

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA DO
mtDNA E DE LOCI DE MICROSSATÉLITES DAS SUBPOPULAÇÕES DE
Tursiops truncatus (CETACEA, DELPHINIDAE) DO COMPLEXO
LAGUNAR DE SANTO ANTÔNIO DOS ANJOS, SANTA CATARINA, E
LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL**

ANA PAULA BORGES DE C. COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE.

**Orientador: Victor Hugo Valiati
Co-Orientadora: Larissa Rosa de Oliveira**

**São Leopoldo, RS
Fevereiro 2013**

Ficha catalográfica

C837c Costa, Ana Paula Borges de C.
Caracterização genética da região controladora do mtDNA e de loci de microssatélites das subpopulações de *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) do Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, Santa Catarina, e litoral norte do Rio Grande do Sul / por Ana Paula Borges de C. Costa. – 2013.
vii, 98 f. : il., 30cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati ; Coordenação: Prof^ª. Dr^ª. Larissa Rosa de Oliveira.

1. DNA. 2. Boto-da-tainha. 3. Técnica de forrageio. 4. Fluxo gênico. I. Título.

CDU 575

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Vanessa Borges Nunes - CRB 10/1556

*Aos meus pais,
que sempre me apoiaram ao longo de todos os anos
e que sem a ajuda, não teria chegado tão longe.*

*Ao Tico,
meu amor, amigo e companheiro por toda a vida,
cujo apoio e compartilhamento dos mesmos sonhos
me fazem seguir sempre em frente.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido realizado se não fosse pelo apoio e ajuda de diversas pessoas que fizeram e que fazem parte da minha vida.

Antes de tudo, gostaria de agradecer aos meus pais, Paulo e Fátima, que sempre apoiaram os meus sonhos (e na maioria das vezes os financiaram) e que sem a ajuda e compreensão - mesmo à quilômetros de distância - não teria chegado até aqui.

Assim como ao Tico, meu marido, eterno namorado e parceiro de sonhos, cujo amor e apoio foi chave fundamental em todos os momentos da minha vida.

Agradeço também ao meu professor/orientador (do passado, presente e futuro) e amigo Paulo Simões-Lopes, que foi quem me indicou o caminho para realizar meu sonho de trabalhar com a genética.

À minha amiga e orientadora Larissa Oliveira, por ter aberto as portas para mim e pela ajuda ao longo dos meses em que morei no Rio Grande do Sul.

Ao meu querido orientador Victor Hugo Valiati, cuja ajuda e ensinamentos foram mais do que indispensáveis para a realização desta pesquisa.

Meus agradecimentos ao Dr. Fábio Daura-Jorge pelos incentivos, coleta das amostras e correção do trabalho.

Ao Dr. Paulo Ott pelas coletas em Torres e ao Pedro Fruet pelas coletas tanto em águas catarinenses, quanto gaúchas.

Ao Prof. Sandro Bonatto e equipe do seu laboratório na PUC por terem permitido que eu realizasse parte das minhas pesquisas no Genoma.

Aos meus irmãos e cunhados (Maria, Marianna, Paulinho, Elisandro e Andreza), que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos e que perto ou longe estão sempre torcendo por mim.

À Tia Zulma, que sempre tem um cantinho em Porto Alegre para mim.

Aos meus amigos do LAMAQ pela amizade, companheirismo, ensinamentos, conversas divertidas durante as necrópsias e apoio dentro e fora do lab.

Aos meus colegas de laboratório na UNISINOS, em especial ao Fernando Lopes, Lúcia Fraga, Ana Gabriela Ormazabal, Munique Mendonça, Tenille Dorneles e Rodrigo Machado que tiveram a paciência de me ajudar e me ensinar durante todos os meses do meu mestrado.

Às minhas amigas (Bibi, Van, Palma, Gabi, Cacá, Ana, Nati, Loli e Sá), pelo apoio de perto e de longe. Sei que posso contar sempre com vocês!

Aos professores e funcionários da UNISINOS que, direta ou indiretamente, contribuíram na minha educação acadêmica.

À banca desta tese, pelo interesse, correções e sugestões.

À Karina Amaral pela confecção do mapa da área de estudo.

E a todas as outras pessoas que não foram citadas aqui, mas que passaram em algum momento na minha vida e deixaram um pouquinho de si.

Muito Obrigada!

*“To make a great dream come true, the first requirement is a great capacity to dream;
the second is persistence - continued faith in the dream”.*

Hans Selye

SUMÁRIO

Apresentação	1
Introdução Geral	2
Capítulo I	10
O uso de dentes de <i>Tursiops truncatus</i> como fonte de DNA para análises moleculares com marcador mitocondrial	
Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
Materiais e Métodos	16
Resultados	19
Discussão	20
Referências	22
Capítulo II	26
Caracterização genética da região controladora do mtDNA das subpopulações de <i>Tursiops truncatus</i> do sul do Brasil	
Resumo	27
Abstract	29
Introdução	31
Materiais e Métodos	34
Resultados	38
Discussão	43
Referências	48
Capítulo III	55
Diversidade genética e estrutura populacional de <i>Tursiops truncatus</i> das subpopulações de Laguna, Santa Catarina, e litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil, através da análise de microssatélites	
Resumo	56
Abstract	58

Introdução	59
Materiais e Métodos	63
Resultados	67
Discussão	74
Referências	79
Referências da Introdução Geral	88
Anexos	96

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação tem como espécie de estudo o delfínídeo *Tursiops truncatus*, popularmente conhecido como boto-da-tainha ou golfinho-nariz-de-garrafa. A área de estudo abrangeu o Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, em Laguna (SC), onde existe uma população estuarina residente, e o litoral norte do Rio Grande do Sul (que se estende de Torres ao Parque Nacional da Lagoa do Peixe), onde é possível encontrar outras duas populações estuarinas da espécie – Rio Mampituba, em Torres, e Lagoa de Tramandaí, em Tramandaí. As amostras utilizadas nas análises genéticas foram coletadas por meio de biópsias e de episódios de encalhes de golfinhos mortos ao longo do litoral gaúcho. Além disso, foram utilizadas também quatro amostras de dentes e uma de tecido de botos mortos e encalhados ao longo do litoral catarinense. Este trabalho está dividido em três capítulos e uma introdução geral a respeito da espécie. Os objetivos desta dissertação são: 1) demonstrar através de uma técnica não-invasiva a extração eficiente de DNA a partir de dentes oriundos de coleções científicas (Capítulo I) e; 2) caracterizar geneticamente e avaliar a existência de estruturação populacional entre indivíduos da subpopulação de Laguna e os espécimes amostrados ao longo dos litorais catarinense e gaúcho, através da análise da região controladora do DNA mitocondrial (Capítulo II) e de quatro loci de DNA microssatélites (Capítulo III).

INTRODUÇÃO GERAL

O boto-da-tainha ou golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, é uma das espécies mais bem estudadas entre os cetáceos. Esse golfinho já era bem conhecido na Roma e Grécia antigas, fazendo parte de suas lendas e sendo também descrito nos trabalhos de Aristóteles e Plínio (WELLS; SCOTT, 1999; BASTIDA; RODRÍGUEZ, 2005). Sua coloração, forma e tamanho variam entre as populações. Os machos adultos são ligeiramente maiores do que as fêmeas, com um comprimento entre 2,5 a 3,5 metros, embora já tenham sido encontrados indivíduos com quase 4 metros de comprimento (*c.f.*, PERRIN; REILLY, 1984). O peso de um adulto varia de 200 a 350 kg, mas há registros de até 600 kg. Ao nascerem, os filhotes medem entre 85 e 140 cm e pesam entre 14 e 30 kg (BASTIDA; RODRÍGUEZ, 2005). A maturidade sexual para os machos é atingida entre os 10 e 13 anos (SERGEANT; CALDWELL; CALDWELL, 1973; ODELL, 1975), enquanto as fêmeas tornam-se sexualmente maduras entre os 7 e 14 anos (MEAD; POTTER, 1990), podendo dar à luz a cada 2 a 3 anos. Estima-se que as fêmeas vivam até os 50 anos e os machos até os 40 anos (BASTIDA; RODRÍGUEZ, 2005).

A espécie é cosmopolita e pode ser encontrada em todos os mares tropicais e temperados (WELLS; SCOTT, 1999), ocupando áreas como lagunas (GIACOMO, 2010; DAURA-JORGE *et al.*, 2012), baías (READ, 2003; WEDEKIN *et al.*, 2008) e golfos (WÜRSIG; WÜRSIG, 1979; ROSEL; HANSEN; HOHN, 2009), além de águas profundas (LEATHERWOOD; REEVES, 1983), estando inclusive associados a ilhas oceânicas (BARACHO *et al.*, 2008; OTT *et al.*, 2009). No Atlântico Sul, distribui-se desde o Amapá (PINEDO; ROSAS; MARMONTEL, 1992; SICILIANO *et al.*, 2006; SICILIANO *et al.*, 2008), no Brasil (2°3'N; 50°47'W) - sendo comumente avistado na Bacia de Campos, com registros a partir dos costões de Búzios e Arraial do Cabo, como também em áreas de maiores profundidades (SICILIANO *et al.*, 2006); ao longo do litoral de São Paulo (SANTOS *et al.*, 2010); assim como em áreas abertas e protegidas ao longo da costa do sul do Brasil (WEDEKIN *et al.*, 2008; DI TULLIO, 2009; DAURA-JORGE *et al.*, 2012) -, até a província de Chubut, na Argentina (43°20'S; 65°30'W) (BASTIDA; RODRÍGUEZ, 2005). Mais recentemente, registros ao longo da costa da Terra do Fogo, na Argentina, trouxeram maior complexidade sobre a questão dos limites meridionais da sua

distribuição na América do Sul. Goodall *et al.* (2011) registraram a ocorrência de sete espécimes encahados entre as latitudes de 53° e 55° S.

A primeira descrição da espécie foi feita por Lacépède, em 1804, porém o espécime depositado na coleção da Escola de Veterinária de Paris foi misteriosamente perdido anos mais tarde e, conseqüentemente, o nome científico proposto foi ignorado pela ciência (WELLS; SCOTT, 1990). Em 1821, Montagu fez uma breve descrição de um exemplar encahado na costa de Devonshire, Reino Unido, nomeando-o de *Delphinus tursiops*. Posteriormente, o gênero foi modificado para *Tursiops* por Gray em 1843 (WELLS; SCOTT, 190; BASTIDA; RODRÍGUEZ, 2005). Todavia, entre os séculos 19 e 20, o elevado polimorfismo do gênero levou a descrição de mais de 20 espécies de acordo com variações de coloração, tamanho, morfologia craniana e distribuição geográfica (WALKER, 1981; ROSS; COCKCROFT, 1990; HERSH; DUFFIELD, 1990; WELLS; SCOTT, 1999). Atualmente, apenas *T. truncatus* e *T. aduncus* são oficialmente reconhecidos (MÖLLER; BEHEREGARAY, 2001; COMMITTE ON TAXONOMY, 2012). Mais recentemente novos estudos utilizando técnicas moleculares sugeriram a existência de mais duas espécies para o gênero - uma na região pelágica da África do Sul (NATOLI; PEDDEMORS; HOELZEL, 2004) e outra, denominada de *Tursiops australis*, na região costeira do sul da Austrália (BILGMANN *et al.*, 2007; MÖLLER *et al.*, 2008; CHARLTON-ROBB *et al.*, 2011). Entretanto, ambas espécies não foram formalmente reconhecidas pelo comitê de sistemática e taxonomia da *Society for Marine Mammalogy* (COMMITTE ON TAXONOMY, 2012).

Utilizando-se de variações na morfologia craniana e comprimento corporal (WALKER, 1981; HERSH; DUFFIELD, 1990; MEAD; POTTER, 1995), diversidade de parasitas e dieta (WALKER, 1981; MEAD; POTTER, 1995), distribuição (CARRETTA *et al.*, 2005), análises sanguíneas (DUFFIELD; RIDGWAY; CORNELL, 1983) e genéticas (HOELZEL; POTTER; BEST, 1998) foi sugerida a existência de formas costeira (*inshore*) e oceânica (*offshore*) de *T. truncatus*. As duas formas da espécie foram identificadas para as costas leste (PARSONS *et al.*, 2002) e oeste do Oceano Atlântico Norte (DUFFIELD; RIDGWAY; CORNELL, 1983; HERSH; DUFFIELD, 1990; MEAD; POTTER, 1995; HOELZEL; POTTER; BEST, 1998); leste do Pacífico Sul (VAN WAEREBEEK *et al.*, 1990; SANINO *et al.*, 2005); Pacífico Norte (WALKER, 1981; LOWTHER, 2006; PERRIN *et al.*, 2011); e Atlântico Sul (FINDLAY *et al.*,

1992). Em relação ao tamanho total, na costa oeste do Atlântico Norte e porção norte do Golfo do México a forma oceânica foi considerada de comprimento corporal maior do que a costeira (CURRY, 1997), já na costa leste do Pacífico Norte, Walker (1981) registrou o oposto.

Nos Oceanos Índico, Indo-Pacífico e costa oeste do Pacífico Sul também são encontradas as formas costeira e oceânica de *Tursiops*. Contudo, nessa região foi demonstrado, através de análises moleculares (WANG; CHOU; WHITE, 1999; LEDUC; PERRIN; DIZON, 1999; MÖLLER; BEHEREGARAY, 2001), a existência de duas espécies, sendo que *T. aduncus* ocupa águas mais costeiras, enquanto *T. truncatus* apresenta uma distribuição mais oceânica (ROSS, 1984; WANG; CHOU; WHITE, 1999; HALE; BARRETO; ROSS, 2000; WANG; CHOU; WHITE, 2000; MÖLLER; BEHEREGARAY, 2001; KEMPER, 2004). Adicionalmente, *T. aduncus* possui um comprimento corporal menor (2,60 m) do que *T. truncatus* (3,00 m), com pintas na região ventral do corpo e um rostro mais alongado do que o último (WANG; CHOU; WHITE, 1999; WANG; CHOU; WHITE, 2000).

Na América do Sul, análises genéticas e variações da morfologia craniana e dentária demonstraram a presença das duas formas de *T. truncatus* para as águas do Chile e Peru (VAN WAEREBEEK *et al.*, 1990; SANINO *et al.*, 2005). De acordo com Sanino *et al.* (2005), a população *inshore* do Chile estaria reprodutivamente isolada, sendo considerada como uma unidade evolutivamente significativa (UES - *Evolutionarily Significant Unit, ESU*, do inglês) e devendo ser manejada como tal. Já as populações *offshore* do Chile e Peru não apresentaram diferenças significativas nas frequências dos haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial, o que poderia sugerir a presença de um único estoque populacional: “Peru-Chile *offshore*”.

