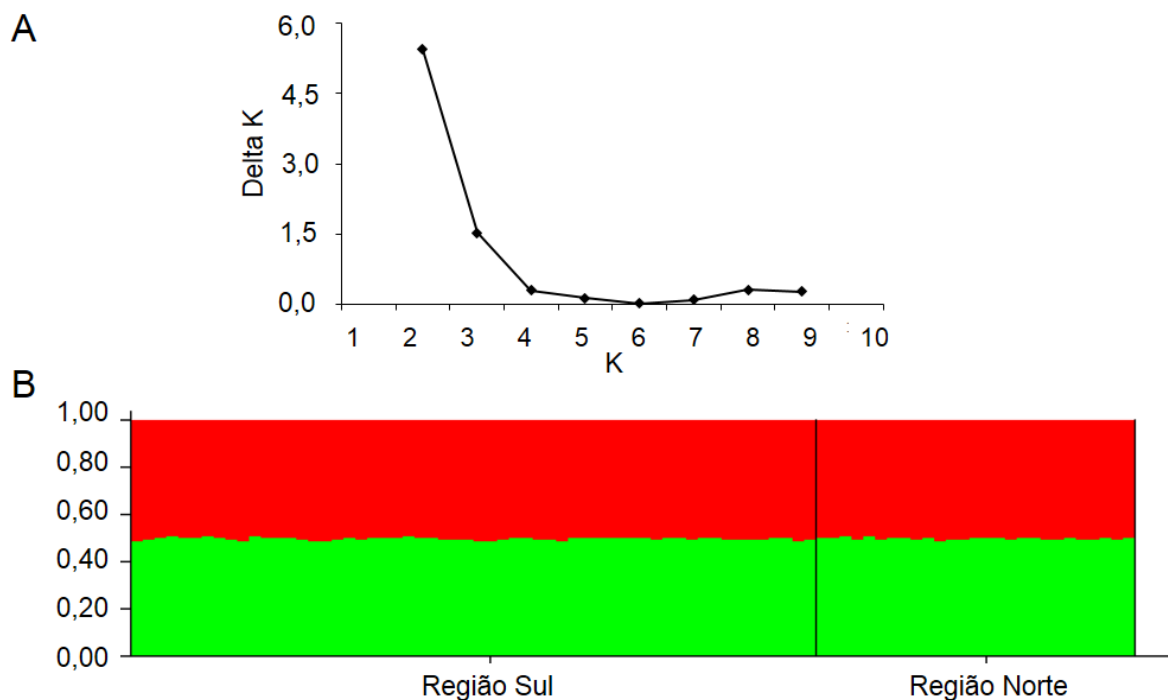


Figura 12. Análise bayesiana de agrupamento utilizando o programa Structure. (A) Valores de Delta K para cada valor de K. O maior valor de Delta K corresponde ao K=2 ótimo. (B) *Cluster* de estrutura, sem divisão clara em agrupamentos.

Maudet *et al.* (2002) afirmaram que o método de agrupamento bayesiano implementado em STRUCTURE tem sido comprovado como um instrumento poderoso nos casos em que a diferenciação genética é alta, testado nos estudos recentes de Perez-Alvarez *et al.* (2015), Allen *et al.* (2016) e Viricel *et al.* (2016). Perez-Alvarez *et al.* (2015), analisaram a diversidade genética do golfinho chileno em toda sua distribuição e identificaram, por meio da bayesiana de agrupamentos, duas populações distintas, correspondentes a região norte e sul do Chile. Allen *et al.* (2016) avaliaram populações de *Tursiops* spp. costeiros e oceânicos do noroeste da Austrália e identificaram três diferentes populações costeiras. Viricel *et al.* (2016) investigaram a estrutura genética de golfinhos rotadores no sudeste do Oceano Índico, e identificaram estrutura significativa para as três regiões estudadas. Os estudos citados possuíam histórico de investigação para as regiões, com análises que suportavam diferenças populacionais, sejam por parâmetros morfológicos, comportamentais ou características distintas de ambientes, atestando através do agrupamento bayesiano, claras diferenciações genéticas e agrupamentos bem delineados. Diferente do observado nessas pesquisas, Hollatz *et al.* (2011), não identificou estruturação genética de *S. guianensis* nas Baías de Sepetiba e Paraty, através da análise

bayesiana, mas considerou dos índices FST e RST plausíveis na distinção entre as duas populações, julgando o desempenho do programa Structure, como altamente dependente do número de *loci* utilizados.

A estatística F de Wright, FST = índice de fixação ou divergência genética entre populações, estimou FST= 0,009871, com limite inferior e superior de -0.000082 e 0.026423, respectivamente, mensurados através do Bootstrapping, com 30.000 repetições aleatórias, 95% de intervalo de confiança e assumindo EHW.

Estimou-se as distâncias genéticas de Nei para observar possíveis agrupamentos por similaridades entre os indivíduos amostrados. A composição dos indivíduos obtida a partir da matriz de distâncias genéticas foram agrupadas pelo método UPGMA e dispostas em um dendograma (Figura 13). É possível observar que do total dos 90 indivíduos analisados como duas populações, formaram-se dois grandes grupos. O agrupamento em azul, com 22% dos indivíduos, possui somente 15% de amostras oriundas da região norte do estado. Já o agrupamento preto reuniu os outros 78% dos indivíduos, com 36% oriundos da região norte e 64% da região sul do estado. A análise evidenciou dois grupos, contudo, ambos agrupamentos incluíram indivíduos das regiões norte e sul do estado.

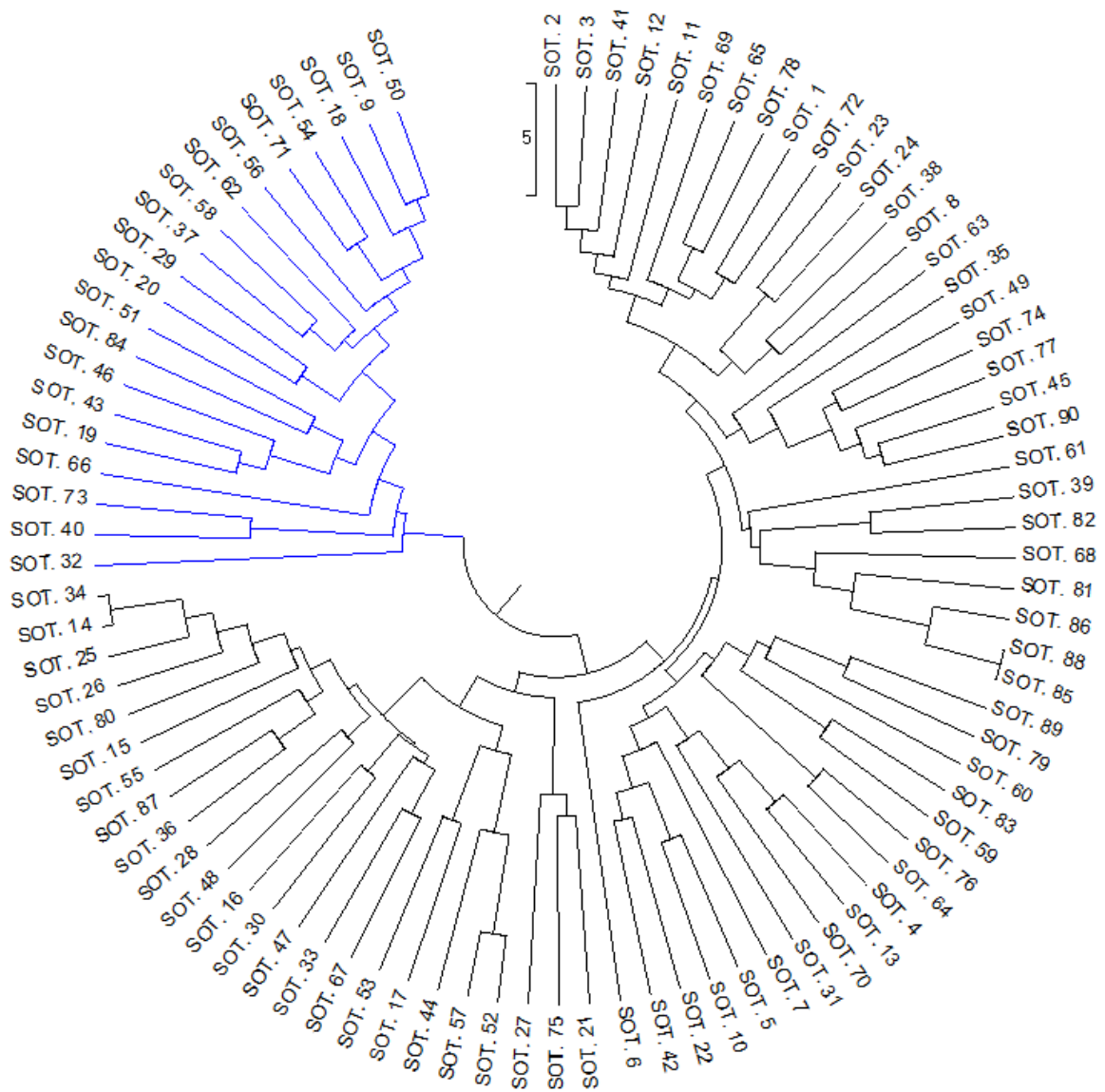


Figura 13. Dendrograma de similaridade pela distância genética de Nei e agrupadas pelo método UPGMA para *Sotalia guianensis* do Espírito Santo, genotipadas por meio de 14 marcadores microssatélites e criada no programa MEGA.