Na costa leste da América do Sul, a controvérsia permanece. Barreto (2000) analisou a variação na morfologia craniana de espécimes depositados em coleções ao longo do Brasil, Uruguai e Argentina. Como resultado o autor encontrou diferenças significativas entre espécimes registrados ao sul e ao norte da Ilha de Santa Catarina (27°35'S; 48°33'W), no sul do Brasil, sugerindo que esta variação latitudinal na forma e tamanho do crânio resultaria na existência de duas subespécies: *T. truncatus truncatus* para os espécimes da região ao norte da Ilha e *T. truncatus gephyreus* para os espécimes localizados ao sul. Estas subespécies coincidem com a variação na temperatura das águas superficiais do oceano que circundam a costa leste da

América do Sul. Segundo Barreto (2000), a subespécie do norte é menor e está em contato com a corrente tropical do Brasil (14° a 25° C; SEELIGER; ODEBRECHT; CASTELLO, 1997). A subespécie do sul é maior e está presente na área de influência da corrente de águas subantárticas das Malvinas (4° a 15° C; SEELIGER; ODEBRECHT; CASTELLO, 1997). Porém, embora muito discutida, ainda não há um consenso sobre a questão da sistemática e taxonomia da espécie, aceitando-se apenas a existência de uma única espécie, *Tursiops truncatus*, para a costa oeste do Atlântico Sul.

A sugestão da ocorrência das formas costeira e oceânica de *T. truncatus* para a costa do Brasil foi relatada pela primeira vez por Simões-Lopes (1996) com base nas diferenças no padrão de coloração e forma da nadadeira dorsal de grupos de golfinhos avistados próximos a Ilha do Arvoredo (27°17'S; 48°22'W), no sul do Brasil, na isóbata dos 30 m de profundidade. Outros trabalhos ao longo da costa leste da América do Sul abordaram diferenças genéticas entre ambas as formas, principalmente para a população *offshore* do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) (OLIVEIRA *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2010). Além disso, há também relatos da presença de populações insulares no Atol das Rocas (BARACHO *et al.*, 2008) e no Arquipélago de Trindade e Martin Vaz (CARVALHO; ROSSI-SANTOS, 2011).

A espécie é altamente sociável e de grande adaptabilidade a diferentes habitats. Os botos-da-tainha podem ser encontrados formando grupos de um grande número de indivíduos, ocupando áreas costeiras com alto nível de residência (SIMÕES-LOPES, 1995; FRUET *et al.*, 2011, DAURA-JORGE *et al.*, 2012), habitando grandes áreas de vida e/ou promovendo extensos deslocamentos ao longo da costa (SILVA *et al.*, 2009). Há também registros de grupos de centenas de exemplares avistados em mar aberto (LEATHERWOOD; REEVES, 1983). Além disso, é comum registrar a presença de animais solitários (BASTIDA; RODRÍGUEZ, 2005). Diversos tipos de comportamento da espécie já foram descritos, como a formação de alianças entre machos (CONNOR *et al.*, 2000; GIBSON; MANN, 2008), laços entre mães e filhotes (CONNOR *et al.*, 2000; GIBSON; MANN, 2008), estratégias de forrageio e cooperação complexas (SHANE, 1990; DAURA-JORGE *et al.*, 2012), além da formação de sociedades de fissão-fusão (CONNOR *et al.*, 2000; TSAI; MANN, 2012).

No Brasil, os botos-da-tainha que habitam ambientes estuarinos podem apresentar um alto índice de fidelidade ao habitat. As populações residentes conhecidas até o momento são as

que habitam regiões estuarinas da costa sul brasileira, como as do Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos (Santa Catarina) (28°20'S; 48°50'W), do Rio Mampituba (29°19'S; 49°42'), da Lagoa de Tramandaí (29°58'S; 50°09'W) e Lagoa dos Patos (31°57'S; 52°06'W) (todas no Rio Grande do Sul) (MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES, 1995; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999; HOFFMANN, 2004; DI TULLIO, 2009; GIACOMO, 2010).

Nas populações de Santa Catarina e litoral norte do Rio Grande do Sul é possível observar a presença de uma interação mutualística com os pescadores artesanais locais, conhecida como “pesca cooperativa”, a qual pode ocorrer em todos os meses do ano, sendo mais frequente durante a época da tainha (*Mugil* sp.), de abril a junho (SIMÕES-LOPES, 1991; SIMÕES-LOPES, 1995; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN; MENEGHETI, 1998; SIMÕES-LOPES; DAURA-JORGE, 2008; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). A pesca cooperativa é uma parceria entre homens e botos, onde os botos agrupam os peixes através de movimentos circulares, próximo a fileira de pescadores, os quais ficam à espera de um sinal dos botos acima da superfície da água para o lançamento das tarrafas (PRYOR; LINDBERGH, 1990; SIMÕES-LOPES, 1991; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN; MENEGHETI, 1998; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Registros de interações interespecíficas como as relatadas acima são raras na literatura. Além dos registros para o sul do Brasil, há um relato para a costa da Mauritânia, África, onde os pescadores batiam na água com varas, enquanto os botos-da-tainha encurralavam os cardumes (BUSNEL, 1973).

O número de indivíduos residentes das populações do sul do Brasil, assim como, o deslocamento de botos entre as áreas foram determinados com o auxílio de técnicas de foto-identificação (SIMÕES-LOPES, 1991; MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES, 1995; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN; MENEGHETI, 1998; HOFFMANN, 2004; GIACOMO, 2010; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Segundo Simões-Lopes, Fábio e Menegheti (1998), entre 14 e 20 indivíduos interagem com os pescadores artesanais de Laguna, sendo o tamanho total da população estimado entre 44 e 55 indivíduos, variando de acordo com a época do ano (DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Em Tramandaí, os primeiros autores citam a interação com nove botos. Mais recentemente o mesmo número de golfinhos foi contabilizado nessa região por foto-identificação. Destes, seis indivíduos foram classificados como residentes, dois como transientes e um sazonal (GIACOMO, 2010). De acordo com Bernardi (2000) e Hoffmann (2004), a

população residente de botos de Torres é estimada em cerca de sete indivíduos, porém acredita-se que a população total possa ser de quinze indivíduos, considerando-se os botos não-residentes (GEMARS, dados não publicados; MORENO *et al.*, 2008).

Em relação ao deslocamento desses animais, a comparação dos catálogos fotográficos confirmou a presença em Laguna de dois machos da população estuarina de Tramandaí, locais que distam 219 km de distância entre si. Além disso, foi possível observar um deslocamento menor de 80 km de uma fêmea de Tramandaí registrada na desembocadura do rio Mampituba, na cidade de Torres/RS. Já um indivíduo de sexo indeterminado, também da população de Tramandaí, foi visto mais ao sul, na Lagoa dos Patos (*cf.* MÖLLER *et al.*, 1994). Em 2003, um boto da população de Torres, conhecido pelos pescadores como Pirata, foi visto em Tramandaí interagindo por 15 minutos com três indivíduos dessa localidade (HOFFMANN, 2004). Mais recentemente foi sugerido um possível deslocamento de mais de 270 km entre Laguna e a baía de Guaratuba, no Paraná (SIMÕES-LOPES; DAURA-JORGE, 2008).

Apesar da verificação de deslocamentos entre as populações do sul do Brasil, pouco ainda se sabe sobre a frequência em que os mesmos ocorrem e o tipo de interação entre as populações. Alguns autores (MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999) sugerem que tais movimentos podem estar relacionados à disponibilidade de recursos alimentares, já que a maioria dos deslocamentos registrados ocorreu na época de migração da tainha (*Mugil spp.*), sem, no entanto, descartar a possibilidade de deslocamento para a reprodução entre os indivíduos das diferentes populações.

Os estudos conduzidos utilizando-se da técnica de foto-identificação permitiram identificar padrões de distribuição, comportamento e ocorrência das populações estuarinas residentes de boto-da-tainha (MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999; GIACOMO, 2010; DAURA-JORGE, 2011). Contudo, estes estudos não comprovam fluxo gênico entre as populações, mas sim apenas os deslocamentos entre as áreas mencionadas. Desta forma, a utilização de técnicas moleculares é de grande importância para a compreensão da estrutura populacional e a variabilidade genética entre e dentro das populações costeiras.

A variabilidade genética característica da região controladora do mtDNA foi extensamente explorada em estudos de estrutura populacional (AVISE, 1994) e pode ser útil na identificação de importantes subunidades populacionais (MORITZ, 1994), além de ser um

importante pré-requisito em medidas de conservação mais efetivas e realistas para as populações naturais e de cativeiro (PARSONS *et al.*, 2002). Já marcadores nucleares, como os microssatélites, são as melhores ferramentas disponíveis até o momento para a determinação de estruturas e dinâmicas populacionais (ZHANG; HEWITT, 2003). Os microssatélites são os marcadores mais adequados para detectar baixos níveis de diversidade genética, geralmente encontrados em populações isoladas, vulneráveis ou em declínio. Estes marcadores também permitem investigações mais acuradas da história demográfica das populações e de fatores antropogênicos potencialmente correlacionados. Além disso, são muito úteis na atribuição de indivíduos às suas populações, na descoberta de estratégias de reprodução e relações sociais, assim como, para uma descrição mais precisa sobre o grau de parentesco dos indivíduos de uma população (BOURRET *et al.*, 2008).

Devido à sua importância cultural (participação de diversas gerações de pescadores na interação com os botos), biológica (predadores de topo da cadeia alimentar) e econômica (aumento na captura de peixes pelos pescadores artesanais e atrativo turístico para as cidades), na década de 90, o boto-da-tainha foi considerado como Patrimônio Natural dos municípios de Imbé/RS (Decreto 49/90), localizado às margens da Lagoa de Tramandaí, e de Laguna/SC (Lei 521/97). Entretanto, esse patrimônio pode estar ameaçado.

De acordo com a lista de espécies ameaçadas da IUCN (2008) a espécie *T. truncatus* é considerada como de Menor Preocupação. Entretanto, tal análise não leva em consideração a alta estruturação populacional da espécie, nem os impactos ambientais que as populações pequenas e isoladas estariam expostas. Para as populações de Santa Catarina e litoral norte do Rio Grande do Sul foi verificada a presença de doenças, como lobomicose (SIMÕES-LOPES *et al.*, 1993; MORENO *et al.*, 2008; DAURA-JORGE; SIMÕES-LOPES, 2011), proveniente, provavelmente, da contaminação das águas por dejetos de atividades econômicas (*e.g.* exploração do carvão mineral, uso de agrotóxicos), domésticas e hospitalares. Além disso, os botos são também alvos constantes de interações negativas com a pesca (*e.g.* emalhamentos e agressões), de impactos sonoros e atropelamentos por embarcações (*e.g.* presença de um porto pesqueiro em Laguna e de atividades náuticas) e de alterações de hábitat (*e.g.* dragagens e molhes) (SIMÕES-LOPES; DAURA-JORGE, 2008; ZAPPES *et al.*, 2011).

Devido à escassez de informação a respeito do tema e da alta vulnerabilidade das populações às atividades humanas, é de extrema importância a determinação dos limites populacionais e a variabilidade genética entre e dentro das populações de Santa Catarina e litoral norte do Rio Grande do Sul, através da utilização de marcadores moleculares. A caracterização da presença ou não de conectividade entre as populações costeiras e estuarinas do sul do Brasil permitirá que medidas de conservação e manejo de âmbito local sejam futuramente implementadas, evitando, assim, que os impactos ambientais sofridos continuem a interferir na saúde e tamanho das populações.

CAPÍTULO I

O USO DE DENTES DE *Tursiops truncatus* COMO FONTE DE DNA PARA ANÁLISES MOLECULARES COM MARCADOR MITOCONDRIAL

RESUMO

Espécimes depositados em coleções científicas são uma importante fonte de DNA para identificações taxonômicas e estudos de genética de populações. Isso é especialmente verdadeiro para as espécies raras, as quais têm um grande valor científico em função do seu pequeno tamanho amostral em museus. Além disso, muitas vezes, o acesso às coleções para a realização de estudos moleculares sobre estes táxons só é possível através do uso de técnicas de extração de DNA não-invasivas. Um método alternativo que evita a destruição das amostras de museus e de extração eficiente é apresentado no presente trabalho para quatro exemplares de boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) coletados ao longo da costa de Santa Catarina, Brasil, entre os anos de 1985 e 2007. Com o auxílio de uma furadeira (modelo Bosch GSR 14,4-2) com brocas de cerca de 2 mm foram feitos pequenos furos em dentes de espécimes fisicamente adultos de *Tursiops truncatus* da coleção do Laboratório de Mamíferos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMAQ/UFSC). Foram retirados entre 100-150 mg de pó de dentina/cimento e desmineralizados por 7 dias à 55° C com 950 µl de EDTA (0,5 M; pH 8). Este material foi incubado à 55° C *overnight* para que as células sofressem digestão de proteínas e RNA pela ação de 300 µl de Tampão ATL, 20 µl de Proteinase K e 1 µl de RNase. A etapa final foi concluída pelo kit de extração *Qiagen DNA Investigator* (QIAGEN®). A eficiência do DNA extraído foi testada através da amplificação de um fragmento de no mínimo 362 pares de base (pb) da região controladora do DNA mitocondrial em quatro espécimes de *T. truncatus*. Um total de dois haplótipos com 11 sítios polimórficos foram encontrados. O alto polimorfismo observado é uma possível decorrência da grande variabilidade genética do gênero *Tursiops*. Em casos onde existe a hipótese de subespécies baseada em caracteres morfológicos, a identificação molecular pode ajudar a atribuir os espécimes de museus a cada ecótipo, sendo de extrema importância o uso de métodos de extração eficientes e não-invasivos, como o demonstrado aqui, para a obtenção de resultados satisfatórios e preservação dos exemplares.

Palavras-chave: DNA difícil, museus, boto-da-tainha, Brasil

ABSTRACT

Museum specimens are an important source of DNA for taxonomic identifications and population genetics studies. This is especially true for rare species, which has great scientific value due to its small sample size in museums. Moreover, often, access to collections for performing molecular studies on these taxa is only possible through the use of nondestructive DNA extraction techniques. An alternative method, which avoids the destruction of museum samples and with an efficient DNA extraction is presented here for four bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) specimens collected along the coast of Santa Catarina, Brazil, from 1985 to 2007. This is the first study in Brazil to amplify teeth DNA of *T. truncatus* for the mtDNA control region. Using a drill (Bosch GSR 14.4-2 model) with drill bits of about 2 mm, small holes were made in teeth of specimens of *Tursiops truncatus* physically adults deposited in the collection of the Laboratório de Mamíferos Aquáticos, Universidade Federal de Santa Catarina (LAMAQ/UFSC). Between 100-150 mg of powdered dentin/cementum were removed and demineralized for 7 days at 55° C with 950 µl of EDTA (0.5 M, pH 8). This material was incubated at 55° C overnight to the cells suffer digestion of proteins and RNA by the action of 300 µl of Buffer ATL, 20 µl Proteinase K and 1 µl of RNase. The final step was completed by the extraction kit Qiagen DNA Investigator (QIAGEN®). The efficiency of the extracted DNA was tested by amplification of a fragment of at least 362 base pairs (bp) of the mitochondrial DNA control region in four specimens of *T. truncatus*. A total of two haplotypes were defined from 11 polymorphic sites. The high polymorphism detected is a possible consequence of the great genetic variability of the genus *Tursiops*. In cases where there is the subspecies hypothesis based on morphological data, molecular identification can help to assign these museum specimens to each ecotypes, being extremely important the use of efficient and nondestructive extraction methods, as showed here, to obtain satisfactory results and to conserve the specimens.

Keywords: difficult DNA, museums, bottlenose dolphins, Brazil

INTRODUÇÃO

Atualmente duas espécies são mundialmente reconhecidas para o gênero *Tursiops* - *T. truncatus* e *T. aduncus* (MÖLLER; BEHEREGARAY, 2001; COMMITTEE ON TAXONOMY, 2012). Contudo, com a descrição de novas subespécies e, até mesmo, espécies (e.g. WANG; CHOU; WHITE, 1999; 2000; BARRETO, 2000; NATOLI; PEDDEMORS; HOELZEL, 2004; CHARLTON-ROBB *et al.*, 2011; PERRIN *et al.*, 2011), mantém-se a polêmica das discussões taxonômicas do gênero. Diversos estudos têm-se valido de técnicas de extração de DNA antigo - caracterizado como DNA extraído de material biológico de dezenas a centenas de milhares de anos (LEONARD, 2008) - para utilizar material biológico depositado em coleções científicas na tentativa de demonstrar diferenças genéticas e morfológicas entre espécimes do gênero. Perrin *et al.* (2011) tentaram extrair DNA de dentes para comparar diferenças entre dois ecótipos de *Tursiops truncatus* ao longo da costa da Califórnia (USA). O mesmo ocorreu com Charlton-Robb *et al.* (2011), que através da análise de DNA de dentes de espécimes depositados em coleções, sugeriram a existência de uma nova espécie para o gênero no sul da Austrália (*Tursiops australis*).

Espécimes depositados em coleções científicas são uma importante fonte de DNA para identificação de espécies (e.g. PICHLER; OLAVARRÍA, 2001), na análise da diversidade genética de populações já extintas (e.g. NICHOLS *et al.*, 2007) e na verificação de mudanças na diversidade genética de populações com o passar dos anos (e.g. ROSENBAUM *et al.*, 2000; PICHLER; DALEBOUT; BAKER, 2001). Diversos materiais biológicos podem ser usados no processo de extração de DNA de exemplares de museus, como ossos, dentes e cerdas bucais (ROSENBAUM *et al.*, 1997; PICHLER; DALEBOUT; BAKER, 2001; MORIN *et al.*, 2007), porém, o DNA de todos estes materiais pode ser de difícil obtenção por estar degradado, sendo mais complexo de analisar do que o DNA moderno (LEONARD, 2008). Além disso, outra grande dificuldade de se utilizar amostras de coleções científicas é, muitas vezes, o pequeno número amostral disponível.

Devido à necessidade de destruição de partes das amostras de coleções científicas pelas técnicas de extração de DNA, o acesso a esses espécimes, muitas vezes, é limitado. Desta forma, algumas técnicas foram aprimoradas para evitar o uso de grande quantidade de material

científico e destruição de exemplares, aumentando também a eficiência dos métodos de extração de DNA. Rohland, Siedel e Hofreiter (2004) desenvolveram um método de extração em que a amostra é submersa em Tiocianato de Guanidina (GuSCN) sem a adição de grandes quantidades de reagentes de desmineralização. Somente o tampão é subsequentemente processado, promovendo a preservação do espécime. Contudo, embora tendo obtido fragmentos que variaram de 200-400 pb quando da amplificação pela PCR, este método foi utilizado apenas para extração de DNA de dentes de chimpanzés (*Pan troglodytes verus*) e hienas (*Crocuta crocuta*; *Hyaena hyaena*; *Parahyaena brunnea*).

Um eficiente e não-invasivo método de extração de DNA em Odontocetos foi demonstrado por Pichler, Dalebout e Baker (2001), utilizando dentes de cachalotes (*Physeter macrocephalus*). Com o auxílio de uma furadeira, os autores fizeram furos de 1,5-2,0 mm de largura e 2,0-3,0 mm de profundidade em cada dente, sendo capazes de extrair uma quantidade de 0,01-0,02 g de pó de dentina/cimento e amplificando fragmentos de 550-800 pb da região controladora do DNA mitocondrial, além de dois loci de DNA microsatélites.

Para a espécie *T. truncatus*, é possível citar a utilização de diversas técnicas de extração de DNA antigo, porém por se tratarem de amostras com DNA degradado, muitas vezes, há uma redução da quantidade de DNA extraído e dos tamanhos de fragmentos amplificados (LEONARD, 2008). De acordo com Nichols *et al.* (2007), o DNA antigo foi utilizado para avaliar o estado de uma população histórica de boto-da-tainha de um local na costa do Reino Unido onde a espécie não é mais avistada. Utilizando uma técnica que retira as amostras dos dentes direto da cavidade pulpar e seguindo o método de extração sugerido por Yang *et al.* (1998), os autores foram capazes de amplificar fragmentos de aproximadamente 250 pb. Já no sul do Brasil, Weber *et al.* (2007), com o objetivo de testar o potencial de amostras de dentes de *T. truncatus* como fonte de mtDNA para estudos de taxonomia e genética de populações, utilizaram um método de moagem de dentes, seguida da extração sugerida por Hoelzel (1998), amplificando um fragmento de apenas 123 pb para o gene citocromo-b. Resultados significativos foram obtidos por Perrin *et al.* (2007) para *Tursiops aduncus*. Com o intuito de comparar caracteres genéticos do espécime holótipo com os demais exemplares de *T. aduncus*, Perrin e colaboradores seguiram a técnica de extração sugerida por Hofreiter *et al.* (2004), amplificando fragmentos de 399 pb da região controladora do mtDNA com o auxílio de dois pares de primers.

Marcadores de mtDNA são os mais usados em estudos com DNA antigo. Cada célula contém uma grande quantidade de cópias do genoma mitocondrial e apenas uma única cópia diplóide do genoma nuclear. Desta forma o uso de marcadores mitocondriais aumenta as chances de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA geralmente degradado (BINLADEN *et al.*, 2006; MORIN *et al.*, 2007). Além disso, apesar dos marcadores microssatélites serem os mais visados para estudos de genética de populações, o tamanho em pares de bases, o pequeno número de cópias e as diferenças em tamanho entre os alelos da maioria dos loci podem dificultar a amplificação do DNA degradado, resultando também, muitas vezes, em fuga de alelos, do inglês *allelic dropout* (FOOTE; HOFREITER; MORIN, 2011).

Espécimes de coleções científicas são geralmente a única fonte de material genético para muitas populações e espécies de cetáceos. Devido à grande importância do DNA antigo na caracterização do tamanho populacional histórico, níveis de fluxo gênico e relações com outras populações (LEONARD, 2008), além das incertezas a respeito da taxonomia do gênero *Tursiops*, principalmente, na costa oeste do Atlântico Sul (BARRETO, 2000), este trabalho demonstra a partir de um método não-invasivo e prático a eficiência da extração de DNA a partir de dentes via amplificação pela PCR de exemplares de *T. truncatus* depositados em coleções científicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de dentes utilizadas neste estudo são provenientes de quatro exemplares de *T. truncatus* depositados na coleção científica do Laboratório de Mamíferos Aquáticos, Departamento de Ecologia e Zoologia, da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os exemplares são originários de eventos de encalhes ocorridos entre os anos de 1985 e 2007 ao longo da costa de Santa Catarina (Anexo 1).

O processo de preparação do material para ser depositado na coleção científica incluiu a maceração do esqueleto em água, seguido do processo de limpeza dos ossos e dos dentes com sabão em pó ou detergente. Após a limpeza e secagem do material, os dentes foram armazenados em potes completados com uma mistura de álcool 70% e glicerina (3:1).

Processo de Descontaminação

As amostras foram descontaminadas através da imersão dos dentes em etanol absoluto por cinco minutos.

Processo de Trituração e Desmineralização

Com o auxílio de uma furadeira (modelo Bosch GSR 14,4-2) com brocas de cerca de 2 mm foram feitos de um a dois pequenos furos em cada dente, extraindo cerca de 100-150 mg de pó de dentina/cimento. O pó de dentina passou, então, pelo processo de desmineralização, conforme descrito por Pimper *et al.* (2009), com rotação de 7 dias, à 55° C com 950 µl de EDTA (0,5 M; pH 8). Todo este processo foi cuidadosamente realizado em um local devidamente esterilizado com hipoclorito de sódio (NaClO), para evitar contaminação com DNA de outros indivíduos. Vale destacar que apenas os dentes de exemplares considerados fisicamente maduros, ou próximos a atingir a maturidade física (*c.f.*, COSTA; SIMÕES-LOPES, 2012), foram utilizados neste estudo, devido à preservação da cavidade pulpar e menor área de contato com agentes contaminantes.

Extração de DNA

Após a etapa de desmineralização, foi feito o processo de digestão de proteínas e RNA onde foram adicionados 300 µl de Tampão ATL do kit de extração *Qiagen DNA Investigator* (QIAGEN®), 20 µl de Proteinase K e 1 µl de RNase ao tubo usado na desmineralização, com incubação à 55° C *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a segunda etapa de extração com o kit de extração *Qiagen DNA Investigator* (QIAGEN®). Foi adicionado 300 µl de Tampão AL ao tubo do procedimento anterior contendo a amostra, o tampão de lise e Proteinase K, o qual foi misturado no vórtex por 10 s cada tubo.

Uma nova incubação foi feita à 70° C, por 10 min, agitando cada amostra por 10 s no vórtex a cada 3 min. As amostras foram então centrifugadas em alta velocidade (14.000 rpm) por 1 min, sendo o sobrenadante transferido para um novo microtubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Neste novo tubo foram adicionados 150 µl de Etanol (95-100%) e o conteúdo misturado por 15 s no vórtex. O sobrenadante foi novamente transferido para a coluna MinElute QIAmp (microtubo de coleta de 2 ml), sendo centrifugado a 6.000 x g por 1 min. Nesta etapa, e nas seguintes, foram descartados todos os microtubos de coleta com o filtrado e novos microtubos de 2 ml foram adicionados à coluna MinElute QIAmp. Foram adicionados 600 µl de Tampão AW1, centrifugando à 6.000 x g por 1 min; 700 µl de Tampão AW2, centrifugando à 6.000 x g por 1 min e 700 µl de Etanol (95-100%), centrifugando à 6.000 x g por 1 min. A coluna com o novo microtubo de coleta limpo de 2 ml foi centrifugada à velocidade máxima (14.000 rpm) por 3 min para a completa secagem da membrana. Um novo microtubo de microcentrífuga de 1,5 ml foi adicionado à coluna, sendo o filtrado descartado. As amostras foram novamente incubadas à temperatura ambiente (10-25° C) com a tampa aberta por 10 min. Aplicou-se 35 µl de Tampão TE no centro da membrana e incubou-se o material pela segunda vez à temperatura ambiente (10-25° C) com a tampa fechada por 10 min. Para finalizar o processo de extração, as amostras foram centrifugadas à velocidade máxima (14.000 rpm) por 1 min e armazenadas à -20° C.

Amplificação do mtDNA e Sequenciamento

A eficiência do DNA extraído foi testada através da amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) de um fragmento específico da região controladora do DNA mitocondrial (mtDNA) seguindo a metodologia empregada por Pimper *et al.* (2009), com adaptações no processo de reação. Um fragmento de 360 pb da região controladora foi amplificado utilizando

os primers Dlp-5 (5'-CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3') e Dlp-10 (5'-CCACAGTACTATGTCCGTATT-3'; BAKER *et al.*, 1993) em uma reação de 50 µl. Dez µl de DNA extraído (não foi estimada a concentração do DNA antes do PCR) foram adicionados diretamente à 1,2x PCR Master Mix DreamTaq (Fermentas), 2,6 mM de MgCl₂ e 1,6 pmol/µl de cada primer. Controles negativos foram usados para garantir que não houvesse contaminação dos produtos de PCR. O ciclo do PCR utilizado foi o seguinte: desnaturação inicial de 3 min à 94° C, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 30 s à 94° C, anelamento dos primers por 45 s à 55° C, extensão da polimerase por 1 min à 72° C, seguida pela extensão final de 10 min à 72° C. A amplificação dos produtos de PCR foi verificada em gel de agarose 1% e a purificação seguiu o protocolo de Purificação com Enzimas - Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) e Exonuclease I (EXO). O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa Macrogen, na Coréia do Sul.

Análises dos dados

A qualidade do sequenciamento foi avaliada pelo programa ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au>) e sua identidade confirmada utilizando-se o BlastN (Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide) (NCBI site). O alinhamento das sequências foram feitas no ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997) e a edição manual realizada no programa BioEdit 7.0.9 (HALL, 1999). Os sítios polimórficos, o número de haplótipos (h) e as diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) foram estimadas utilizando o programa DnaSP 5.1 (ROZAS *et al.*, 2003).

RESULTADOS

O DNA foi extraído com sucesso para todas as quatro amostras de dentes de *Tursiops truncatus*, obtendo-se concentrações de PCR de cerca de 20-30 ng/μl. Para três exemplares (UFSC 1011, UFSC 1299 e UFSC 1317) foi amplificado um fragmento de 362 pb e para um indivíduo (UFSC 1349) obteve-se 400 pb para a região controladora do mtDNA. O alinhamento das quatro sequências de 362 pb revelou a existência de dois haplótipos com 11 sítios polimórficos (Tabela 1).

A diversidade genética foi estimada para todos os indivíduos em conjunto (Tabela 2), obtendo-se como resultado diversidades nucleotídica e haplotípica moderadas (π : 0.01532 e Hd: 0.500).

Tabela 1. Os dois haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial de *Tursiops truncatus* coletados ao longo da costa catarinense, com ênfase nos sítios polimórficos identificados dentro da sequência de 362 pb das amostras de DNA extraídas a partir de dentes. Cada coluna representa a posição na sequência do mtDNA em que foi observado polimorfismo entre os haplótipos.

	4	7	1	1	1	1	1	2	2	2	3
	1	9	1	4	4	5	7	0	3	4	2
			9	4	8	3	6	3	1	4	7
H1	C	T	C	C	C	C	T	C	C	C	T
H2	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C

Tabela 2. Diversidade genética do mtDNA das amostras de DNA extraídas a partir de dentes dos exemplares de *Tursiops truncatus* coletados ao longo da costa catarinense. Tamanho amostral (n), diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (Hd).