Considerando a faixa de valores para diferenciação genética entre as populações, proposta por Wrigth (1965), segundo a qual os valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada, e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação, o valor

estimado de FST para *S. guianensis* do norte e sul do Espírito Santo foi considerado baixo, indicando que os indivíduos não se estruturaram.

Para *S. guianensis* da Baía de Sepetiba e Baía de Paraty avaliadas por marcadores microsatélites, Hollatz *et al.* (2011) encontraram o valor de $F_{ST}=0,040$ entre as regiões estudadas, admitiram uma estruturação significativa entre as regiões e sugeriram que os indivíduos das duas localidades poderiam não acasalar entre si. Contudo, Wright (1965) diverge por considerar esse valor como baixa estruturação, o que condiz com a falta de divisão populacional reportada pela análise bayesiana para a região e posteriormente com as análises mitocondriais de Cunha *et al.* (2010), que considera as *S. guianensis* do sudeste-sul (Rio de Janeiro a Santa Catarina) como uma única unidade populacional. No Chile, Perez-Alvarez *et al.* (2015) identificaram duas populações de golfinhos chilenos, norte e sul, onde obtiveram um valores de $F_{ST}=0,15$, considerado como alta estruturação pelos autores. Diferente dos Botoscinza, residentes nas Baías de Sepetiba e de Paraty e separados por apenas 60 km, os golfinhos chilenos não possuem aparente barreiras geográficas nos seus mais de 6000 km de litoral, sendo proposto que a diferenciação encontrada pode ser reflexo de distintas adaptações ecológicas, como o habitat e uso de recursos. Com isso alertam para que as populações sejam consideradas como duas unidades de conservação com estratégias de manejo independentes.

Gaspari *et al.* (2007) encontraram $F_{ST}=0,0296$ para uma população do Golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*) em águas britânicas, sendo que a diferenciação foi considerada significativamente alta com base em oito *loci* microsatélites. Mirimin *et al.* (2009) avaliaram as populações de golfinho comum (*Delphinus delphis*) no Oceano Atlântico Norte através de marcadores mitocondriais e microsatélites. Os resultados de estruturação genética foram mais expressivos para as análises mitocondriais ($F_{ST}=0,018$) do que nos microsatélites ($F_{ST}=0,005$), mas identificou a presença de pelo menos duas populações distintas. Outros estudos em grandes escalas geográfica com populações de diferentes regiões e espécies, encontraram distintos valores de FST, como 0,034 para *T. truncatus* do Golfo do México e Oceano Atlântico Ocidental (ROSEL *et al.*, 2009), 0,05 para *T. aduncus*, na Austrália (ANSMANN *et al.*, 2012).

Muitas variações na genética populacional são observadas e, segundo Hartl e Clark (2010) as populações podem sofrer interferências de fatores que delineiam a

estruturação, como a deriva genética, o fluxo gênico, a mutação e a seleção. Afirmam ainda que quanto maior for a deriva, as mutações e a seleção, maior será a estruturação genética. E quanto mais acentuado for o fluxo gênico, menor a probabilidade de estruturação populacional.

Em relação as distâncias geográficas e diferenças populacionais, a primeira não exerce desacompanhada influência na diferenciação genética. Richards *et al.* (2013) consideraram interessante, em sua análise de estrutura genética espacial de *T. truncatus*, a presença de estruturação em distâncias geográficas muito pequenas, <30 km. Já Viricel *et al.* (2014), avaliando populações de *S. frontalis* encontrou diferenças entre os indivíduos de regiões mais próximas geograficamente e, ao mesmo tempo, não identificou qualquer diferença entre os estoques que estão separados por mais de 4500 km, afirmando que somente a distância geográfica não pode ser uma determinante sobre as populações. Em outros estudos, com *T. truncatus*, foram encontradas diferenças genéticas entre populações de pequenas e grandes distâncias, assim como diferentes habitats (KRUTZEN *et al.*, 2004, NATOLI *et al.*, 2005, MOLLER *et al.*, 2007).

É importante indicarmos que muitos estudos se baseiam em um conjunto de dados, como marcadores moleculares, mitocondriais e/ou microssatélites. Além disso, para algumas regiões, um número maior de informações sobre as populações foram investigadas e estão disponíveis, como comportamento, distribuição, conteúdo estomacal, padrão de grupos e informações bióticas e abióticas sobre as localidades.

Martin & Reeves (2002) chamaram a atenção para o ambiente marinho e afirmaram que os limites de fluxo gênico são difíceis de prever, principalmente para muitas espécies de cetáceos, que habitam uma variedade de habitats, costeiros ou oceânicos, em águas tropicais, temperadas e polares, além de algumas espécies ainda realizarem migrações. Diversos fatores são citados como influentes na distribuição dos vertebrados marinhos, tais como profundidade, temperatura e produtividade dos oceanos (BILGMANN *et al.*, 2007 e AMARAL *et al.*, 2012). As variações afetam a produtividade local, e por consequência podem afetar a distribuição das presas dos delfinídeos, influenciando também na sua distribuição e abundância (FULLING *et al.*, 2003). Diferenças nas estratégias de alimentação também são sugeridas como especializações capazes de fracionar nichos para algumas espécies (VIRICEL *et al.*, 2014). Storz (1999) cita o comportamento social

como outro fator importante para a estruturação genética de mamíferos que vivem em grupos, já que a sociabilidade pode se reduzir, levando a uma potencial endogamia e diferenciação genética. Krause & Ruxton (2002) indicaram que a segregação de indivíduos de uma população em grupos ou unidades sociais pode estar relacionada com sexo, idade, alimentação, comportamento, uso do habitat, companhias preferenciais, entre outros fatores.

Cetáceos evidenciam com frequência estrutura genética em suas populações, algumas vezes em escalas geográficas e em outras esta estrutura pode ser críptica (HOELZEL, 2009). Para os delfínidos a estruturação é mais evidente em espécies costeiras, onde podem existir barreiras geográficas que isolam populações (NATOLI *et al.*, 2005), ou como evidenciado em alguns estudos, influência do clima (AMARAL *et al.*, 2012). A atividade antrópica tem sido responsável pela mortalidade de muitos cetáceos, principalmente de delfínidos, reduzindo a variabilidade genética em muitas populações (PICHLER & BAKER, 2000). Perda da diversidade e estruturação genética pode acometer pequenas e/ou fragmentadas populações, o que por consequência aumenta os riscos de extinção das espécies acometidas (FRANKHAM *et al.*, 2012). No mediterrâneo, *D. delphis*, foram classificados pela IUCN como ameaçada de extinção após uma extensiva redução no tamanho da população, julgando como consequência do esgotamento de presas e acidentes com atividades de pesca (BEARZI *et al.*, 2003).

Todas as informações adicionais acerca do comportamento, da formação de grupos, uso de habitat, alimentação e outros bióticos e abióticos são raras ou inexistentes para os cetáceos do Espírito Santo, além da falta de conhecimento da região, como relevo oceânico, temperatura, profundidades, salinidade, barreiras e qualquer variação que possa existir, são ainda desconhecidas. A falta de informações afeta uma análise global de todos os processos e fatores que podem influenciar na distribuição dos espécimes dentro da região.

A população de *S. guianensis* do Espírito Santo, que permanecia sem informações de diversidade e estruturação genéticas e compõe a lista de espécies ameaçadas de extinção no Brasil, constitui-se uma única unidade populacional, evidenciando fluxo gênico e alta variabilidade entre os espécimes de toda a costa.

7. CONCLUSÕES

- A análise de desequilíbrio gamético global, desacompanhada de avaliações de intensidade e significância interalélicas, não é suficiente para definir forças evolutivas sobre equilíbrio de *loci* fisicamente ligados ou não.
- *S. guianensis* distribuídas pela costa do estado do Espírito Santo, constituem um seguimento populacional com baixa estruturação baseado nas avaliações de 14 *loci* microsatélites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-GUTIÉRREZ, A.; DI BERARDINIS, A.; LARKIN, S.; FORESTELL, K.L.A.P. Social interactions between tucuxis and bottlenose dolphins in Gandoca-Manzanillo, Costa Rica. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 4, n. 1, p. 49-54. 2005.

ADAMS, L. D.; ROSEL, P.E. Population differentiation of the Atlantic spotted dolphin (*Stenella frontalis*) in the western North Atlantic, including the Gulf of Mexico. **Marine Biology**, v. 148, p. 671–681. 2006.

ALLEN, S. J.; BRYANT, K. A.; KRAUS, R. H. S; LONERAGAN, N. R.; KOPPS, A. M.; BROWN, A. M.; GERBER, L.; KRUTZEN, M. Genetic isolation between coastal and fishery-impacted, offshore bottlenose dolphin (*Tursiops* spp.) populations. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 12, p. 2735-2753. 2016.