Amostra	n	Hd (\pm SD)	π (\pm SD)
Litoral de Santa Catarina (SC)	4	0,500 (\pm 0,265)	0,01532 (\pm 0,00812)

DISCUSSÃO

O protocolo utilizado neste estudo resultou em uma extração de DNA de dentes eficiente, ou seja, material genético em quantidade e integridade que permitiu a recuperação via PCR de um fragmento considerável da região alvo, de pelo menos 362 pb da região controladora do mtDNA, considerando que as amostras foram expostas a condições ambientais extremamente adversas (*e.g.* altas temperaturas e umidade). Os fragmentos amplificados para o mtDNA foram de tamanhos maiores do que muitos estudos realizados previamente para a espécie de *Tursiops truncatus* com DNA degradado (*e.g.* NICHOLS *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2007). Weber *et al.* (2007), utilizando amostras de *T. truncatus* depositados em coleções científicas entre os anos de 1978 e 1995, obtiveram concentrações de PCR de 3 à 12 ng/μl e fragmentos de apenas 123 pb para a região BDR do Citocromo b. Já Nichols *et al.* (2007) foram capazes de amplificar fragmentos de aproximadamente 250 pb da região controladora do mtDNA. O fragmento amplificado de maior tamanho com 400 pb (UFSC 1349) foi similar aos obtidos nas amostras de exemplares biopsiados (COSTA, dados não publicados; ver Capítulo II deste estudo), possuidores de um DNA de melhor qualidade. Já as concentrações de PCR variaram de 20 à 30 ng/μl.

A extração através da perfuração, além de não-invasiva, permite a utilização de alguns dentes de cada espécime apenas, viabilizando a obtenção de amostras de DNA de espécies com número reduzido de dentes e/ou ainda raras, como o caso dos zifídeos, e até mesmo de espécies extintas ou também de holótipos depositados em coleções científicas (*e.g.* PICHLER; DALEBOUT; BAKER, 2001). Além disso, é um método no qual a superfície de contato exposta à contaminação é menor do que a das extrações realizadas através de processos convencionais de quebra e destruição das amostras.

Os dois haplótipos observados para as quatro amostras são consistentes com os encontrados nas subpopulações de Laguna e litoral norte do Rio Grande do Sul (COSTA, dados não publicados; ver Capítulo II deste estudo). Além disso, é possível observar que, apesar dos indivíduos terem encalhado em regiões próximas, há um grande polimorfismo dentro da amostra, reafirmando a grande variação genética e morfológica citada para o gênero (WANG; CHOU; WHITE, 1999; 2000; BARRETO, 2000; CHARLTON-ROBB *et al.*, 2011).

Poucos estudos analisaram a estrutura populacional e variação morfológica da espécie ao longo da costa oeste do Atlântico Sul (SIMÕES-LOPES, 1996; BARRETO, 2000; OTT *et al.*, 2009). Simões-Lopes (1996), de acordo com observações da morfologia externa de exemplares da espécie, sugeriu a presença das formas costeira e oceânica ao longo da costa brasileira. Já Barreto (2000), baseando-se em caracteres da morfologia craniana e distribuição geográfica, citou a presença de duas subespécies – *T. truncatus truncatus* e *T. truncatus gephyreus*. Em relação à estrutura populacional, baseada em dados moleculares do mtDNA, Ott e colaboradores (2009) demonstraram a existência de pelo menos três grupos populacionais (Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Bacia de Campos/Santos e litoral do Rio Grande do Sul).

Em casos onde existe a hipótese de subespécies baseada em caracteres morfológicos ou outros dados fenotípicos, a identificação molecular pode ajudar a atribuir os espécimes de museus a cada subtipo (FOOTE; HOFREITER; MORIN, 2011). Dessa forma, devido à grande variação encontrada para a espécie de *T. truncatus* e as incertezas a respeito da existência de diferentes subespécies ao longo do litoral do Brasil, é de extrema importância a necessidade de estudos que levem em consideração não somente caracteres morfológicos de exemplares depositados em coleções científicas, como também, genéticos. O uso de métodos de extração eficientes e não-invasivos, como o demonstrado neste trabalho auxilia na obtenção de DNA de boa qualidade a partir de espécimes de museus e reforça a necessidade da manutenção de coleções científicas para a preservação de espécimes para estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- BAKER, C.S.; PERRY, J.; BANNISTER, J.L.; WEINRICH, M.T.; ABERNETHY, R.B.; CALAMBOKIDIS, J.; LIEN, J.; LAMBERTSEN, R.H.; URBÁN RAMÍREZ, J.; VASQUEZ, O.; CLAPHAM, P.J.; ALLING, A.; O'BRIEN, S.J.; PALUMBI, S.R. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 90, p. 8239-8243, 1993.
- BARRETO, A.S. **Variação craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) (Montagu, 1821) na costa atlântica da América do Sul**. 2000. 122 f. Tese de Doutorado em Oceanografia - Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande.
- BINLADEN, J.; WIUF, C.; GILBERT, M.T.; BUNCE, M.; BARNETT, R.; LARSON, G.; GREENWOOD, A.D.; HAILE, J.; HO, S.Y.W.; HANSEN, A.J.; WILLERSLEV, E. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. **Genetics**, v. 172, n. 2, p. 733-741, 2006.
- CHARLTON-ROBB, K.; GERSHWIN, L.-A.; THOMPSON, R.; AUSTIN, J.; OWEN, K.; MCKECHNIE, S. A new dolphin species, the Burrunan dolphin *Tursiops australis* sp. nov., endemic to Southern Australian coastal waters. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 1-17, 2011.
- COMMITTEE ON TAXONOMY. **List of marine mammal species and subspecies**. 2012. Disponível em: <http://www.marinemammalscience.org/index.php?option=com_content&view=article&id=420&Itemid=280>. Acesso em 09 jan. 2013.
- COSTA, A.P.B.; SIMÕES-LOPES, P.C. Physical maturity of the vertebral column of *Tursiops truncatus* (Cetacea) from Southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, n. 1, p. 2-7, 2012.
- FOOTE, A.D.; HOFREITER, M.; MORIN, P.A. Ancient DNA from marine mammals: Studying long-lived species over ecological and evolutionary timescale. **Annals of Anatomy**, v. 194, n. 1, p. 112-120, 2012.
- HALL, T. BioEdit, Versão 5.0.9. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

- HOELZEL, A.R. **Molecular genetic analysis of populations. A practical approach.** Oxford: Oxford University Press. 1998.
- HOFREITER, M.; RABEDER, G.; JAENICKE-DESPRES, V.; WITHALM, G.; NAGEL, D.; PAUNOVIC, M.; JAMBRESIC, G.; PÄÄBO, S. Evidence for reproductive isolation between cave bear populations. **Current Biology**, v. 14, p. 40-43, 2004.
- LEONARD, J.A. Ancient DNA applications for wildlife conservation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4186-4196, 2008.
- MÖLLER, L.M.; BEHEREGARAY, L.B. Coastal bottlenose dolphins from southeastern Australia are *Tursiops aduncus* according to sequences of the mitochondrial DNA control region. **Marine Mammal Science**, v. 17, p. 249-263, 2001.
- MORIN, P.A.; HEDRICK, N.M.; ROBERTSON, K.M.; LEDUC, C.A. Comparative mitochondrial and nuclear quantitative PCR of historical marine mammal tissue, bone, baleen, and tooth samples. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 404-411. 2007.
- NATOLI, A.; PEDDEMORS, V.M.; HOELZEL, A.R. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, p. 363-375, 2004.
- NICHOLS, C.; HERMAN, J.; GAGGIOTTI, O.E.; DOBNEY, K.M.; PARSONS, K.; HOELZEL, A.R. Genetic isolation of a now extinct population of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, p. 1611-1616, 2007
- OTT, P.H.; TAVARES, M.; MORENO, I.B.; OLIVEIRA, L.R.; DANILEWICZ, D. Os cetáceos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. In: MOHR, L.V.; CASTRO, J.W.A.; COSTA, P.M.S.; ALVES, R.J.V. (Ed.) **Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo** (Volume II). Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2009. p. 283-300.
- PERRIN, W.F.; ROBERTSON, K.M.; VAN BREE, P.J.H.; MEAD, J.G. Cranial description and genetic identity of the holotype specimen of *Tursiops aduncus* (Ehrenberg, 1832). **Marine Mammal Science**, v. 23, n. 2, p. 343-357, 2007.
- PERRIN, W.F.; THIELEKING, J.L.; WALKER, W.A.; ARCHER, F.I.; ROBERTSON, K.M. Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: cranial differentiation of coastal and offshore forms. **Marine Mammal Science**, v. 27, n. 4, p. 769-792, 2011.

- PICHLER, F.B.; DALEBOUT, M.L.; BAKER, C.S. Nondestructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 1-4, 2001.
- PICHLER, F.B; OLAVARRÍA, C. Resolving Chilean dolphin (*Cephalorhynchus eutropia*, Gray 1846) synonymy by sequencing DNA extracted from teeth of museum specimens. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 36, n. 1, p. 117-121. 2001.
- PIMPER, L.E.; REMIS, M.I.; GOODALL, R.N.P.; BAKER, C.S. Teeth and bones as sources of DNA for genetic diversity and sex identification of Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) from Tierra del Fuego, Argentina. **Aquatic Mammals**, p. 35, n.3, p. 330-333, 2009.
- ROHLAND, N.; SIEDEL, H.; HOFREITER, M. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. **BioTechniques**, v. 36, n. 5, p. 814-821, 2004.
- ROSENBAUM, H.C.; EGAN, M.G.; CLAPHAM, P.J.; BROWNELL, R.L.,Jr.; DESALLE, R. An effective method for isolating DNA from historical specimens of baleen. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 677-681, 1997.
- ROSENBAUM, H.C.; EGAN, M.G.; CLAPHAM, P.J.; BROWNELL, R.L.,Jr.; MALIK, S.; BROWN, M.W.; WHITE, B.N.; WALSH, P.; DESALLE, R. Utility of North Atlantic Right Whale museum specimens for assessing changes in genetic diversity. **Conservation Biology**, v. 14, n. 6, p. 1837-1842, 2000.
- ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X., ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphisms analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.
- SIMÕES-LOPES, P.C. Offshore and coastal bottlenose dolphins on southern Brazil: preliminary comparisons on coloration. In: Reunión de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 7, 1996, Viña del Mar, Chile. **Anais da VII Reunión de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur**, p. 84.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.C. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

- WANG, J.W.; CHOU, L.S.; WHITE, B.N. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1603-1612, 1999.
- WANG, J.Y.; CHOU, L.-S.; WHITE, B.N. Osteological differences between two sympatric forms of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. **Journal of Zoology (London)**, v. 252, p. 147-162, 2000.
- WEBER, L.I.; LUCA, M.J.; BARRETO, A.S.; SOUZA, T.T. Successful amplification of mitochondrial DNA from dentin of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 11-19, 2007.
- YANG, D.Y.; ENG, B.; WAYE, J.S.; DUDAR, J.C.; SAUNDERS, S.R. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 105, p. 539-543, 1998.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA DAS SUBPOPULAÇÕES DE *Tursiops truncatus* DO SUL DO BRASIL

RESUMO

No Brasil, os botos-da-tainha (*Tursiops truncatus*) que habitam ambientes estuarinos podem apresentar um alto índice de fidelidade ao hábitat. Existem quatro populações residentes conhecidas, as quais habitam regiões estuarinas da costa sul do Brasil: Laguna (SC), Rio Mampituba (RS), Lagoa de Tramandaí (RS) e Lagoa dos Patos (RS). Movimentos de indivíduos de diferentes populações entre as áreas foram registrados anteriormente, porém, pouco se conhece sobre a estrutura e existência de fluxo gênico entre as populações residentes e, até mesmo, entre os grupos formados por indivíduos transeuntes. Devido à escassez de informação a respeito do tema e a alta vulnerabilidade das populações costeiras/estuarinas às atividades humanas, objetivou-se caracterizar geneticamente as subpopulações de *T. truncatus* localizadas no sul do Brasil, assim como, verificar a presença de fluxo gênico entre as áreas de estudo. Entre 1994 e 2012 foram coletadas amostras oriundas de biópsias de pele de botos foto-identificados e de tecido de animais encalhados de três áreas geograficamente distintas: Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, Laguna/SC (n=10), litoral de Santa Catarina (n=5) e litoral norte do Rio Grande do Sul (n=29). Foram amplificadas 44 sequências de 316 pb da região controladora do DNA mitocondrial, resultando na presença de um total de oito haplótipos. Um único haplótipo foi compartilhado entre as três subpopulações, sugerindo uma restrição ao fluxo gênico entre as mesmas. A subpopulação do litoral norte gaúcho apresentou oito haplótipos, litoral de Santa Catarina dois e Laguna apenas um. Em geral, a diversidade nucleotídica foi considerada moderada ($\pi=0,01700$), assim como, a haplotípica ($Hd=0,695$). A diferenciação genética entre as subpopulações foi evidenciada pelos altos índices de fixação entre Laguna e litoral gaúcho ($\Phi_{st}=0,30529$; $p<0,05$), sugerindo a existência de, pelo menos, dois grupos populacionais históricos (linhagens mitocondriais). Essa estruturação pode ser resultado da alta filopatria das fêmeas, fato já sugerido anteriormente para Laguna (SC) e Imbé/Tramandaí (RS) através de estudos de foto-identificação. Além disso, o mtDNA é um marcador molecular de herança matrilinear, desta forma, conta-se apenas a história das fêmeas. Neste sentido não se pode descartar a existência de dispersão mediada pelos machos e, conseqüentemente, a possibilidade de fluxo gênico atual entre as subpopulações. No entanto, a descoberta de linhagens altamente diferenciadas em *T. truncatus* de áreas geograficamente próximas torna estes resultados uma

ferramenta muito importante na definição de unidades de conservação e manejo biologicamente significativas.

Palavras-chave: boto-da-tainha, *D-loop*, filopatria, Brasil

ABSTRACT

In Brazil, bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting coastal environments may have a high level of hábitat fidelity. There are four inshore resident populations known, which inhabit the estuarine regions of the southern coast of Brazil: Laguna (SC), Rio Mampituba (RS), Lagoa de Tramandaí (RS) e Lagoa dos Patos (RS). Movements of individuals from different populations between areas were reported earlier. However, little is known about the structure and the presence of gene flow among the resident populations and even among groups formed by transeunt individuals. Due to the scarcity of information on the subject and the high vulnerability of coastal populations to human activities, this study aimed to genetically characterize the subpopulations of *T. truncatus* from the southern Brazil, as well as verifying the presence of gene flow between the areas. Between 1994 and 2012 skin biopsy samples from individually identified animals and tissue samples from stranded carcasses were collected from three geographically distinct areas from southern Brazil: Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, Laguna/SC (n=10), coast of Santa Catarina (n=05) and northern coast of Rio Grande do Sul (n=29). The amplification of 44 sequences with a fragment of 316 bp of the mitochondrial DNA control region resulted in eight distinct haplotypes. Only one haplotype was shared between the three subpopulations, suggesting a restriction of gene flow among them. A total of eight haplotypes were found in the subpopulation from the northern coast of Rio Grande do Sul, two in Santa Catarina and only one in Laguna. Overall nucleotide diversity ($\pi=0.01700$) and haplotype diversity ($Hd=0.695$) were moderate. The genetic differentiation among subpopulations was supported by the high fixation index between Laguna and the subpopulation of Rio Grande do Sul ($\phi_{st}=0.30529$; $p<0.05$), suggesting the occurrence of at least two historical population groups (mitochondrial lineages). This structure appears to be a possible consequence of high females' philopatry, a fact previously suggested to Laguna (SC) and Imbé/Tramandaí (RS) by photo-identification studies. Additionally, mtDNA is a molecular marker of matrilineal inherited, thus regard only the history of females. In this sense we cannot discard the existence of dispersion mediated by males and, consequently, the possibility of current gene flow between subpopulations. However, the discovery of highly differentiated lineages of *T. truncatus* from

areas geographically closes provide key information for defining biologically meaningful conservation and management units.