AMARAL, A. R.; BEHEREGARAY, L. B.; BILGMANN, K.; FREITAS, L.; ROBERTSON, K. M.; SEQUIERA, M.; STOCKIN, K. A.; COLEHO, M. M.; MÖLLER, L. M. A multilocus perspective on the worldwide population structure of common dolphins (genus *Delphinus*). In: **International Whaling Commission**. Paper SC/62/SM2. 12p. 2010.

ANSMANN, I.C.; PARRA, G.J.; LANYON, J.M.; SEDDON, J.M. Fine-scale genetic population structure in a mobile marine mammal: inshore bottlenose dolphins in Moreton Bay, Australia. **Molecular Ecology**, v.21, p. 4472–4485. 2012.

ARCHER, F.; GERRODETTE, T.; DIZON, A.; ABELLA, K.; SOUTHERN, S. Unobserved kill of nursing dolphin calves in a tuna purse-seine fishery. **Marine Mammal Science**, v.17, p. 540-554. 2001.

ARNASON, U. Comparative chromosome studies in Cetacea. **Hereditas**, v. 77, p. 1-36. 1974.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, GECELE, M.; BERED, F., FAY, M.F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, n. 18, p. 3759-3767. 2007.

BARBOSA, A. C. O. F. **Avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de primers para otimização de sistemas multiplex de genotipagem**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2010.

BARNES, L.G. An Early Miocene long-snouted marine platanistid dolphin (Mammalia, Cetacea, Odontoceti) from the Korneuburg Basin (Austria). **Beiträge zur Paläontologie**, v. 27, p. 407-418. 2002.

BEARZI, G.; REEVES, R.R.; NOTARBARTOLO DI SCIARA, G.; POLITI, E.; CAÑADAS, A.; FRANTZIS, A.; MUSSI, B. Ecology, status and conservation of short-beaked common dolphins *Delphinus delphis* in the Mediterranean Sea. **Mammal Review**, v. 33, p. 224–252. 2003.

BIELEC, P. E.; GALLAGHER, D. S.; WOMACK, J. E.; BUSBEE, D. L. Homologies between human and dolphin chromosomes detected by heterologous chromosome painting. **Cytogenet and Cell Genetics**, v.81, p. 18- 25. 1998.

BILGMANN, K.; MOLLER, L. M.; HARCOURT, R. G.; GIBBS, S. E.; BEHEREGARAY, L. B. Genetic differentiation in bottlenose dolphins from South Australia: association with local oceanography and coastal geography. **Marine Ecology Progress Series**, v.341, p. 265–276. 2007.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331. 1980.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão. 111p. 2007.

BRUFORD, M. W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J. F. Y.; BURKE, T. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOELZEL, C. A. R. **Molecular Genetic Analyses of Populations: A Pratical Approach**. Oxford University Press: New York. p. 225-269. 1992.

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.

BUCHANAN, F. C.; VAN KESSEÇ, A. G.; WALDNER, C.; CHISTENSEN, D. A.; LAARVELD, B.; SCHMUTZ, S. M. Hot topic: an association between a letin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3164-3166. 2003.

BUDOWLE, B.; BROWN, B. L. The use of DNA typing for forensic identification. **Forénsica**, v.1, n.1, p.23-37. 2001.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, n.10, p. 1040-1050. 2006.

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.

CABALLERO, A.; QUESADA, H.; ROLAN-ALVAREZ, E. Impact of amplified fragment length polymorphism size homoplasy on the estimation of population genetic diversity and the detection of selective *loci*. **Genetics**, v. 179, p. 539-554. 2008.

CALDWELL, M.; GAINES, M.; HUGHES, C. R. Eight polymorphic microsatellite *loci* for bottlenose dolphin and other cetacean species. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 393–395. 2002.

CASTILHO, C. S.; PEDONE-VALDEZ, F.; BERTUOL, F.; FRUET, P.; GENOVES, R. C.; DI TULLIO, J. C.; FREITAS, T. R. O. Insights about the genetic diversity and population structure of an offshore group of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Mid-Atlantic. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 3387-3399. 2015.

CHEN, T.; HUNG, S. K.; QIU, Y. S.; JIA, X. P.; JEFFERSON, T. A. Distribution, abundance, and individual movements of Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in the Pearl River Estuary, China. **Mammalia**, v. 74, p. 117–125. 2010.

CRESPO, E. A.; BOROBIA, M.; ALARCON, D. T.; ALONSO, M. B.; BAZZALO, M.; CREMER, M. J.; FILLA, G.; MAGALHÃES, F. A.; MARIGO, J.; QUEIRÓZ, H.; REYNOLDS III, J. E.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; WETZEL, D. L.; DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO JR., J. Report of the working group on major threats and conservation. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 8, n. 1-2, p. 47-56. 2010.

COUGHLAN, J.; MIRIMIN, E.; 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, p. 490-494. 2006.

CUNHA, H. A.; DA SILVA, V. M. F.; LAILSON-BRITO JR, J.; SANTOS, M. C. O.; FLORES, P. A.; 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. **Marine Biology**, n. 148, p. 449-457. 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.

CUNHA, H.; SOLÉ-CAVA, A. M. Molecular sexing of tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*) using samples from biopsy darting and decomposed carcasses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 1186–1188. 2007.

CUNHA H. A.; DA SILVA, V. M. F.; SOLÉ-CAVA, A. M. Molecular Ecology and Systematics of *Sotalia* Dolphins. p. 261-283. In: RUIZ-GARCIA, M.; SHOSTELL, J.M. (eds). **Biology, Evolution and Conservation of River Dolphins**. New York: Nova Science Publishers. p. 504. 2010.

CURREY, R. J. C.; DAWSON, S. M.; SLOOTEN, E. An approach for regional threat assessment under IUCN Red List criteria that is robust to uncertainty: the Fiordland bottlenose dolphins are critically endangered. **Biological Conservation**, v. 8, p.1570–1579. 2009.

CYPRIANO-SOUZA, A. L.; FERNÁNDEZ, G. P.; LIMA-ROSA, C. A. V.; ENGEL, M. H.; BONATTO, S. L. Microsatellite genetic characterization of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) Breeding Ground off Brazil (Breeding Stock A). **Journal of Heredity**, v. 101, n. 2, p. 189- 200. 2010.

DA SILVA, V. M. F.; FETTUCCIA, D.; RODRIGUES, E.S.; EDWARDS, H.; MORENO, I. B.; MOURA, J. F.; WEDEKIN, L. L.; BAZZALO, M.; EMIN-LIMA, N. R.; CARMO, N. A. S.; SICILIANO, S.; UTRERAS B., V. Report of the Working Group on Distribution, Habitat Characteristics and Preferences, and Group Size. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 8, n. 1-2, p. 31-38. 2010.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509. 2004.

DAURA-JORGE, F. G.; WEDEKIN, L. L.; SIMÕES-LOPES, P. C. Feeding habits of the Guiana dolphin, *Sotalia guianensis* (Cetacea: Delphinidae), in Norte Bay, southern Brazil. **Scientia Marina**, v. 75, n. 1, p.163-169. 2011.

DEFRAN, R. H.; WELLER, D. W.; KELLY, D. L.; ESPINOSA, M. A. Range characteristics of Pacific coast bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Southern California Bight. **Marine Mammal Science**, v.15, p. 381–393. 1999.

DÍAZ-LÓPEZ, B.; SHIRAI, J. A. B. Marine aquaculture and bottlenose dolphins' (*Tursiops truncatus*) social structure. **Behavioural Ecology and Sociobiology**, v. 62, p. 887–894. 2008.

DI BENEDITTO, A. P. M.; SICILIANO, S.; RAMOS, R. M. A. **Cetáceos: Introdução a Biologia e a Metodologia Básica para o desenvolvimento de Estudos**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 100 p. 2010.

DIZON, A. E.; PERRIN, W. F. Report of the workshop. p. 3-48. In: DIZON, A. E.; CHIVERS, S. J.; PERRIN, W. F. (eds). **Molecular Genetics of Marine Mammals**. Kansas: Society for Marine Mammalogy Special Publication, Allen Press. p. 388. 1997.

DUSSÁN-DUQUE, S.; WELLS, R. S.; BASSOS-HULL, K. Distribución, uso de habitat y abundancia de *Sotalia guianensis* en el Golfo de Morrosquillo, Colombia. In:

WORKSHOP ON RESEARCH AND CONSERVATION OF THE GENUS *SOTALIA*, 2006, Armação dos Búzios. **Anais...** Rio de Janeiro. p. 15. 2006.

EARL, D. A.; VON-HOLDT, B. M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359–361. 2012.

EDWARDS, H.; SCHNELL, G. Status and ecology of *Sotalia fluviatilis* in the Cayos Misquitos Reserve, Nicaragua. **Marine Mammal Science**, v. 17, n. 3, p. 445-472. 2001.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews – Genetics**, v. 5, p. 435-445. 2004.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A. et al. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A window to ruminant biology and evolution The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522–528. 2009.

EROĞLU, H. E. Which chromosomes are submetacentric or acrocentric? A new karyotype symmetry/asymmetry index. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 68, n. 3, p. 239-245. 2015.

ESCORZA-TREVIÑO, S.; DIZON, A. E. Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1049-1060. 2000.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620. 2005.

FARRO, A. P. C. **Variabilidade genética de golfinhos rotadores (*Stenella longirostris*) a partir de marcadores microssatélites**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 117p. 2006.

FELDHAMER, G. A.; DRICKAMR, L. C.; VESSEY, S. H.; MERRITT, J. F. **Mammalogy: adaptation, diversity and ecology**. Boston: McGraw-Hill. 563 p. 1999.

FESGUSON, S.; TRIFONOV, V. Mammalian karyotype evolution. **Nature. Reviews Genetics**, v. 8, p. 950-962. 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220 p. 1995.

FLACH, L.; FLACH, P. A.; CHIARELLO, A. G. Aspects of behavioral ecology of *Sotalia guianensis* in Sepetiba Bay, southeast Brazil. **Marine Mammal Science**, v. 24, p. 503-515. 2008.

FLORES P. A. C.; DA SILVA V. M. F. Tucuxi and Guiana Tucuxi. p. 1188-1192. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (eds). **Encyclopedia of Marine Mammals**. San Diego: Academic Press. 1352 p. 2009.

FLORES, P. A. C. **Ecology of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in southern, Brazil**. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2003.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, S. J. E.; PIRY, S.; RAY, N.; TOLLEY, K. A.; DUKE, S.; BIRKUN JR., A.; FERREIRA, M.; JAUNIAUX, T.; LLAVONA, A.; ÖZTÜRK, B.; RIDOUX, V.; ROGAN, E.; SEQUEIRA, M.; SIEBERT, U.; VIKINGSSON, G. A.; BOUQUEGNEAU, J. M.; MICHAUX, J. R.. Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in old world waters. **BMC Biology**, v. 5, n. 1, p. 30-46. 2007.

FOOTE, A. D.; LIU, Y.; THOMAS, G. W.; VINAŘ, T.; ALFÖLDI, J.; DENG, J. et al. Convergent evolution of the genomes of marine mammals. **Nature genetics**, v. 47, n. 3, p. 272-275. 2015.

FRASIER, T. R.; RASTOGI, T.; BROWN, M. W.; HAMILTON, P.; KRAUS, S. D.; WHITE, B. N. Characterization of tetranucleotide microsatellite *loci* and development and validation of mul tiplex reactions for the study of right whale species (genus *Eubalaena*). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1025–1029. 2006.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 280. 2008.

FRUET, P. F.; SECCHI, E. R.; DAURA-JORGE, F.; VERMEULEN, E.; FLORES, P. A.; SIMOES-LOPES, P. C.; GENOVES, R. C.; LAPORTA, P.; DI TULLIO, J. C.; FREITAS, T. R. O.; DALLA ROSA, L.; VALIATI, V. H.; BEHEREGARAY, L. B.; MÖLLER, L. M. Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 4, p. 879-895. 2014.

FULLING, G. L.; MULLIN K. D.; HUBARD C. W. Abundance and distribution of cetaceans in outer continental shelf waters of the U.S. Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, v. 101, p. 923-932. 2003.

GALOV, A.; KOCIJAN, I.; LAUC, G.; GOMERČIĆ, M. Đ.; GOMERČIĆ, T.; ARBANASIĆ, H.; ŠATOVIĆE, Z.; ŠEOLF, B.; VUKOVIĆC, S.; GOMERČIĆC H. High genetic diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 76, n. 3, p. 339-344. 2011.

GASPARI, S.; AZZELLINO A.; AIROLDI, S.; HOELZEL, A. R. Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 14, p. 2922-2933. 2007.

GRAVENA, W.; HRBEK, T.; DA SILVA, V. M. S.; ASTOLFI-FILHO, S.; FARIAS, I. P. Microsatellite *loci* for population and parentage analysis in the Amazon River dolphin (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 600–603. 2009.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 591–611. 2011.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 461-485. 2005.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. **Revista árvore**, v. 30, n. 4, p. 491-501. 2006.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers: Massachusetts. 2010.

HERALD, E.S. Boto and tookuchee-Amazon dolphins. **Pacific Discovery**, v. 20, p. 2-9. 1967.

HOLLATZ, C.; TORRES VILAÇA, S.; REDONDO, R.A.F.; MARMONTEL, M.; BAKER, C.S.; SANTOS, F. R. The Amazon River system as an ecological barrier driving genetic

differentiation of the pink dolphin (*Inia geoffrensis*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 102, p. 812-827. 2011.

HUBNER, A. ; MORALES S. J. D.; NASCIMENTO, A. L. C. P. ; SILVA, A. V. M. P.; GUIMARÃES, A. L. S.; FOPPEL, E.; FARIAS. R. C.; OLIVEIRA, E. C. Registro de interação negativa entre *Sotalia guianensis* (VAN BÉNÉDEN, 1864) e atividades pesqueiras no litoral sergipano. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu – MG. 2007.

HUSSON, A.M. **The Mammals of Suriname**. E.J. Brill, Leiden, The Netherlands. 569 p. 1978.

IBAMA. **Mamíferos aquáticos do Brasil: plano de ação**. Versão II. Brasília: Edições IBAMA. 61 p. 2001.

ICMBio . **Lista das espécies ameaçadas de extinção**. Portarias MMA nº 444/2014 e nº 445/2014 BRASIL: Brasília. 2014.

IPCC. **Climate Change (2001): Synthesis Report**. Cambridge, New York: Cambridge University. 397p. 2002.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. 2012. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: Junho de 2016.

IUCN, **IUCN Red List of Threatened Species**, 2015. Version 2015-4. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: Julho de 2016.

IWC. International Whaling Commission. Report of the sub-committee on Southern Hemisphere minkewhales. **Report of the Internacional Whaling Commnission**. v. 41, n. 1, p. 13-31. 1991.

JAYASANKAR, P.; ANOOP, B.; RAJAGOPALAN, M.; PCR-based sex determination of cetaceans and dugong from the Indian seas. **Current Science**, v. 94, p. 1513-1516. 2008.

JEFFERSON, T.A. Morphology of Clymene Dolphin (*Stenella clymene*) in the northern Gulf of Mexico. **Aquatic Mammals**, v.22, p. 35-43. 1996.

JEFFERSON, T. A.; WEBBER, M. A.; PITMAN, R. L. **Marine Mammals of the World: A Comprehensive Guide to Their Identification**. USA: Academic Press. 592 p. 2008.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099-1106. 2007.

KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; ROSKIN, K. M.; PRINGLE, T. H.; ZAHLER, A. M.; HAUSSLER, D.. The human genome browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, n. 6, p. 996-1006. 2002.

KRAUSE, J.; RUXTON, G. D. **Living in Groups**. Oxford: Oxford University Press. 2002.

KRUTZEN, M.; VALSECCHI, E.; CONNOR, R. C.; SHERWIN, W. B. Characterization of microsatellite *loci* in *Tursiops aduncus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 170–172. 2001.

KRUTZEN, M.; SHERWIN, W. B.; BERGGREN, P.; GALES, N. Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: Bottleneck dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. **Marine Mammal Science**, v. 20, p. 28–47. 2004.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. V. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1 (d16c). 2001.

LINDBLAD-TOH, K.; GARBER, M.; ZUK, O.; LIN, M. F.; PARKER, B. J.; WASHIETL, S.; KHERADPOUR, P.; ERNST, J.; JORDAN, G.; MAUCELI, E.; WARD, L. D.; LOWE, C. B.; HOLLOWAY, A. K.; CLAMP, M.; GNERRE, S.; ALFOLDI, J.; BEAL, K.; CHANG, J.; CLAWSON, H.; CUFF, J.; DI PALMA, F.; FITZGERALD, S.; FLICEK, P.; GUTTMAN, M.; HUBISZ, M. J.; JAFFE, D. B.; JUNGREIS, I.; JAMES KENT, W.; KOSTKA, D.; LARA, M.; MARTINS, A. L.; MASSINGHAM, T.; MOLTKE, I.; RANEY, B. J.; RASMUSSEN, M. D.; ROBINSON, J.; STARK, A.; VILELLA, A. J.; WEN, J.; XIE, X.; ZODY, M. C.; WORLEY, K. C.; KOVAR, C. L.; MUZNY, D. M.; GIBBS, R. A.; WARREN, W. C.; MARDIS, E. R.; WEINSTOCK, G. M.; WILSON, R. K.; BIRNEY, E.; MARGULIES, E. H.; HERRERO, J.; GREEN, E. D.; HAUSSLER, D.; SIEPEL, A.; GOLDMAN, N.; POLLARD, K. S.; PEDERSEN, J. S.; LANDER, E. S.; KELLIS, M. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. **Nature**, v. 478, n. 7370, p. 476–482. 2011.

LODI, L. F. Conservação do boto cinza na Baía de Parati. **Ciência Hoje**, v. 199, n. 34, p. 66-69. 2003a.

LODI, L. F. Tamanho e composição de grupo dos botos-cinza, *Sotalia guianensis* (van Bénéden, 1864) (Cetacea, Delphinidae), na baía de Parati, Rio de Janeiro, Brasil. **Atlântica**, v. 25, n. 2, p. 135-146. 2003b.