Keywords: bottlenose dolphins, D-loop, philopatry, Brazil

INTRODUÇÃO

A aparente falta de barreiras geográficas visíveis e a ampla distribuição de algumas espécies ao longo dos oceanos, muitas vezes, fazem com que diversas populações de uma mesma espécie de mamífero marinho sejam consideradas como uma única população. Contudo, nos últimos anos, estudos baseados, principalmente, em técnicas moleculares e de foto-identificação, têm demonstrado a existência de populações restritas a uma única área ou subdivididas em unidades demográficas independentes (ROSEL; DIZON; HEYNING, 1994; BROWN GLADDEN; FERGUSON; CLAYTON, 1997; HOELZEL; POTTER; BEST, 1998; PARSONS *et al.*, 2002; NATOLI; PEDDEMORS; HOELZEL, 2004; MARTIEN; BAIRD; ROBERTSON, 2005; NATOLI *et al.*, 2005; SANINO *et al.*, 2005; WARING; QUINTAL; SWARTZ, 2007; BAIRD *et al.*, 2009).

De acordo com Waring, Quintal e Swartz (2007), são reconhecidas oito populações de *Tursiops truncatus* ao longo da costa oeste do Atlântico Norte. Já no Pacífico Norte, onde anteriormente acreditava-se na existência de uma única população de *T. truncatus* dentro da Zona Econômica Exclusiva do Hawaii, demonstrou-se a presença de subunidades independentes ao redor de cada uma das quatro ilhas havaianas utilizadas como áreas de estudo (BAIRD *et al.*, 2009). De acordo com os últimos autores, não foi observada dispersão de indivíduos entre as áreas, demonstrando um alto índice de fidelidade ao hábitat para cada população analisada.

A presença de dispersão, que pode ser o movimento de um indivíduo de uma área ou população para outra área/população com intuito de se reproduzir (HOWARD, 1963), pode demonstrar que populações subdivididas espacialmente apresentam fluxo gênico, formando assim, metapopulações. Em geral, os mamíferos possuem uma dispersão preferencial de machos (GREENWOOD, 1980), incluindo os cetáceos, como os do gênero *Tursiops* (*e.g.* MÖLLER; BEHEREGARAY, 2004). Embora alguns autores citem que tanto os machos, quanto as fêmeas de populações costeiras de botos-da-tainha costumam permanecer em suas áreas natais até a idade adulta (CONNOR *et al.*, 2000; TSAI; MANN, 2012).

A existência de populações de *T. truncatus* com alto índice de fidelidade ao hábitat também parece ser comum no sul do Brasil, as quais dão grande preferência à ocupação de áreas próximas a desembocaduras de rios (*e.g.* Rio Mampituba, em Torres/RS), lagoas (*e.g.* Barra da

Lagoa de Tramandaí, em Tramandaí/RS, e Lagoa dos Patos, em Rio Grande/RS) e estuários (e.g. Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, em Laguna/SC) (SIMÕES-LOPES, 1995; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999; HOFFMANN, 2004; DI TULLIO, 2009; GIACOMO, 2010; FRUET *et al.*, 2011; DAURA-JORGE, 2011; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Entretanto, apesar do registro de movimentos de indivíduos entre as áreas (e.g. MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999; HOFFMANN, 2004), pouco se conhece sobre a estrutura e presença de fluxo gênico entre as populações residentes e, até mesmo, em relação aos grupos formados por indivíduos transeuntes com áreas de vida maiores que os limites amostrados.

A caracterização genética de *T. truncatus* em outras localidades costeiras e oceânicas vem sendo extensamente analisada (HOELZEL; POTTER; BEST, 1998; PARSONS *et al.*, 2002; NATOLI; PEDDEMORS; HOELZEL, 2004; NATOLI *et al.*, 2005; SANINO *et al.*, 2005; LOWTHER, 2006; PERRIN *et al.*, 2011). Contudo, no Brasil, poucos estudos levam em consideração a variabilidade genética da espécie (e.g. BARRETO, 2000; FRUET, 2005; OLIVEIRA *et al.* 2008; OTT *et al.*; 2009). Recentemente, Ott e colaboradores (2009) caracterizaram geneticamente a população de *T. truncatus* encontrada ao redor das ilhas oceânicas do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, avaliando sua relação com outras populações da espécie ao longo da costa brasileira. Através da análise de sequências da região controladora de DNA mitocondrial (mtDNA) os autores descobriram a existência de apenas dois haplótipos para a população insular, um número muito menor do que registrado nas populações costeiras das Bacias de Campos/Santos (h=6) e do Rio Grande do Sul (h=7).

Marcadores mitocondriais são ótimas ferramentas para verificar a diferenciação genética dentro e entre populações devido à sua herança materna e rápida taxa evolutiva (MORIN; DIZON, 2009). A região controladora do mtDNA, conhecida como *D-loop*, é uma região rica em bases adenina e timina e exerce controle sobre a replicação do mtDNA e transcrição do RNA, sendo o arranjo genético dentro de uma mesma classe taxonômica ou filo, extremamente estável. Não obstante, a evolução à nível de sequência nucleotídica é de 5 a 10 vezes mais rápida do que no DNA nuclear, permitindo que os polimorfismos sejam mais facilmente detectados (AVISE *et al.*, 1987; BERTA; SUMICH; KOVACS, 2006). De uma maneira geral as análises com esta região são feitas através da comparação de sequências de indivíduos de uma mesma população e entre populações diferentes, sendo as sequências únicas denominadas de haplótipos (MORIN;

DIZON, 2009). A frequência de cada haplótipo, assim como, a diferença entre os nucleotídeos servem como meio de comparação da diversidade genética e separação das populações (HARTL; CLARK, 2010).

Ao estabelecer a estrutura genética das populações de *T. truncatus* é possível planejar medidas conservacionistas apropriadas para cada estoque populacional, levando em consideração o tamanho exato da população e o nível de ameaças enfrentadas. Populações costeiras, como as do atual estudo, estão em maior risco de extinção devido à proximidade de áreas modificadas pela ação humana (*e.g.* SIMÕES-LOPES; DAURA-JORGE, 2008; ZAPPES *et al.*, 2011). Dessa forma, a definição dos limites das populações e a verificação da existência de fluxo gênico entre as mesmas permitirão o estabelecimento de medidas de conservação e manejo em âmbito local.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

A área de estudo compreende o Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, Santa Catarina, e o litoral norte do Rio Grande do Sul (Figura 1).

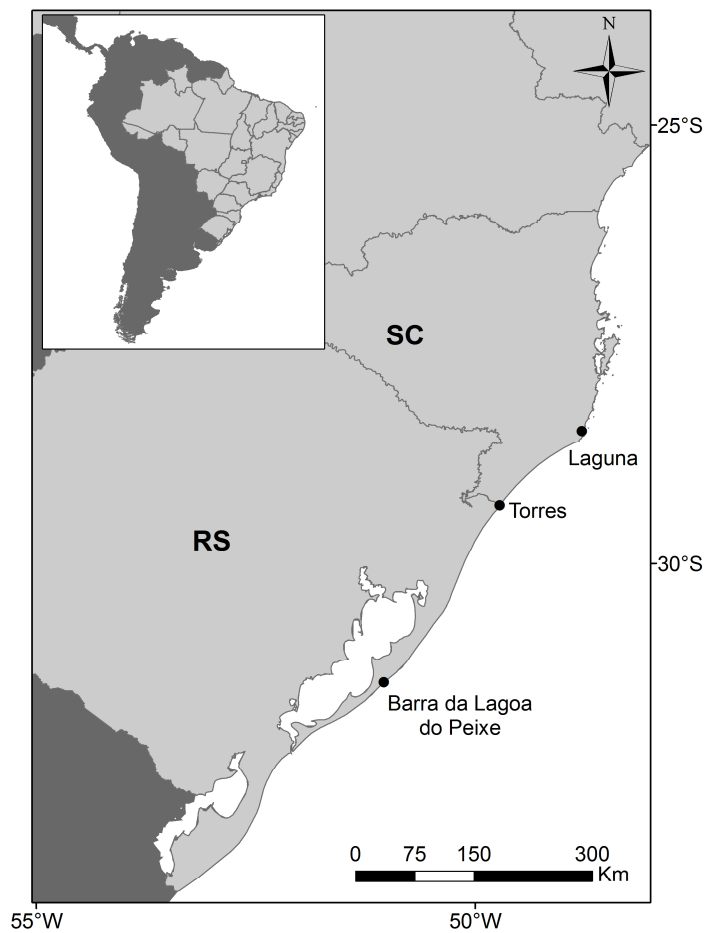


Figura 1. Mapa da área de estudo abrangendo a região sul do Brasil. Em destaque o litoral norte do Rio Grande do Sul, que se estende do município de Torres ao Parque Nacional da Lagoa do Peixe, e o município de Laguna, em Santa Catarina, onde está localizado o Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos (fonte: Karina Amaral).

O Complexo Lagunar, adjacente ao município catarinense de Laguna (28°20'S; 48°50'W) é formado por três subunidades (Lagoas Mirim, Imaruí e Santo Antônio), abrangendo uma área total de 300 km². A porção mais ao sul do Complexo é composta pela Lagoa de Santo Antônio que recebe as águas do Rio Tubarão e conecta-se ao Oceano Atlântico através do Canal da Barra, que possui cerca de 2 km de comprimento, 80 m de largura e profundidade de mais de 10 m.

O litoral norte do Rio Grande do Sul foi considerado neste estudo abrangendo uma área de cerca de 270 km de extensão, localizada entre o município de Torres (29°20'S; 49°43'W), na divisa entre Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e o Parque Nacional da Lagoa do Peixe (31°17'S; 50°57'W). Ao longo do litoral norte gaúcho são encontradas duas localidades ocupadas por populações residentes de boto-da-tainha: o estuário do rio Mampituba, localizado na cidade de Torres, e a Laguna de Tramandaí, no município de Tramandaí (29°56'S; 50°08'W), o qual dista cerca de 82 km de Torres e 219 km de Laguna.

Coleta de dados

As 10 amostras adquiridas por meio de biópsias realizadas no Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos foram coletadas pelo Laboratório de Mamíferos Aquáticos (LAMAQ), da Universidade Federal de Santa Catarina, entre maio de 2011 e maio de 2012. As biópsias foram realizadas a partir de uma pequena embarcação (5 metros) com motor de 15 hp, utilizando uma balestra e dardos desenvolvidos especificamente para a coleta de amostras de pequenos cetáceos (BROWN; KRAUS; GASKIN, 1991).

Foram utilizadas também quatro amostras de dentes provenientes de exemplares encalhados entre as latitudes 26° e 28° S do litoral de Santa Catarina e depositados na coleção científica do Laboratório de Mamíferos Aquáticos. Amostras de tecido foram coletadas apenas do indivíduo UFSC 1398, encalhado na Praia do Iró, em Laguna.

Todas as 29 amostras do litoral norte gaúcho foram coletadas e cedidas pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS). Elas são provenientes de espécimes de *T. truncatus* encalhados mortos na região mencionada acima entre os anos de 1993 e 2011, com exceção da amostra de pele MP001 proveniente de uma biópsia realizada na desembocadura do Rio Mampituba, Torres/RS (Anexo 1).

Todas as amostras foram preservadas em álcool 90% ou DMSO e armazenadas à -20° C.

Análises genéticas

Extração de DNA e Determinação molecular do sexo

A extração de DNA das amostras de tecido e pele seguiu o método de fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A extração e amplificação de DNA dos dentes seguiu a metodologia apresentada por Costa (dados não publicados; ver Capítulo I deste estudo)

A determinação molecular do sexo dos indivíduos foi realizada através da amplificação dos íntrons ZFX e ZFY em uma reação de 25 µl, utilizando os primers ZFY0097 (5'-CATCCTTTGACTGTCTATCCTTG-3') e ZFY1294 (5'-CATTATGTGCTGGTTCTTTTCTG-3'; PALSROLL *et al.*, 1992). Um µl de DNA extraído (concentração de 20 à 40 ng/µl) foi adicionado à 1x PCR Master Mix DreamTaq (Fermentas) e 1,6 pmol/µl de cada primer. As condições da reação em cadeia de polimerase (PCR) foram: desnaturação inicial de 2 min à 95° C, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 45 s à 95° C, anelamento dos primers por 45 s à 57° C, extensão da polimerase por 1 min e 30 s à 72° C, seguida pela extensão final de 5 min à 72° C.

Como as bandas para diferenciação dos sexos possuem comprimentos similares, após a amplificação, foi realizada também uma clivagem utilizando a enzima de endonuclease Taq I (PALSROLL *et al.*, 1992). O produto resultante da clivagem foi verificado em gel de agarose 2%.

Destaca-se que durante todo o procedimento de determinação molecular do sexo foi utilizado como grupo-controle um animal da mesma espécie e de sexo conhecido tanto pela morfologia externa como pela análise molecular do sexo.

Amplificação e Sequenciamento do mtDNA

Um fragmento de 413 pb da região controladora do mtDNA foi amplificado através de PCR usando os primers Dlp-5 (5'-CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3') e Dlp-10 (5'-CCACAGTACTATGTCCGTATT-3'; BAKER *et al.*, 1993) em uma reação de 25 µl. Um µl de DNA extraído (concentração de cerca de 100 ng/µl) foi adicionado à 1x PCR Master Mix DreamTaq (Fermentas) e 1,6 pmol/µl de cada primer. O ciclo do PCR utilizado foi o seguinte: desnaturação inicial de 1 min à 93° C, seguido de 30 ciclos de desnaturação de 30 s à 93° C, anelamento (ou hibridação) dos primers por 30 s à 55° C, extensão da polimerase por 45 s à 72°

C, seguida pela extensão final de 5 min à 72° C. A amplificação dos produtos de PCR foi verificada em gel de agarose 1% e a purificação seguiu o protocolo de purificação de acetato de amônio.

A maioria das amostras coletadas no litoral norte do Rio Grande do Sul foi sequenciada pelos pesquisadores do GEMARS no Laboratório de Biologia Genômica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, com exceção das amostras MP001, G0820, G0861, G0934, G1283, G1285 e G1337, as quais foram sequenciadas para este trabalho, junto com as amostras provenientes de Santa Catarina, pela empresa Macrogen, na Coréia do Sul..

Análises dos dados

A qualidade do sequenciamento foi avaliada pelo programa ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au>) e sua identidade confirmada utilizando-se o BlastN (Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide) (NCBI site). O alinhamento das sequências foi feito no ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997) e a edição manual realizada no programa BioEdit 7.0.9 (HALL, 1999).

As análises de variabilidade genética da amostra total e para cada população foram feitas com base no número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π), utilizando o programa DnaSP 5.1 (ROZAS *et al.*, 2003).

O programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005) foi utilizado para estimar o nível de diferenciação entre as populações através da Análise de Variância Molecular (AMOVA), análise de diferenciação pela frequência haplotípica - F_{st} (WEIR; COCKERHAM, 1984) - e pela diversidade nucleotídica - ϕ_{st} (TAMURA; NEI, 1993).

A AMOVA foi calculada pela distância ϕ_{st} e realizada para determinar a distribuição da variabilidade genética. Esta variância foi hierarquizada entre os grupos ($F\phi_{CT}$), entre as populações dentro dos grupos ($F\phi_{SC}$) e entre indivíduos dentro de cada população ($F\phi_{ST}$).

A análise das relações filogenéticas entre as populações estudadas foi feita com base na frequência dos haplótipos compartilhados da região controladora do DNA mitocondrial. Para tanto foi gerada uma rede de haplótipos pelo método *median-joining* (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999) utilizando o programa NETWORK 4.6.

RESULTADOS

As sequências de 316 pb da região controladora do DNA mitocondrial foram comparadas entre as 44 amostras analisadas para este estudo, obtendo-se um total de oito haplótipos com 16 sítios polimórficos (Tabela 2). O haplótipo mais comum (H3) foi compartilhado por todas as três subpopulações. Um total de oito haplótipos foi encontrado na subpopulação do Rio Grande do Sul, sendo seis exclusivos desta subpopulação. A subpopulação estuarina de Laguna apresentou um único haplótipo e dois haplótipos foram registrados na subpopulação do litoral de Santa Catarina.

Apesar do pequeno número amostral da subpopulação costeira de Santa Catarina, vale destacar que os dois haplótipos encontrados nesta subpopulação também foram compartilhados com a subpopulação de Laguna (H3) e litoral norte do Rio Grande do Sul (H3 e H7).

Tabela 2. Haplótipos da região controladora do mtDNA encontrados nas subpopulações de *Tursiops truncatus* estudadas. Os sítios polimórficos estão identificados dentro da sequência de 316 pb. Os pontos representam bases idênticas ao haplótipo 1 (H1). Cada coluna representa a posição na sequência do mtDNA em que foi observado polimorfismo entre os haplótipos.

	9	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	2	3	7	7	9	9	0	0	0	2	2	3	5	8	9
	1	2	2	6	2	6	5	6	9	1	9	0	6	3	7	
H1	T	C	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	G	C	C	C
H2	.	T
H3	C	T	.	C	.	A	.	.	.	C	.	T
H4	.	T	C	.	.	A	.	.	T	C	T
H5	.	T	C	.	.	A	T	.	T	C	.	.	.	T	T	T
H6	.	T	C	.	T	A	.	.	T	C	T	.	A	.	T	T
H7	.	T	C	C	.	A	.	T	.	C	T	.
H8	.	T	C	C	.	G	T	T	.	C	T	.

As diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) observadas para a espécie como um todo (as três subpopulações em conjunto) foram Hd=0,695 e π =0,01700, respectivamente. As

mesmas diversidades foram também estimadas para cada subpopulação separadamente (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidade genética da região controladora do mtDNA de cada subpopulação de *Tursiops truncatus* estudada. Tamanho amostral (n), diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (Hd).

Amostra	n	Hd (\pmSD)	π (\pmSD)
Litoral norte do Rio Grande do Sul (RS)	29	0,818 (\pm 0,045)	0,01852 (\pm 0,00147)
Litoral de Santa Catarina (SC)	5	0,600 (\pm 0,175)	0,02085 (\pm 0,00609)
Laguna	10	0,000 (\pm 0,000)	0,00000 (\pm 0,00000)

A análise de distribuição dos haplótipos revelou o compartilhamento de um único haplótipo (H3) entre todas as subpopulações e de um haplótipo (H5) exclusivamente compartilhado entre as subpopulações do litoral gaúcho e de Santa Catarina. A análise de variância molecular (Tabela 4) demonstrou que cerca de 71% da variação encontrada está distribuída dentro de cada subpopulação e 29% de variação entre os grupos. O índice de fixação que leva em consideração a diversidade nucleotídica (ϕ_{st}) teve como resultado a presença de diferenciação genética entre a subpopulação de Laguna e do litoral norte do Rio Grande do Sul ($\phi_{st}=0,30529$; $p<0,05$), ou seja, 30% da variação genética observada é devido à diferenças interpopulacionais. Contudo, não houve diferença significativa entre as subpopulações do litoral gaúcho e catarinense ($\phi_{st}=-0,03942$; $p>0,05$), assim como, entre Laguna e a subpopulação do litoral catarinense ($\phi_{st}=0,41748$; $p>0,05$). Resultado similar foi verificado para o teste de diferenciação populacional que leva em consideração a frequência dos haplótipos (F_{st}), obtendo-se nível de diferenciação genética elevado e significativo entre Laguna e o litoral gaúcho ($F_{st}=0,26121$, $p<0,05$), mas não-significativo entre Laguna e o litoral catarinense ($F_{st}=0,41748$, $p>0,05$), nem entre as duas subpopulações costeiras ($F_{st}=0,02979$, $p>0,05$) (Tabela 5).

A rede de haplótipos (Figura 2) refletiu a estruturação populacional observada pelos índices de fixação, demonstrando o compartilhamento de um único haplótipo (H3) entre as três subpopulações, o qual também foi o haplótipo mais frequente, aparecendo em 100% dos indivíduos de Laguna, 34,5% da amostra do Rio Grande do Sul e 60% na subpopulação do litoral catarinense. Além disso, também foi possível observar uma forte divisão entre a subpopulação

estuarina e os demais indivíduos das duas subpopulações costeiras. É importante salientar ainda que os dois haplótipos (H3 e H5) da subpopulação costeira de Santa Catarina estavam separados por diversos passos mutacionais, demonstrando uma forte divergência genética dentro deste grupo.

Tabela 4. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) encontrados nas subpopulações de *Tursiops truncatus* estudadas. Valores baseados apenas na frequência dos haplótipos (F_{st}) estão destacados em itálico. Valores baseados na diversidade nucleotídica (ϕ_{st}) estão destacados em negrito.

Fonte de Variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	<i>p</i>
Entre os grupos (F_{ct})	<i>1</i>	<i>1,785</i>	<i>0,07601</i>	<i>18,68</i>	<i>0,33</i>
	1	13,630	0,78311	29,13	0,33
Entre as populações (F_{sc})	<i>1</i>	<i>0,499</i>	<i>0,02231</i>	<i>5,48</i>	<i>0,01</i>
	1	1,678	-0,03022	-1,12	0,01
Dentro das populações (F_{st})	<i>41</i>	<i>12,648</i>	<i>0,30849</i>	<i>75,83</i>	<i>0,00</i>
	41	79,352	1,93541	71,99	0,00
Total	<i>43</i>	<i>14,932</i>	<i>0,40682</i>		
	43	94,659	2,68831		

Tabela 5. Índices de fixação de Wright par-a-par para as subpopulações de *Tursiops truncatus* estudadas. Valores de F_{st} estão representados na matriz superior e valores de ϕ_{st} , na matriz inferior.

Populações	Litoral norte do RS	Litoral de SC	Laguna
Litoral norte do RS		0,02979 ($p=0,07$)	0,26121 ($p=0,00$)
Litoral de SC	-0,03942 ($p=0,56$)		0,41748 ($p=0,24$)
Laguna	0,30529 ($p=0,00$)	0,41748 ($p=0,12$)	

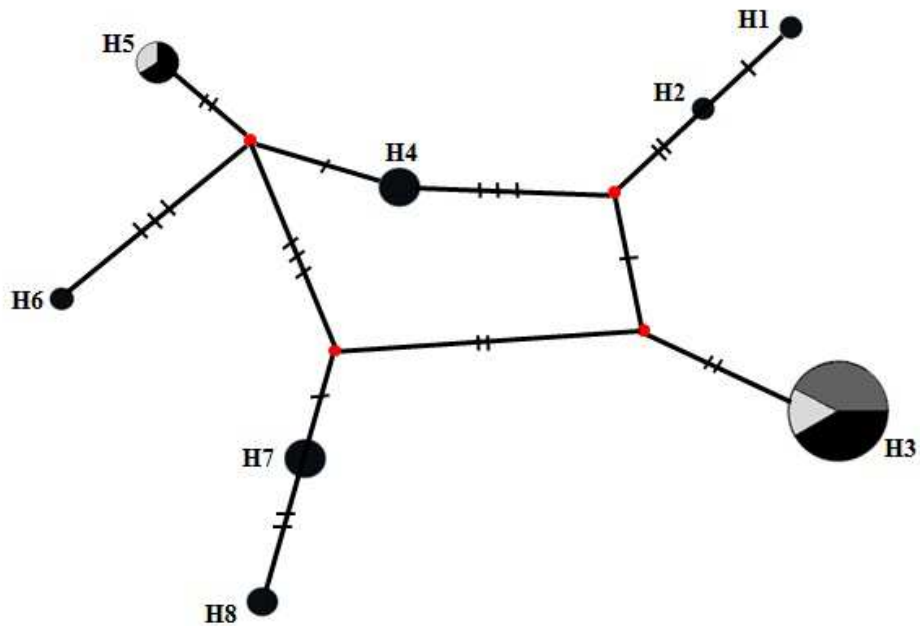


Figura 2. Rede de haplótipos demonstrando as relações filogenéticas entre os haplótipos das subpopulações de Laguna, litoral de Santa Catarina e litoral norte do Rio Grande do Sul de *Tursiops truncatus*. O tamanho dos círculos representa a quantidade de indivíduos amostrados para cada haplótipo e as frações dentro dos círculos, definidas por cores, representam as frequências dos haplótipos em cada subpopulação. Preto: subpopulação do litoral norte do Rio Grande do Sul; Cinza escuro: subpopulação de Laguna; Cinza claro: subpopulação do litoral de Santa Catarina.

Em relação à amostra do litoral norte do Rio Grande do Sul, segundo dados fornecidos pelo GEMARS, há dois indivíduos (G0333 e G1259) que foram reconhecidos, por meio de comparação de catálogos fotográficos, como pertencentes às populações estuarinas de Torres e Tramandaí, respectivamente (Larissa R. de Oliveira, comunicação pessoal). O exemplar biopsiado na foz do Rio Mampituba (MP001) também foi considerado como pertencente à população de Torres. Os dois espécimes de Torres compartilharam o mesmo haplótipo (H3) que os exemplares da população residente de Laguna e de três (UFSC 1011, 1299 e 1317) dos cinco indivíduos coletados ao longo da costa catarinense. Já o indivíduo G1259, conhecido popularmente como “Lobisomen”, apresentou um haplótipo (H7) diferente das demais populações.

Determinação do Sexo

Dos 29 indivíduos da subpopulação do litoral norte do Rio Grande do Sul, 24 tiveram o sexo determinado, sendo que em 16 o sexo foi pré-definido pela morfologia externa durante as coletas e oito foram sexados geneticamente (Figura 3), correspondendo a um total de 21 machos e três fêmeas. Já em Laguna, todos os 10 indivíduos tiveram o sexo determinado geneticamente, sendo oito machos e duas fêmeas. Para a população do litoral de Santa Catarina, apenas o indivíduo UFSC 1398 (amostra de tecido) teve o sexo determinado geneticamente, correspondendo a uma fêmea. Para os demais exemplares (amostras de dentes), apenas o espécime UFSC 1349 teve seu sexo identificado pela morfologia externa durante o resgate da carcaça, sendo também uma fêmea.

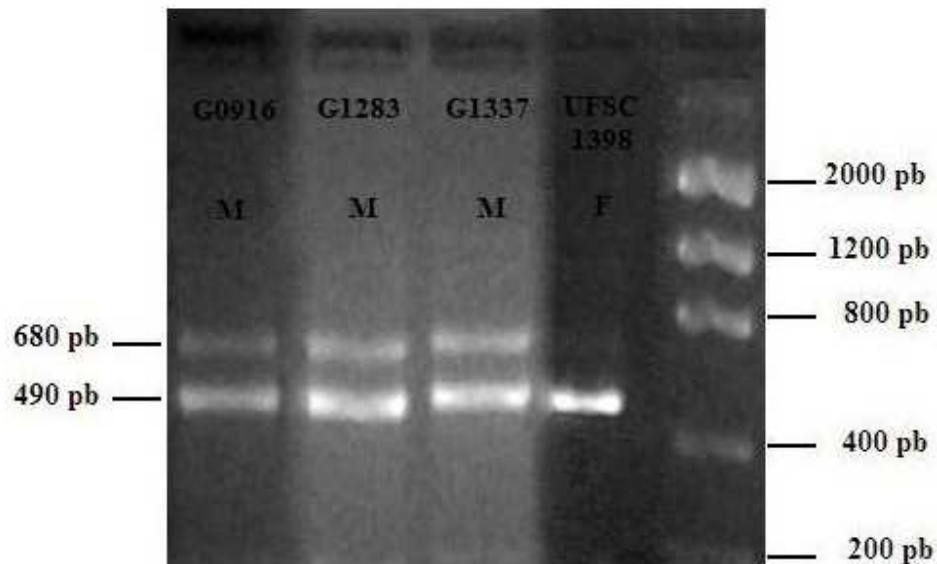


Figura 3. Fotografia do gel da determinação genética do sexo de quatro indivíduos de *Tursiops truncatus* coletados ao longo da costa de Santa Catarina e litoral norte do Rio Grande do Sul. A banda de 490 pb corresponde ao íntron ZFX e a de aproximadamente 680 pb ao ZFY.

DISCUSSÃO

A distribuição de *Tursiops truncatus* ao longo da costa brasileira é contínua, porém, a presença de populações estuarinas consideradas residentes foi relatada apenas para o sul do Brasil (SIMÕES-LOPES, 1995; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999; HOFFMANN, 2004; DI TULLIO, 2009; GIACOMO, 2010; FRUET *et al.*, 2011; DAURA-JORGE, 2011; DAURA-JORGE *et al.*, 2012).

Neste estudo, as análises de distribuição da variação genética do DNA mitocondrial dos indivíduos encalhados e biopsiados revelaram a existência de uma estruturação genética das subpopulações do sul do Brasil. Os resultados obtidos indicaram que a subpopulação de Laguna possuía apenas um haplótipo em 10 espécimes analisados e um possível isolamento geográfico das demais subpopulações estudadas, sugerindo uma suscetibilidade maior às ameaças ambientais. Entretanto, a falta de variabilidade genética na região controladora do DNA mitocondrial não significa necessariamente baixos níveis de heterozigosidade genética no DNA nuclear (ROSEL; ROJAS-BRACHO, 1999).