LODI, L. F.; BOROBIA, M. Baleias, **botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação**. Rio de Janeiro: Technical Books. 2013.

LODI, L. F.; HETZEL, B. Grandes agregações do botocinza (*Sotalia fluviatilis*) na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro. **Bioikos**, v. 12, n. 2, p. 26-30. 1998.

MACHADO, F. B.; ALVES DA SILVA, A. F.; ROSSETTI, L. C.; DE BRASI, C. D.; MEDINA-ACOSTA, E. Informativeness of a novel multiallelic marker-set comprising an F8 intron 21 and three tightly linked *loci* for haemophilia A carriership analysis. **Haemophilia**, v. 17, n. 2, p. 257–266. 2011.

MARTIN, A. R.; REEVES, R. R. Diversity and zoogeography. In :. HOELZEL, A. R. **Marine mammal biology: An evolutionary approach** Oxford, UK: Blackwell Publishing. p. 1-37. 2002.

MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 942–950. 2002.

MC GOWEN, M. R.; SPAULDING, M.; GATESY, J. Divergence date estimation and a comprehensive molecular tree of extant cetaceans. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 53, n. 3, p. 891-906. 2009.

MEDINA-ACOSTA, E. Evidence of partial and weak gametic disequilibrium across clusters of pericentromeric short tandem repeats *loci* on human X chromosome: Proceed with caution in forensic genetics. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 5, p. 545–547. 2011.

MEDINA-ACOSTA, E. Gametic disequilibrium. In: Maloy, S.; Hughes, K. (ed.) **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. vol. 3, p. 151-153. 2013.

MEDINA-ACOSTA, E.; MACHADO, F. B.; Eyes wide open: the (mis) use of combined power of discrimination for X-linked short tandem repeats. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 6, p. 4003-4006. 2011.

MENDEZ, M.; ROSENBAUM, H. C.; BORDINO, P. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts and management implications. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 2, p. 419-135. 2008.

MENDEZ, M.; ROSENBAUM, H. C.; SUBRAMANIAM, A.; YACKULIC, C.; BORDINO, P. Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 2212–2228. 2010.

MILLS, L. S.; SMOUSE, P. E. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. **American Naturalist**, v. 144, p. 412-431. 1994.

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.

MIRIMIN, L.; WESTGATE, A.; ROGAN, E.; ROSEL, P. E.; READ, A; COUGHLAN J.; CROSS, T. Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. **Marine Biology**, v. 156, n. 5, p. 821-34. 2009.

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, 1939). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, p. 478-482. 2005.

MÖLLER, L. M.; BEHEREGARAY, L. B. Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). **Molecular Ecology**, v. 13, n. 6, p. 1607–1612. 2004.

MOLLER, L. M.; WISZNIEWSKI, J.; ALLEN, S. J.; BEHEREGARAY, L. B. Habitat type promotes rapid and extremely localised genetic differentiation in dolphins. **Marine and Freshwater Research**, v. 58, p. 640–648. 2007.

MÖLLER, L.; VALDEZ, F. P.; ALLEN, S.; BILGMANN, K.; CORRIGAN, S.; BEHEREGARAY, L. B. Fine-scale genetic structure in short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) along the East Australian Current. **Marine Biology**, v. 158, p. 113–126. 2011.

MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. Skull shape and size divergence in dolphins of the genus *Sotalia*: a tridimensional morphometric analysis. **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 1, p. 125-134. 2002.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 155 p. 335-350. 1987.

NATOLI, A.; BIRKUN, A.; AGUILAR, A.; LOPEZ, A.; HOELZEL, A. R. Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1569, p. 1217–1226. 2005.

NATOLI, A.; PEDDEMORS, V.M.; HOELZEL, A.R. Population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) impacted by catch along the east coast of South Africa. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 627-636. 2007.

O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 91, p. 5748–5755. 1994.

OLIVEIRA, L. R.; OTT, P. H.; MORENO, I. B.; TAVARES, M.; SICILIANO, S.; BONATTO, S. L. Effective population size of an offshore population of bottlenose

dolphins, *Tursiops truncatus*, from the São Pedro and São Paulo Archipelago, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 11, p. 162-169. 2016.

PARSONS, K.M.; DURBAN, J.W.; CLARIDGE, D.E., HERZING, D.L.; BALCOMB, K. C.; NOBLE L. R. Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Bahamas. **Marine Mammal Science**, v. 22, p. 276–298. 2006.

PASBØLL, P. J.; VADER, A.; BAKKE, I.; EL-GEWELY, M. R. Gender determination in cetaceans by the polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, p. 2166–2170. 1992.

PATENAUDE, N. J.; PORTWAY, V. A.; SCHAEFF, C. M.; BANNISTER J. L.; BEST, P.B.; PAYNE R. S; ROWNTREE, V. J.; RIVAROLA, M.; BAKER, C. S. Mitochondrial DNA diversity and population structure among southern right whales (*Eubalaena australis*). **Journal of Heredity**, v. 98, p.147–157. 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288–295. 2006.

PÉREZ-ÁLVAREZ, M. J.; OLAVARRÍA, C., MORAGA, R.; BAKER, C.; HAMNER, R.; POULIN, E. Microsatellite markers reveal strong genetic structure in the endemic Chilean dolphin. **PLOS ONE**, v.10 (4). 2015.

PERRIN, W. F. **Banco de Dados Mundial de cetáceos**. 2013. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/cetacea>. Acesso em: Junho de 2016.

PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. **Encyclopedia of Marine Mammals**. San Diego: Academic Press. 1352 p. 2009.

PICHLER, F. B.; BAKER, C. S. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 2, p. 97-102. 2000.

PICHLER, F. B.; DAWSON, S. M.; SLOOTEN, E.; BAKER, C. S. Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. **Conservation Biology**, v. 12, n. 3, p. 676- 682. 1998.

RAMOS, R. M. A.; DI BENEDITO, A. P. M.; LIMA, N. R. W. Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. **Aquatic Mammals**, v. 26, n. 1, p. 65-75. 2000.

REEVES, R. R.; LEATHERWOOD, S. **Dolphins, Porpoises and Whales: 1994–1998 Action plan for the conservation of cetaceans**. Switzerland and Cambridge: IUCN - International Union for Conservation of Nature. 91 p. 1994.

REEVES, R. R.; MCCLELLAN, K.; WERNER, T. B. Marine mammal by catch in gillnet and other entangling net fisheries, 1990 to 2011. **Endangered Species Research**, v. 20, p. 71–97. 2013.

REEVES, R. R.; SMITH, B. D.; CRESPO, E. A.; NOTARBARTOLO DI SCIARA, G. **Dolphins, whales and porpoises: 2002–2010 Conservation action plan for the world's cetaceans**. Switzerland and Cambridge: IUCN - International Union for Conservation of Nature. 139 p. 2003.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. In: **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Ed. UEL. 437 p. 2006.

RICHARD, K. R.; MCCARREY, S. W.; WRIGHT, J. M. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, p. 873–877. 1994.

ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P.; BEATTIE, C.W. A microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, v. 136, n. 1, p. 231-245. 1994.

ROONEY, A. P.; MERRITT, D.B.; DERR, J. N. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Heredity**, v. 90, p. 228–231. 1999.

ROSEL, P. E.; HANSEN, L.; HOHN, A. A. Restricted dispersal in a continuously distributed marine species: bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic. **Molecular Ecology**, v.18, p. 5030–5045. 2009.

ROSEL, P. F.; HAYGOOD, M. G.; PERRIN, W. F. Phylogenetic relationships among the true porpoises (Cetacea:*Phocoenidae*). **Molecular Phylogenetics and Evolutions**, v. 4, p. 463–474. 1995.

ROSSI-SANTOS, M. R.; WEDEKIN, L. L.; SOUSA-LIMA, R. S. Distribution and habitat use of small cetaceans in the coast of the Abrolhos Bank, eastern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 5, n. 1, p. 23-28. 2006.

RUTLEDGE, L.Y.; PATTERSON B. R.; MILLS K.J.; LOVELESS K. M; MURRAY D. L.; WHITE, B. N. Protection from harvesting restores the natural social structure of eastern wolf packs. **Biological Conservation**, v. 143, p. 332–33. 2010.

SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S. Ecological aspects of marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*) based on group size and composition in the Cananéia estuary,

southeastern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 6, n. 1, p. 71-82. 2007.

SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence *loci* in cetacean species. **Nature**, v. 354, p. 63-65. 1991.

SEGURA, I.; ROCHA-OLIVARES, A.; FLORES-RAMIREZ, S.; ROJAS-BRACHO, L. Conservation implications of the genetic and ecological distinction of *Tursiops truncatus* ecotypes in the Gulf of California. **Biological conservation**, v. 133, p. 336-346. 2006.

SHAW, C.; WILSON, P.; WHITE, B. N. A reliable molecular method of gender determination for mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 84, p. 123–128. 2003.

SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. *Sotalia fluviatilis*. American Society of Mammalogists. **Mammalian Species**, v. 527, p. 1-7. 1996.

SIMÕES-LOPES, P. C. Ocorrência de uma população de *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Cetacea, Delphinidae) no limite sul de sua distribuição, Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v.1, n. 1, p. 57-62. 1988.

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 477-485. 2008.

SLOAN, N. A. History and application of the wilderness concept in marine conservation. **Conservation Biology**, v. 16, p. 294-305. 2002.

SOLINAS-TOLDO, S; LENGAUER, C.; FRIES, R. Comparative genome map of human and cattle. **Genomics**, v. 27, p. 489–496. 1995.

STERCK, E. H. M. Female dispersal, social organization, and infanticide in langurs: are they linked to human disturbance? **American Journal of Primatology**, v. 44, p. 235–254. 1998.

STORZ, J. Genetic consequences of mammalian social structure. **Journal of Mammalogy**, v. 80, p. 553-569. 1999.

SZPIECH, Z. A.; ROSENBERG, N. A. On the size distribution of private microsatellite alleles. **Theoretical Population Biology**, v. 80, p. 100–113. 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739. 2011.

TEREBA, A. **Tools for analysis of population statistics**. p. 6-14. 1999.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas – Variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 186 p. 1995.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981. 2000.

VAN BREE, P. J. Preliminary list of the cetaceans of the southern Caribbean. **Studies on the Fauna of Curacao and other Caribbean Islands**. v. 48, p. 79-87. 1975.

VALSECCHI, E.; AMOS, W. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 151–156. 1996.

VALSECCHI, E.; HALE, P.; CORKERON, P.; AMOS, W. Social structure in migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). **Molecular Ecology**, v. 11, p. 507–518. 2002.

VAN WAEREBEEK, K. Preliminary notes on the existence of a dolphin by-catch off French Guiana. **Aquatic Mammals**, v. 16, n. 2, p. 71-72. 1990.

VILLESEN, P.; FREDSTED, T., A new sex identification tool: One primer pair can reliably sex ape and monkey DNA samples. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 455–459. 2006.

VIRICEL, A.; PANTE, E.; DABIN, W.; SIMON-BOUHET, B. Applicability of RAD-tag genotyping for inter-familial comparisons: empirical data from two cetaceans. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, p. 597–605. 2014.

VOWLES, E. J.; AMOS, W. Evidence for widespread convergent evolution around human microsatellites. **PLOS Biology**, v. 2, p. e199. 2004.

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.

WEDEKIN, L. L.; DAURA-JORGE, F.; SIMÕES-LOPES, P. C. O boto-cinza, *Sotalia guianensis* (CETACEA: DELPHINIDAE), na costa sul e sudeste do Brasil: conhecimento atual e perspectivas futuras para o estudo da estrutura populacional e

espacial. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA. Belo Horizonte-MG. 2003.

WEISSENBACH, J.; GYAPAY, G.; DIB, C.; VIGNAL, A.; MORISSETTE, J.; MILLASSEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP M. A second-generation linkage map of the human genome. **Nature**, v. 359, p. 794-801. 1992.

WIENBERG, J.; STANYON, R.; NASH, W. G.; O'BRIEN, P. C.; YANG F, O'BRIEN, S. J.; FERGUSON-SMITH M. A. Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 77, n. 3-4, p. 211-217. 1997.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420. 1965.

YANG, F.; O'BRIEN, P. C. M.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M. A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Research**, v. 5, p. 109- 117. 1997.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n.1, p. 134. 2012.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, n. 1, p. 141-146. 1996.

ZAPATA, C.; RODRÍGUEZ, S.; VISEDO, G.; SACRISTÁN, F. Spectrum of non random associations between microsatellite *loci* on human chromosome 11p15. **Genetics**, v. 158, n. 3, p. 1235-1251. 2001.

APÊNDICES

Apêndice 1. Local e região de coleta dos espécimes de *Sotalia guianensis*.

| Amostra | Praia | Município | Região |
|----------------|------------------------|------------------|---------------|
| SOT. 1 | Itaparica | Vila Velha | Sul |
| SOT. 2 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 3 | Itapuã | Vila Velha | Sul |
| SOT. 4 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 5 | Praia do late | Vitória | Sul |
| SOT. 6 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 7 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 8 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 9 | Jacaraípe | Serra | Sul |
| SOT. 10 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 11 | Setiba | Guarapari | Sul |
| SOT. 12 | Ilha Do Frade | Vitória | Sul |
| SOT. 13 | Santa Cruz | Aracruz | Norte |
| SOT. 14 | Praia do Riacho | Guarapari | Sul |
| SOT. 15 | Praia da Costa | Vila Velha | Sul |
| SOT. 16 | Barra do Jucú | Vila Velha | Sul |
| SOT. 17 | Mãe Bá | Anchieta | Sul |
| SOT. 18 | Praia de Setiba | Guarapari | Sul |
| SOT. 19 | Praia da Barrinha | Vila Velha | Sul |
| SOT. 20 | Praia da Costa | Vila Velha | Sul |
| SOT. 21 | Morada do Sol | Vila Velha | Sul |
| SOT. 22 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 23 | Praia de Itaipava | Itapemirim | Sul |
| SOT. 24 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 25 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 26 | Praia dos Castelhanos | Anchieta | Sul |
| SOT. 27 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 28 | Santa Cruz | Aracruz | Norte |
| SOT. 29 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 30 | Praia do Centro | Anchieta | Sul |
| SOT. 31 | Barra do Sahy | Aracruz | Norte |
| SOT. 32 | Praia de Guanabara | Anchieta | Sul |
| SOT. 33 | Camburi | Vitória | Sul |
| SOT. 34 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 35 | Coqueiral de Itaparica | Vila Velha | Sul |
| SOT. 36 | Praia de Paraty | Anchieta | Sul |
| SOT. 37 | Praia das Castanheiras | Anchieta | Sul |
| SOT. 38 | Praia de Guaibura | Guarapari | Sul |
| SOT. 39 | Siribeira | Guarapari | Sul |
| SOT. 40 | Ponta dos Castelhanos | Anchieta | Sul |
| SOT. 41 | Praia de Itaparica | Vila Velha | Sul |
| SOT. 42 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 43 | Praia de Guanabara | Anchieta | Sul |
| SOT. 44 | Mãe Bá | Anchieta | Sul |

| | | | |
|---------|-------------------------|--------------------|-------|
| SOT. 45 | Itapuã | Vila Velha | Sul |
| SOT. 46 | Meaípe | Guarapari | Sul |
| SOT. 47 | Praia de Setiba | Guarapari | Sul |
| SOT. 48 | Praia de Anchieta | Anchieta | Sul |
| SOT. 49 | Jacaraípe | Serra | Sul |
| SOT. 50 | Pontal | Marataízes | Sul |
| SOT. 51 | Carapebus | Serra | Sul |
| SOT. 52 | Parque Estadual - P.C.V | Guarapari | Sul |
| SOT. 53 | Manguinhos | Serra | Sul |
| SOT. 54 | Barra Nova | São Mateus | Norte |
| SOT. 55 | Parque Estadual - P.C.V | Guarapari | Sul |
| SOT. 56 | Praia de Itaipava | Itapemirim | Sul |
| SOT. 57 | Pontal do Ipiranga | Linhares | Norte |
| SOT. 58 | Praia das Neves | Presidente Kennedy | Sul |
| SOT. 59 | Pontal do Ipiranga | Linhares | Norte |
| SOT. 60 | Praia da Jurong | Aracruz | Norte |
| SOT. 61 | Praia das Castanheiras | Anchieta | Sul |
| SOT. 62 | Parque Estadual - P.C.V | Guarapari | Sul |
| SOT. 63 | Praia do Morro | Guarapari | Sul |
| SOT. 64 | Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 65 | Praia de Parati | Anchieta | Sul |
| SOT. 66 | Praia das Neves | Marataízes | Sul |
| SOT. 67 | Praia das Castanheiras | Anchieta | Sul |
| SOT. 68 | Nova Almeida | Serra | Sul |
| SOT. 69 | Jacaraípe | Serra | Sul |
| SOT. 70 | Boa Vista do Sul | Marataízes | Sul |
| SOT. 71 | S. Joao de Boa Vista | Marataízes | Sul |
| SOT. 72 | Barra do Jucú | Vila Velha | Sul |
| SOT. 73 | Praia Barra Nova | São Mateus | Norte |
| SOT. 74 | Praia de Itaipava | Itapemirim | Sul |
| SOT. 75 | Porto de Regência | Linhares | Norte |
| SOT. 76 | Interlagos | Vila Velha | Sul |
| SOT. 77 | Praia das Neves | Marataízes | Sul |
| SOT. 78 | Praia de Comboios | Linhares | Norte |
| SOT. 79 | Praia Dois | Conceição da Barra | Norte |
| SOT. 80 | Praia de Guriri | São Mateus | Norte |
| SOT. 81 | Praia de Lagoa Funda | Marataízes | Sul |
| SOT. 82 | Praia de Comboios | Linhares | Norte |
| SOT. 83 | Boa Vista do Sul | Marataízes | Sul |
| SOT. 84 | Jacaraípe | Serra | Sul |
| SOT. 85 | Foz do Rio Cricaré | Conceição da Barra | Norte |
| SOT. 86 | Praia de Pitas | Marataízes | Sul |
| SOT. 87 | Praia da Marinha | Marataízes | Sul |
| SOT. 88 | Praia de Marobá | Presidente Kennedy | Sul |
| SOT. 89 | Jacaraípe | Serra | Sul |
| SOT. 90 | Praia das Conchas | Guarapari | Sul |

Apêndice 2. ZFY/ZFX validado em outras espécies, com a ferramenta *in-silico* PCR da Universidade Califórnia Santa Cruz.