A subpopulação de Laguna mantém-se há algumas décadas num número estável de indivíduos ($n=50$), porém, para questões evolutivas, não é o censo populacional ($n=50$) que importa, e sim o tamanho populacional efetivo (N_e). O tamanho efetivo reflete o número de indivíduos que contribuem para a manutenção da diversidade genética e o potencial evolutivo da espécie, sendo por isso usado como um meio de determinar o *status* de conservação da espécie ou população (VUCETICH; WAITE, 1998). Aumentos ou reduções no tamanho censitário, nem sempre refletem aumentos ou quedas no número efetivo (*c.f.*, HOELZEL *et al.*, 1993). Desta forma, se o tamanho efetivo da subpopulação de Laguna sempre esteve relativamente baixo (PIMM *et al.*, 1989), é possível que ela se mantenha, sem experimentar os efeitos negativos provocados pela falta de variabilidade genética e endocruzamento (TEMPLETON, 1987; POPE, 1996, de acordo com PARSONS *et al.*, 2002). Contudo, é de grande importância estimar o N_e da subpopulação de *T. truncatus* de Laguna, para verificar as consequências deste para o manejo e conservação desta subpopulação.

A falta de divergência genética entre a subpopulação residente de Laguna e a do litoral catarinense pode implicar que Laguna não foi sempre isolada e sugere que o mtDNA do primeiro

grupo fundador desta subpopulação foi provavelmente originário das subpopulações costeiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, as quais não apresentaram diferenças significativas entre si. Além disso, é possível observar através da rede de haplótipos que os espécimes de Laguna compartilharam o haplótipo mais comum (H3) com dois indivíduos (G0333 e MP001) da população estuarina de Torres, o que sugere que ambas as subpopulações foram fundadas pelo mesmo haplótipo mitocondrial ancestral ou que se tratam ainda de subpopulações com fluxo gênico realizado ao menos pelas fêmeas. Contudo, análises moleculares utilizando marcadores mitocondriais revelam apenas fatos ocorridos no passado, estimando eventos históricos demográficos importantes e a distribuição geográfica da variabilidade genética das subpopulações em estudo (ZHANG; HEWITT, 2003), não sendo muito indicados na estimativa de acontecimentos mais recentes. Além disso, trabalhos anteriores revelam um alto grau de residência dos indivíduos de Laguna (DAURA-JORGE *et al.*, 2012), principalmente, por parte das fêmeas (SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999). Utilizando-se modelos de marcação-recaptura, Daura-Jorge *et al.* (2012) observaram uma probabilidade de emigração temporária de apenas 0,031, sugerindo a presença de uma população fechada e altamente residente dentro do Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos.

A subpopulação costeira de Santa Catarina foi considerada neste estudo através da análise de apenas cinco indivíduos, coletados entre as latitudes 26° e 28° S, resultando na presença de dois haplótipos, os quais estão geneticamente distantes entre si. Destaca-se ainda apesar de não significativas, as divergências nos índices de fixação entre Laguna e o litoral catarinense (ϕ_{st} e $F_{st}=0,41748$, $p>0,05$) são consideradas expressivas e sugerem que as mesmas sejam compostas por mais de um estoque populacional. Já ao comparar as subpopulações costeiras de Santa Catarina e litoral norte do Rio Grande do Sul, observou-se que não há uma divisão clara entre as mesmas. Estes dois grupos podem ser considerados como um único estoque populacional. Desta forma, sugere-se a presença de ao menos dois estoques, sendo o primeiro composto pelas subpopulações de Laguna e Torres, assim como, pelos indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo (H3) com as subpopulações estuarinas - os quais não foram identificados como pertencentes a nenhuma subpopulação estuarina residente devido à falta de informação e registro fotográfico -, e o segundo estoque seria provavelmente formado pelos demais indivíduos das

subpopulações dos litorais de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, os quais não compartilham o haplótipo mais comum (H3).

Em relação à subpopulação do litoral norte do Rio Grande do Sul, é possível verificar uma similaridade com os resultados obtidos por Ott e colaboradores (2009) já que os indivíduos utilizados também foram analisados neste estudo. De acordo com os autores, foram analisadas 59 amostras de tecido de botos-da-tainha coletados em diferentes pontos do litoral brasileiro, sendo 20 amostras procedentes do Rio Grande do Sul. Foram encontrados sete haplótipos para os exemplares da costa gaúcha, sendo a diversidade haplotípica (H_d) de 0,8316 e nucleotídica (π) de 0,0213, similar ao verificado para a subpopulação do litoral norte deste estudo ($H_d=0,818$ e $\pi=0,01852$), o qual utilizou nove amostras a mais que o trabalho anterior.

Muitas espécies de cetáceos demonstram uma complexa estruturação genética populacional (HOELZEL, 1998). De acordo com Curry e Smith (1997), é possível que os limites de um hábitat somados a alta fidelidade ao hábitat em ambientes protegidos (*e.g.* baías, estuários) promovam a diferenciação genética entre grupos de golfinhos, enquanto em áreas de vida mais extensas (*e.g.* em mar aberto ou ao longo da costa) seja mais propício o intercâmbio genético entre diferentes grupos de golfinhos. Esta hipótese foi testada por Möller e colaboradores (2007) em cinco comunidades de *Tursiops aduncus* da região sudeste da Austrália, demonstrando a presença de estruturação genética em uma pequena escala de distância. Segundo este último estudo, as comunidades de áreas geograficamente protegidas (*e.g.* baías) apresentaram uma diversidade genética menor do que as comunidades costeiras de áreas geograficamente abertas, sem diferenciação genética quando comparadas as comunidades de ambientes protegidos entre si e nem ao comparar as comunidades de ambientes costeiros abertos entre si. Contudo, através do uso de marcadores nucleares (nove loci de microssatélites), foram observados valores moderados de diferenciação genética entre os golfinhos dos dois ambientes. O mtDNA não revelou a mesma estruturação populacional, porém, o padrão reportado por Möller e colaboradores (2007) é devido, provavelmente, à uma colonização recente dos ambientes estuarinos pelos golfinhos costeiros, seguida de uma rápida restrição ao fluxo gênico, fato não evidenciado pelos marcadores mitocondriais.

No sul do Brasil, por meio de dados da região controladora do mtDNA, foi verificada uma estruturação entre a comunidade estuarina de Laguna e a comunidade costeira do litoral

norte do Rio Grande do Sul, além da falta de diferenciação genética entre as duas comunidades costeiras. Desta forma, torna-se possível supor que esteja ocorrendo o mesmo padrão de diferenciação genética relatado por Möller *et al.* (2007).

A estruturação populacional indicada pelos índices de fixação e pela rede de haplótipos entre a população de Laguna e o litoral norte do Rio Grande do Sul pode ser resultado da alta filopatria das fêmeas, corroborando o que já havia sido sugerido anteriormente por Simões-Lopes e Fábian (1999) para as fêmeas de Laguna e Imbé/Tramandaí. Enquanto as mesmas apresentaram um alto índice de residência, os machos foram observados deslocando-se entre as áreas de estudo. Como o sucesso reprodutivo das fêmeas tem grande influência no tamanho populacional, os resultados do mtDNA são uma importante ferramenta na definição de unidades de conservação e manejo biologicamente significativas (PARSONS *et al.*, 2002).

Esta alta filopatria sugerida também para as fêmeas de Imbé/Tramandaí (SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999) poderia explicar porque o exemplar macho G1259 (Lobisomen), pertencente a esta subpopulação, apresentou um haplótipo diferente das demais subpopulações estuarinas (Laguna e Torres) amostradas neste estudo. O boto Lobisomen começou a ser observado nas subpopulações de Laguna e Tramandaí a partir de 1991 (SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999), porém raros foram os registros de fêmeas deslocando-se a distâncias tão grandes. Möller *et al.* (1994) citaram o deslocamento de uma única fêmea, que se locomoveu por menos de 80 km entre Tramandaí e a foz do rio Mampituba, Torres. Além disso, pode-se supor também que o boto Lobisomen seja descendente de fêmeas de fora da população de Tramandaí, ou ainda que esta população residente seja formada por mais de um haplótipo que, infelizmente, não foi amostrado. Contudo, devido à falta de amostras de espécimes sabidamente estuarinos do litoral norte do Rio Grande do Sul não foi possível determinar com exatidão a verdadeira causa desta diferença genética, demonstrando a necessidade de ampliação da amostragem, principalmente, nesta população de Tramandaí, além da continuidade dos estudos a respeito da estrutura e diversidade genética destas comunidades estuarinas.

Em relação as diferenças nas proporções sexuais entre os botos amostrados ao longo do litoral gaúcho (21M:3F), destaca-se que o mesmo pode ser também uma influência da alta filopatria das fêmeas. Se as mesmas costumam permanecer no seu hábitat de origem (*i.e.* áreas estuarinas), enquanto os machos deslocam-se entre diferentes áreas com maior frequência, é mais

provável que os últimos estejam sujeitos a maiores ameaças durante os deslocamentos, podendo encaixar com maior frequência, do que as fêmeas que permanecem em áreas protegidas. Já para a amostra de Laguna, embora também tenha sido verificada uma diferença nas proporções sexuais (8M:2F), o mesmo pode ser explicado pelo fato dos coletores evitarem biopsiar botos (provavelmente fêmeas) com filhotes, tendenciando, assim, uma amostragem maior de machos.

A evidência de divisão geográfica pelo mtDNA não impede a existência de dispersão e fluxo gênico atual entre as populações mediado pelos machos (AVISE, 1995). Os dados obtidos refletem apenas a estrutura populacional das fêmeas, porque o mtDNA é um marcador matrilinear (passado apenas pelas fêmeas). Dessa forma, a presença de fluxo gênico entre as subpopulações de estudo, se existente, será comprovada apenas através da utilização de marcadores biparentais, como os microssatélites. Neste sentido, dados preliminares sobre a diversidade genética e estruturação populacional através da análise destes marcadores para as subpopulações de *T. truncatus* estudadas são apresentados no próximo capítulo.

REFERÊNCIAS

- AVISE, J.C. Mitochondrial DNA polymorphism and the connection between genetics and demography of relevance to conservation. **Conservation Biology**, v. 9, p. 686–690, 1995.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific Phylogeography - the mitochondrial-DNA bridge between population-genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BAIRD, R.W.; GORGONE, A.M.; MCSWEENEY, D.J.; LIGON, A.D.; DEAKOS, M.H.; WEBSTER, D.L.; SCHORR, G.S.; MARTIEN, K.K.; SALDEN, D.R.; MAHAFFY, S.D. Population structure of island-associated dolphins: Evidence from photo-identification of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the main Hawaiian Islands. **Marine Mammal Science**, v. 25, p. 251-274, 2009.
- BAKER, C.S.; PERRY, J.; BANNISTER, J.L.; WEINRICH, M.T.; ABERNETHY, R.B.; CALAMBOKIDIS, J.; LIEN, J.; LAMBERTSEN, R.H.; URBÁN RAMÍREZ, J.; VASQUEZ, O.; CLAPHAM, P.J.; ALLING, A.; O'BRIEN, S.J.; PALUMBI, S.R. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 90, p. 8239-8243, 1993.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.
- BARRETO, A.S. **Variação craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) (Montagu, 1821) na costa atlântica da América do Sul**. 2000. 122f. Tese de Doutorado em Oceanografia - Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande.
- BERTA, A.; SUMICH, J.L.; KOVACS, K.M. **Marine mammals: Evolutionary biology**. Academic Press, 2006.
- BROWN, M.; KRAUS, S.D.; GASKIN, D.E. Reaction of North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) to skin biopsy sampling for genetic and pollutant analysis. **Report of the International Whaling Commission**, v. 13, p. 81-89, 1991.

- BROWN GLADDEN, J.G.; FERGUSON, M.M.; CLAYTON, J.W. Matriarchal genetic population structure of North America beluga whales *Delphinapterus leucas* (Cetacea: Monodontidae). **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1033-1046. 1997.
- CONNOR, R.C.; WELLS, R.S.; MANN, J.; READ, A.J. The bottlenose dolphin: social relationships in a fission–fusion society. In: MANN, J.; CONNOR, R.C.; TYACK, P.L.; WHITEHEAD, H. (Ed.). **Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whales**, Chicago: University of Chicago Press, 2000. p. 91–126.
- CURRY; B.E.; SMITH, J. Phylogeographic structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): stock identification and implications for management. In: DIZON, A.E.; CHIVERS, S.J.; PERRIN, W.F. (Ed.). **Molecular genetics of marine mammals**. Society for Marine Mammals, Special Publication 3, 1997. p. 227-247.
- DAURA-JORGE, F.G. **Quantos? Onde? Como? Múltiplos aspectos ecológicos de uma população do boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) em Laguna, sul do Brasil: Implicações para a conservação**. 2011. Tese de Doutorado em Zoologia – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DAURA-JORGE, F.G.; CANTOR, M.; INGRAM, S.N.; LUSSEAU, D.; SIMÕES-LOPES, P.C. The structure of a bottlenose dolphin society is coupled to a unique foraging cooperation with artisanal fishermen. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 702-705, 2012.
- DI TULLIO, J.C. **Uso do hábitat do boto, *Tursiops truncatus*, no estuário da Lagoa dos Patos e águas costeiras adjacentes, RS, Brasil**. 2009. Dissertação de Mestrado em Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FRUET, P.F. **Caracterização genética da região controladora do DNAmT da população de botos (*Tursiops truncatus*) do estuário da Lagoa dos patos e sua aplicação para o estudo da mortalidade da espécie no litoral do rio Grande do Sul, Brasil**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo.

- FRUET, P.F.; SECCHI, E.R.; DI TULLIO, J.C.; KINAS, P.G. Abundance of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, inhabiting the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: Implication for conservation. **Zoologia**, v. 28, p. 23-30, 2011.
- GIACOMO, A.B. **Análise do padrão de ocupação dos botos, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), no estuário de Tramandaí, sul do Brasil, a partir do estudo de fotoidentificação.** 2010. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé.
- GREENWOOD, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 140–162, 1980.
- HALL, T. BioEdit, Versão 5.0.9. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de Genética de Populações.** Porto Alegre: Artmed, 2010.
- HOELZEL, A.R. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. **The Journal of Heredity**, v. 89, p. 451-458, 1998.
- HOELZEL, A.R.; HALLEY, J.; O'BRIEN, S.J.; CAMPAGNA, C.; AMBOM, T.; LEBOEUF, B.J.; RALLS, K.; DOVER, G.A. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v. 84, p. 443-449, 1993.
- HOELZEL, A.R.; POTTER, C.W.; BEST, P.B. Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 265, p. 1177-1183, 1998.
- HOFFMANN, L.S. **Um estudo de longa duração de um grupo costeiro de golfinhos *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) (Cetacea, Delphinidae) no sul do Brasil: Aspectos de sua biologia e bioacústica.** 2004. Tese de Doutorado em Biologia Animal – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- HOWARD, W.E. Innate and environmental dispersal of individual vertebrates. **American Midland Naturalist**, v. 63, p. 152–161, 1963.