Tursiops

>[JH477640:145271-145495](#) 225bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGatattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacatgtcttgacgagtgaaatccatacatgtgtctgatgttgacat
 gttgaacacattgttcatgatagtgctgtagaggcagagatcgtcactga
 tcctctgacagctgacgtagtgctcagaagaagtattggtagcagattgtg
 cctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Manatee

>[JH594706:8651668+8651892](#) 225bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctgtgc
 cagaacacgtcttgacaagtgaatctatacacgtgcctgacgttgacat
 gttgaacatgtggttcatgataatgtagtagaagcagaaatcgtcactga
 tcctctgacaaccgacgtagtttcagaagaagtattggtagcagattgtg
 cctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Mink whale

>[KI537965:57054-57275](#) 222bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGatattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacacgtcttgacaagtgaatccatacacgtgtctgacattggacac
 gttgaacacattcatgatagtgtagttgaagcagaaatcatcactgatcc
 tctgacaactgatgtagtttcagaagaagtattggtagcagattgtgcct
 cTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Orangutan

>[chrX:24305303+24305536](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacacgtcttgacgggtgattctatacatgtgtctgacgttgacat
 gttggacatgttgaacatgtggttcatgatagtgtagtgaagcagaaat
 tgcactgatcctctgactaccgacgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgcctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Marmoset

>[chrX:22776902+22777135](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacacgtcttgacgagtgaaatctatacatgtgtctgatgttgacat
 gttggacatgttgaacatgtggttcatgatagcgtagtagaagcagaaat
 tgcacggatcctctgaccaccgatgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgcctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Rhesus

>[chrX:22041026+22041259](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 ctgaacacgtcttgacgggtgattctatacatgtgtctgacgttgacat
 gttggacatgttgaacatgtggtcatgatagtgtagtgaagcagaaat
 tgcactgatcctctgactaccgacgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgcctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Chimpanzee

>[chrX:24404875+24405108](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacacgtcttgacgggtgattctatacatgtgtctgacattggacat
 gttggacatgttgaacatgtggtcatgatagtgtagtgaagcagaaat
 tgcactgatcctctgactaccgacgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgcctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Tarsier

>[KE944919v1:142333+142557](#) 225bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagagcatgtcttgacaagtgaatctatacatgtgtctgatattggacat
 gttgaacatgtggtcacgacagtgtagtgaagcagaaatcgtcactga
 tcctctgactactgacgtagtttcagaagaagtattggtagcagactgtg
 cttcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Baboon

>[chrX:21486623+21486856](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 ccgaacacgtcttgacgggtgattctatacatgtgtctgacgttgacat
 gttggacatgttgaacatgtggtcatgatagtgtagtgaagcagaaat
 tgcactgatcctctgactaccgacgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgcctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Gibbon

>[chrX:22368777+22369010](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacacgtcttgacgggtgattctatacatgtgtctgacgttgacat
 gttggacatgttgaacatgtggtcatgatagtgtagtgaagcagaaat
 tgcactgatcctctgactactgacgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgcctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Gorilla

>[chrX:24462274+24462507](#) 234bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGacattacttcagcctcaatgtctatgc
 cagaacacgtcttgacgggtgattctatacatgtgtctgacgttgacat
 gttgacatggtgaacatggttcatgatagtgtagtaggaagcagaaat
 tgtcactgatcctctgactaccgacgtagtttcagaagaagtattggtag
 cagactgtgctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Mouse: Duplicação segmentar no Cromossomo 10

>[chrX:94098348-94098572](#) 225bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 tCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGatataccttcagcctcaatatctatgc
 cggaacatgtcttgacaagtgaatctatacatgtgtctgacgttggtcac
 gttgaacatggttcatgatagtgtagtagagaagcagaaatcgtcacaga
 tcctctggccgctgatgtgtctcagaagaagtgttgtagcagactgtg
 cctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA
 >[chr10:52544672-52544896](#) 225bp CCCAGATGATGTTTTAGCTTCTG
 TTGGCATCTATGACTGCTTCA
 tCCAGATGATGTTTTAGCTTCTGatattacttcagcctcaatatctatgc
 cgaaacgagtcttgacaagtgaatctatacatgtgtctgacattggtcac
 gttgaacatggttcatgatagtgtagtagagaagcagaaatcatcacaga
 tcctctggccactgatgtgtctcagaagaagtgttgtagcagactgtg
 cctcTGAAGCAGTCATAGATGCCAA

Apêndice 3. Tabela de genótipos de *Sotalia guianensis* por meio de 14 *loci* microsatélites.

| Espécime | Sota-01 | | Sota-02 | | Sota-03 | | Sota-04 | | Sota-05 | | Sota-06 | | Sota-07 | | Sota-08 | | Sota-09 | | Sota-10 | | Sota-11 | | Sota-12 | | Sota-13 | | Sota-14 | |
|----------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| SOT.1 | 131 | 139 | 208 | 216 | 410 | 410 | 158 | 166 | | | 227 | 227 | 280 | 284 | 92 | 100 | 88 | 88 | 214 | 214 | 186 | 186 | 132 | 134 | 158 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.2 | 131 | 139 | 208 | 208 | 410 | 410 | 150 | 158 | 238 | 238 | 227 | 227 | 280 | 284 | 100 | 100 | 88 | 94 | 216 | 220 | 186 | 186 | 112 | 132 | 156 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.3 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 410 | 150 | 158 | 236 | 240 | 227 | 227 | 280 | 280 | 100 | 100 | 88 | 88 | 214 | 216 | 186 | 186 | 130 | 132 | 154 | 156 | 164 | 164 |
| SOT.4 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 408 | 150 | 156 | 236 | 236 | | | 280 | 288 | 88 | 92 | 88 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | 130 | 132 | 158 | 158 | | |
| SOT.5 | | | 206 | 208 | | | 150 | 150 | 238 | 240 | 227 | 227 | 280 | 288 | 88 | 100 | | | 214 | 216 | 186 | 186 | 126 | 132 | 150 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.6 | 139 | 139 | 208 | 208 | | | 150 | 150 | | | 227 | 227 | | | | | 88 | 88 | 216 | 216 | 186 | 186 | 134 | 136 | 150 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.7 | | | | | 410 | 428 | 150 | 166 | 232 | 236 | 227 | 227 | 280 | 288 | 88 | 96 | 88 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | | | 156 | 156 | 164 | 164 |
| SOT.8 | 137 | 139 | 208 | 208 | 410 | 432 | 150 | 166 | 238 | 242 | 231 | 231 | 280 | 286 | | | 88 | 97 | 214 | 216 | 186 | 196 | 112 | 130 | 150 | 156 | 164 | 164 |
| SOT.9 | 131 | 131 | | | | | | | | | | | | | | | 88 | 97 | | | | | 132 | 134 | | | | |
| SOT.10 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 410 | 156 | 158 | 238 | 244 | 229 | 231 | 284 | 284 | 100 | 100 | 88 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | 132 | 132 | 150 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.11 | 139 | 139 | 206 | 208 | 410 | 410 | 158 | 158 | 232 | 248 | 227 | 227 | 280 | 284 | | | 88 | 97 | 212 | 220 | 186 | 186 | 112 | 134 | 156 | 156 | 164 | 164 |
| SOT.12 | 135 | 139 | 208 | 208 | 428 | 436 | | | 232 | 240 | 227 | 227 | 280 | 288 | 88 | 100 | 88 | 94 | 214 | 220 | 186 | 186 | 132 | 132 | 156 | 156 | 164 | 164 |
| SOT.13 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 436 | 156 | 158 | 232 | 238 | 229 | 229 | 280 | 280 | 88 | 100 | 88 | 88 | 214 | 214 | 186 | 186 | 112 | 130 | 154 | 156 | 164 | 166 |
| SOT.14 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 410 | 150 | 150 | 236 | 240 | | | | | 88 | 92 | 88 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | 130 | 132 | | | | |
| SOT.15 | 139 | 139 | 208 | 208 | 410 | 432 | 150 | 158 | 238 | 238 | | | | | | | 94 | 97 | 218 | 220 | 186 | 186 | 136 | 136 | | | | |
| SOT.16 | 131 | 137 | 208 | 208 | 410 | 410 | 158 | 158 | 238 | 238 | | | | | 92 | 92 | 88 | 97 | 214 | 214 | 186 | 186 | 112 | 132 | 156 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.17 | 131 | 139 | 206 | 208 | | | 150 | 158 | | | | | | | | | | | 214 | 214 | 186 | 186 | 136 | 136 | | | | |
| SOT.18 | 135 | 139 | | | | | | | | | | | | | | | 88 | 97 | | | | | 112 | 112 | 156 | 158 | | |
| SOT.19 | 131 | 137 | | | 410 | 410 | 150 | 150 | | | | | | | 88 | 88 | 88 | 88 | | | | | 134 | 136 | | | | |
| SOT.20 | 139 | 139 | 208 | 208 | | | 154 | 156 | | | | | | | | | 88 | 94 | 218 | 220 | | | 128 | 130 | | | | |
| SOT.21 | 135 | 139 | 208 | 208 | 426 | 436 | 150 | 164 | | | | | | | 96 | 96 | 88 | 88 | 214 | 216 | 186 | 186 | 132 | 132 | 150 | 150 | 164 | 164 |
| SOT.22 | | | 208 | 208 | 410 | 426 | 150 | 150 | 236 | 236 | | | 280 | 280 | 88 | 96 | | | 212 | 214 | 186 | 186 | 132 | 132 | 156 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.23 | 131 | 139 | 208 | 208 | 410 | 426 | 150 | 150 | | | | | 280 | 280 | 88 | 92 | 97 | 97 | 216 | 216 | 186 | 186 | 112 | 132 | 158 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.24 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 428 | 150 | 156 | | | 227 | 231 | 280 | 280 | 92 | 92 | 88 | 97 | 216 | 220 | 186 | 186 | 112 | 120 | 158 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.25 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 410 | 150 | 154 | | | | | | | 92 | 100 | 88 | 97 | 216 | 216 | 186 | 186 | 120 | 132 | | | | |
| SOT.26 | 131 | 137 | 208 | 208 | 410 | 428 | 150 | 150 | 236 | 238 | | | | | 92 | 100 | 88 | 94 | 214 | 216 | 186 | 186 | 126 | 128 | | | | |
| SOT.27 | 137 | 137 | | | 410 | 410 | | | | | | | | | 100 | 100 | 88 | 88 | | | | | 112 | 130 | 156 | 156 | 164 | 164 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| SOT.28 | | | 206 | 208 | 408 | 428 | 150 | 150 | 236 | 238 | | | | | 100 | 100 | 88 | 88 | 214 | 216 | 186 | 186 | 132 | 132 | | | 164 | 166 |
| SOT.29 | 137 | 137 | 208 | 208 | 410 | 430 | 150 | 158 | | | | | | | | | 88 | 97 | | | | | 130 | 132 | | | | |
| SOT.30 | 131 | 137 | 208 | 216 | 408 | 410 | 150 | 156 | 232 | 240 | | | | | 92 | 100 | 88 | 88 | 214 | 220 | 186 | 186 | 126 | 136 | 156 | 156 | 164 | 166 |
| SOT.31 | 139 | 139 | 208 | 208 | 424 | 424 | 158 | 158 | | | 227 | 231 | 284 | 288 | 100 | 100 | 88 | 94 | 214 | 214 | 186 | 186 | 134 | 136 | 156 | 156 | 162 | 162 |
| SOT.32 | 139 | 139 | | | | | 166 | 166 | | | 227 | 231 | 280 | 280 | | | 88 | 97 | | | | | | | 156 | 156 | 164 | 166 |
| SOT.33 | 137 | 137 | 208 | 208 | 410 | 424 | 164 | 164 | 238 | 238 | | | | | 96 | 100 | 88 | 94 | 214 | 214 | 186 | 186 | | | | | | |
| SOT.34 | 139 | 139 | 208 | 208 | 408 | 410 | 150 | 150 | 236 | 240 | | | | | 88 | 92 | 88 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | 130 | 134 | | | | |
| SOT.35 | 131 | 137 | 208 | 208 | 426 | 426 | 158 | 158 | | | 227 | 231 | 280 | 280 | 88 | 88 | 97 | 97 | | | | | 130 | 134 | 150 | 150 | 164 | 166 |
| SOT.36 | 139 | 139 | 206 | 208 | 408 | 408 | 156 | 164 | 240 | 240 | | | | | 92 | 100 | 88 | 97 | 214 | 214 | 186 | 196 | 132 | 134 | 156 | 156 | | |
| SOT.37 | | | | | | | 158 | 158 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SOT.38 | | | 208 | 208 | 408 | 432 | 150 | 166 | | | 231 | 231 | 280 | 280 | 88 | 92 | 88 | 97 | 214 | 214 | 186 | 206 | 112 | 112 | 156 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.39 | | | 208 | 208 | 410 | 430 | | | 248 | 252 | 227 | 227 | 280 | 280 | 88 | 100 | 97 | 97 | 214 | 214 | | | 132 | 132 | 150 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.40 | 137 | 137 | | | | | | | | | 227 | 231 | 280 | 280 | | | | | | | | | 132 | 134 | 150 | 150 | | |
| SOT.41 | 131 | 133 | 208 | 208 | 410 | 426 | 156 | 164 | 238 | 240 | 227 | 227 | 280 | 284 | 92 | 100 | 88 | 97 | 210 | 214 | 186 | 186 | 134 | 136 | 156 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.42 | | | 208 | 228 | 408 | 410 | 150 | 150 | 232 | 240 | 227 | 229 | 280 | 280 | 88 | 88 | 88 | 97 | 214 | 214 | 186 | 186 | 130 | 132 | 150 | 156 | 166 | 166 |
| SOT.43 | 131 | 137 | | | 410 | 410 | 156 | 156 | | | | | | | 88 | 100 | | | | | | | 112 | 112 | | | | |
| SOT.44 | 137 | 137 | 200 | 208 | | | 156 | 156 | 232 | 232 | | | | | | | | | 214 | 216 | 186 | 186 | 112 | 132 | | | | |
| SOT.45 | 131 | 137 | 208 | 208 | 410 | 410 | 156 | 158 | | | 227 | 227 | 280 | 284 | 88 | 100 | 94 | 97 | 214 | 216 | | | 112 | 132 | 158 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.46 | 131 | 137 | | | 408 | 408 | 150 | 150 | | | | | | | 88 | 96 | | | | | | | 112 | 112 | 158 | 158 | | |
| SOT.47 | 131 | 137 | 208 | 208 | 428 | 430 | 156 | 156 | 236 | 236 | | | | | 92 | 96 | 88 | 94 | 214 | 218 | 186 | 186 | 112 | 112 | 150 | 158 | | |
| SOT.48 | | | 208 | 208 | | | 150 | 166 | 238 | 238 | | | | | 88 | 106 | 88 | 88 | 214 | 216 | 186 | 186 | 112 | 112 | | | | |
| SOT.49 | 131 | 137 | 208 | 208 | 410 | 428 | 150 | 156 | 236 | 238 | 227 | 231 | 280 | 280 | 92 | 100 | 88 | 97 | 216 | 220 | | | 128 | 132 | 150 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.50 | | | | | | | | | | | | | | | | | 97 | 97 | | | | | 108 | 108 | | | | |
| SOT.51 | 131 | 139 | 208 | 208 | 410 | 410 | 166 | 166 | | | | | | | 100 | 100 | | | 214 | 214 | | | | | | | | |
| SOT.52 | 139 | 139 | 208 | 208 | | | 158 | 166 | 236 | 238 | | | | | | | 97 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | 132 | 134 | | | | |
| SOT.53 | 139 | 139 | 208 | 208 | | | 150 | 150 | 236 | 236 | | | | | | | | | 214 | 214 | | | | | | | | |
| SOT.54 | 131 | 139 | | | | | 150 | 166 | | | | | | | 100 | 100 | 88 | 88 | | | | | 112 | 132 | | | | |
| SOT.55 | 137 | 139 | 206 | 208 | 408 | 408 | 158 | 158 | 232 | 236 | | | | | 92 | 100 | 88 | 103 | 212 | 214 | 186 | 186 | 112 | 112 | | | | |
| SOT.56 | 139 | 139 | | | | | 156 | 156 | | | | | | | | | 88 | 103 | | | | | 120 | 136 | 158 | 158 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| SOT.86 | | | 208 | 208 | 410 | 426 | 150 | 156 | 238 | 248 | 227 | 229 | 280 | 284 | 100 | 100 | 88 | 88 | 214 | 216 | | | 134 | 134 | 154 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.87 | 137 | 139 | 206 | 208 | 408 | 408 | 158 | 166 | 238 | 246 | | | | | 92 | 100 | 94 | 97 | 214 | 216 | 186 | 186 | 132 | 132 | 156 | 158 | | |
| SOT.88 | | | 208 | 216 | 430 | 430 | 150 | 150 | 236 | 238 | 227 | 231 | 280 | 288 | 88 | 100 | 88 | 97 | 214 | 214 | | | 132 | 136 | 154 | 158 | 164 | 166 |
| SOT.89 | 135 | 137 | 208 | 208 | 432 | 436 | 150 | 156 | | | 227 | 231 | 280 | 280 | 96 | 96 | 94 | 97 | 214 | 214 | 186 | 186 | 132 | 132 | 150 | 158 | 164 | 164 |
| SOT.90 | 131 | 137 | 208 | 208 | 410 | 410 | 158 | 166 | | | 227 | 229 | 280 | 280 | 96 | 108 | 94 | 97 | 212 | 216 | | | 112 | 126 | 150 | 156 | 164 | 164 |