- LOWTHER, J.L. **Genetic variation of coastal and offshore bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the eastern North Pacific Ocean.** 2006. 115f. Dissertação de Mestrado em Marine Science - University of San Diego, San Diego.
- MARTIEN, K.K.; BAIRD, R.W.; ROBERTSON, K.M. Population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) around the main Hawaiian Islands. In: Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, 16, 2005, San Diego, CA. **Anais da XVI Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals**, 2005. p. 181.
- MÖLLER, L.M.; BEHEREGARAY, L.B. Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1607-1612, 2004.
- MÖLLER, L.M.; SIMÕES-LOPES, P.C.; SECCHI, E.R.; ZERBINI, A.N. Uso da fotoidentificação no estudo do deslocamento de botos *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) na costa sul do Brasil. In: Reunião de Trabalhos de Especialistas em mamíferos Aquáticos da América do Sul, 6, 1994, Florianópolis, SC. **Anais da VI Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul**, 1994. p. 142.
- MÖLLER, L.M.; WISZNIEWSKI, J.; ALLEN, S.J.; BEHEREGARAY, L.B. Habitat type promotes rapid and extremely localized genetic differentiation in dolphins. **Marine and Freshwater Research**, v. 58, p. 640-648, 2007.
- MORIN, P.A.; DIZON, A.E. Genetics for Management. In: PERRIN, W.F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J.G.M. (Ed.). **Encyclopedia of Marine Mammals**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.
- 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**, v. 272, p. 1217-1226, 2005.
- NATOLI, A.; PEDDEMORS, V.M.; HOELZEL, A.R. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, p. 363-375, 2004.
- OLIVEIRA, L. R.; OTT, P.H.; MORENO, I.B.; TAVARES, M.; DANILEWICZ, D.; ALMEIDA, R.; SICILIANO, S.; BONATTO, S.L. Variabilidade genética e estrutura populacional do golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, em águas brasileiras. In: Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul, 13, 2008,

- Montevideo, Uruguai. **Anais da XIII Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul**, 2008. p. 80.
- OTT, P.H.; TAVARES, M.; MORENO, I.B.; OLIVEIRA, L.R.; DANILEWICZ, D. Os cetáceos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. In: MOHR, L.V.; CASTRO, J.W.A.; COSTA, P.M.S.; ALVES, R.J.V. (Ed.) **Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo** (Volume II). Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2009. p. 283-300.
- PARSONS, K.M.; NOBLE, L.R.; REID, R.J.; THOMPSON, P.M. Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? **Biological Conservation**, v. 108, p. 175-182, 2002.
- PALSBOLL, P.J.; VADER, A.; BAKKE, I.; EL-GEWELY, M.R. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 11, p. 2166-2170, 1992.
- PERRIN, W.F.; THIELEKING, J.L.; WALKER, W.A.; ARCHER, F.I.; ROBERTSON, K.M. Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: cranial differentiation of coastal and offshore forms. **Marine Mammal Science**, v. 27, n. 4, p. 769-792, 2011.
- PIMM, S.L.; GITTLEMAN, J.L.; MCCRACKEN, G.F.; GILPIN, M.E. Plausible alternatives to bottlenecks to explain reduced genetic diversity. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 176-178, 1989.
- POPE, T.R. Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. In: AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 119-159.
- ROSEL, P.E.; DIZON, A.E.; HEYNING, J.E. Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). **Marine Biology**, v. 119, p. 159-167, 1994.
- ROSEL, P.E.; ROJAS-BRACHO, L. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* (Norris and MacFarland, 1958). **Marine Mammal Science**, v. 15, p. 990-1003, 1999.
- ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X., ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphisms analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANINO, G.P.; VAN WAEREBEEK, K.; VAN BRESSEM, M.-F.; PASTENE, L.A. A preliminary note on population structure in eastern South Pacific common bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 7, n. 1, p. 65-70, 2005.
- SIMÕES-LOPES, P.C. **Ecologia comportamental do delfim, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) durante as interações com a pesca artesanal de tainhas (*Mugil spp.*) no sul do Brasil**. 1995. Tese de Doutorado em Zoologia - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; DAURA-JORGE, F.G. **Os Parceiros da Sobrevivência: A interação entre botos e pescadores no sul do Brasil**. Florianópolis: Insular, 2008.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; FÁBIAN, M.E. Residence patterns and site fidelity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Montagu) (Cetacea, Delphinidae) off Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 4, p. 1017-1024, 1999.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. **Molecular Biology Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512, 1993.
- TEMPLETON, A.R. Inferences on natural population structure from genetics studies on captive mammalian populations. In: CHEPKO-SADE, B.D.; HALPIN, Z.T. (Ed.). **Mammalian dispersal patterns: the effects of social structure on population genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1987. p. 257-272.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.C. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TSAI; Y.J.; MANN, J. Dispersal, philopatry, and the role of fission-fusion dynamics in bottlenose dolphins. **Marine Mammal Science**, 2012. Published online. doi: 10.1111/j.1748-7692.2011.00559.x.
- VUCETICH, J.A.; WAITE, T.A. The number of censuses required for demographic estimation of the effective population size. **Conservation Biology**, v. 12, n. 5, p. 1023-1030, 1998.

- WARING, G.T.; QUINTAL, J.M.; SWARTZ, S.L. **U.S. Atlantic and Gulf of Mexico marine mammal stock assessments – 2006.** 2007. Disponível em <<http://www.nefsc.noaa.gov/publications/tm/tm213/>>. Acessado em: 14 dez. 2012.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.
- ZAPPES, C.A; ANDRIOLO, A.; SIMÕES-LOPES, P.C.; DI BENEDITTO, A.P.M. ‘Human-dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) cooperative fishery’ and its influence on cast net fishing activities in Barra de Imbé/Tramandaí, Southern Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 54, p. 427-432, 2011.
- ZHANG, D-X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetics studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 563-584, 2003.

CAPÍTULO III

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Tursiops truncatus* DAS SUBPOPULAÇÕES DE LAGUNA, SANTA CATARINA, E LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL, ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

RESUMO

A conectividade genética entre populações depende da intensidade do fluxo gênico entre os indivíduos. A estruturação populacional pode ser altamente dependente do tipo de hábitat ocupado e da adaptabilidade dos indivíduos, o que pode levar ao desenvolvimento de técnicas de forrageios especializadas e à formação de grupos, com diminuição da necessidade de dispersão. A existência de populações estuarinas residentes de *Tursiops truncatus* ao longo do litoral brasileiro foi relatada apenas para a região sul e apesar da verificação de deslocamentos de indivíduos entre as áreas, pouco se conhece sobre a relação genética das mesmas. Neste sentido, este trabalho representa o primeiro estudo de avaliação do fluxo gênico atual entre a subpopulação residente de Laguna e espécimes do litoral norte do Rio Grande do Sul. Para tanto foram analisados um total de 36 indivíduos de *T. truncatus* para quatro loci de microssatélites. Como resultado, não foram verificadas diferenças significativas nos índices de fixação (F_{st} e R_{st}) quando consideradas a existência das duas subpopulações citadas acima, porém as análises baesianas através do programa Structure demonstraram a existência de duas subpopulações dentro da amostra do litoral norte do Rio Grande do Sul (LNRS). Ao analisar um novo cenário considerando duas populações geograficamente distintas como “Estuarina” (Laguna e parte do LNRS) e “Costeira/Oceânica” (12 espécimes do LNRS) observou-se, de acordo com o F_{st} , uma moderada estruturação populacional entre as duas novas populações (F_{st} : 0,17232, $p \leq 0,0000$). Contudo, é importante salientar que o baixo número amostral da subpopulação de Laguna ($n=10$) e de loci analisados podem acabar interferindo nos resultados obtidos. Dessa forma, supõe-se que ou realmente existe fluxo gênico atual, ou não houve tempo suficiente para detectar geneticamente o isolamento dos botos de Laguna. Além disso, outra hipótese é que o fluxo gênico amostrado seja intermediado somente entre as subpopulações estuarinas residentes do sul do Brasil, o que corrobora com os deslocamentos observados entre as áreas. O poder estatístico destas análises moleculares de estruturação não depende apenas das diferenças genéticas encontradas entre as populações, mas também está intimamente relacionado ao tamanho amostral e a quantidade de loci analisados. Desta forma, a continuidade destas análises através da obtenção de novas amostras e de mais loci de microssatélites é de extrema importância para a

elaboração de medidas de manejo e conservação mais realistas para a manutenção das populações costeiras e estuarinas de *T. truncatus* no sul do Brasil.

Palavras-chave: DNA nuclear, técnica de forrageio, deslocamentos, fluxo gênico

ABSTRACT

The genetic connectivity among populations depends on the intensity of gene flow exchanged among individuals. The population structure could be highly dependent on the habitat type occupied and the adaptability of individuals, which may lead to the development of specialized resource techniques and the formation of groups, with decreased of the need for dispersion. The existence of inshore (estuarine) resident populations of *Tursiops truncatus* along the Brazilian coast was reported only for the southern region and despite the verification of individuals' displacements between areas little is known about the genetic structure of the same. This work represents the first study to assess the gene flow between resident subpopulation of Laguna and specimens of the northern coast of Rio Grande do Sul. Therefore we analyzed a total of 36 individuals of *T. truncatus* using four microsatellite loci. As a result, there were no significant differences in fixation indexes (F_{st} and R_{st}) when considering the existence of the two subpopulations mentioned above, but the Structure bayesianes analyzes demonstrated the existence of two subpopulations within the sample of the northern coast of Rio Grande do Sul (LNRS). When considering a new scenario with two geographically distinct populations as "Estuarine" (Laguna and part of LNRS) and "Costal/Oceanic" (12 specimens of LNRS) was observed, according to F_{st} , a moderate population structure between the two new populations (F_{st} : 0.17232, $p \leq 0.0000$). However, it is important to note that the low sample size of the subpopulation of Laguna ($n=10$) and the analyzed loci may end up interfering with the results. Thus, it is assumed that or there is actual gene flow present, or there was insufficient time to detect genetically isolation of the dolphins of Laguna. Moreover, another hypothesis is that gene flow sampled is only intermediated between resident estuarines subpopulations of southern Brazil, which agrees with the observed movements between areas. The statistical power of these molecular structure analysis does not only depend on genetic differences found between populations, but is also closely related to sample size and the number of loci analyzed. Thus, the continuity of these tests by obtaining new samples and more microsatellite loci is of great importance for the development of more realistic management and conservation measures for the maintenance of coastal and estuarine *T. truncatus* in Southern Brazil.

Keywords: nuclear DNA, resource technique, displacement, gene flow

INTRODUÇÃO

Em muitas espécies, as populações são subdivididas em unidades menores devido a fatores geográficos, ecológicos ou comportamentais (HEDRICK, 2011). Entretanto, nos cetáceos a presença de estruturação genética nem sempre está relacionada meramente às divisões geográficas. Frequentemente, esses padrões são atribuídos a comportamentos complexos como ocupação de áreas costeiras, especialização de forrageio local, alta fidelidade ao hábitat e/ou organização social (HOELZEL, 1998). Muitas espécies de cetáceos apresentam comportamentos de forrageio complexos (*c.f.*, HAIN *et al.*, 1982; FORD *et al.*, 1998). Populações do gênero *Tursiops* exibem diferentes tipos de estratégias de forrageio, variando de acordo com o hábitat ocupado pelas mesmas, como forrageio na lama (LEWIS; SCHROEDER, 2003); na praia, utilizando uma técnica de “encalhe” (SARGEANT *et al.*, 2005); e através da utilização de “ferramentas”, criadas através do uso das esponjas do mar – *Echinodictyum mesenterinum* (TYNE *et al.*, 2012).

Relações entre o tipo de hábitat e estratégias de forrageio podem acabar promovendo uma alta fidelidade ao hábitat (BARROS; WELLS, 1998; GANNON; WAPLES, 2004; NATOLI *et al.*, 2005; WISZNIEWSKI *et al.*, 2010; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Lawson e Perrin (2007) citam que os três fatores principais que podem restringir a dispersão são o risco de mortalidade ao cruzar ambientes desfavoráveis, a importância da familiaridade com o hábitat de origem (quando há o desenvolvimento de técnicas complexas de forrageio) e os benefícios da cooperação em grupo. De acordo com Krützen *et al.* (2005), uma predação eficiente na utilização de técnicas de forrageio especializadas pode envolver uma aprendizagem social, a qual pode ser passada através das gerações. Uma vez aprendido um tipo de técnica, dificilmente a mesma é trocada por outra e a ocupação de novas áreas raramente ocorre quando não há uma compatibilidade entre o tipo de hábitat e a técnica de forrageio utilizada (MANN *et al.*, 2008; TORRES; READ, 2009). Desta forma, a dispersão da área de origem pode não ser uma vantagem para estes indivíduos, principalmente para as fêmeas, as quais necessitam proteger e alimentar seus filhotes (CONNOR *et al.*, 2000).

O padrão de fluxo gênico pode ser diferente entre machos e fêmeas. Geralmente nos mamíferos há uma maior filopatria por parte das fêmeas e uma propensão de dispersão dos

machos com objetivos de reprodução (GREENWOOD, 1980; LAWSON; PERRIN, 2007; HEDRICK, 2011). Estudos envolvendo análises genéticas demonstraram a tendência de dispersão de machos de mamíferos marinhos, como cachalotes (LYRHOLM *et al.*, 1999) e elefantes-marinhos (FABIANI *et al.*, 2003). Um padrão de dispersão para reprodução também foi observado entre machos de *Tursiops aduncus* (MÖLLER; BEHEREGARAY, 2004; BILGMANN *et al.*, 2007; WISZNIEWSKI *et al.*, 2010). Todavia, alguns estudos relataram comportamentos de fidelidade ao hábitat praticados tanto pelas fêmeas, quanto pelos machos de *T. truncatus* para diversas localidades (*c.f.*, CONNOR *et al.*, 2000; NATOLI *et al.*, 2005; SELLAS; WELLS; ROSEL, 2005; ROSEL; HANSEN; HOHN, 2009; TSAI; MANN, 2012).

A conectividade genética entre as populações dependerá da magnitude do fluxo gênico entre os indivíduos das mesmas. Quando há um grande intercâmbio gênico, as subunidades são consideradas homogêneas, não havendo estruturação populacional entre elas (HEDRICK, 2011). Porém, é necessário relatar que nem sempre movimentos de indivíduos entre áreas/populações envolvem necessariamente reprodução e, conseqüentemente, trocas genéticas. Quando há ausência de fluxo gênico entre os indivíduos fatores como deriva genética, seleção e mutação poderão estar atuando na diferenciação genética das populações (HEDRICK, 2011).

Estimativas da intensidade de fluxo gênico efetivo entre diferentes populações podem ser verificadas através do uso de marcadores com alta variabilidade gênica, como os microssatélites, os quais são repetições em tandem de 1 à 6 nucleotídeos encontrados em alta frequência no genoma nuclear da maioria dos táxons (SELKOE; TOONEN, 2006). Estas sequências repetidas estão em constante mutação devido a erros durante a replicação do DNA, promovendo mudanças nas repetições e, conseqüentemente, nos tamanhos dos alelos (EISEN, 1999). A elevada diversidade alélica dos microssatélites permite atribuir os indivíduos às suas populações específicas e, desse modo, identificar quais espécimes são migrantes (HEDRICK, 2011).

Diversos estudos utilizando marcadores microssatélites demonstraram a presença de dispersão restrita entre populações, filopatria por pelo menos um dos sexos e alta divergência genética entre populações adjacentes de *Tursiops* sp. (KRÜTZEN *et al.*, 2004; NATOLI; PEDDEMORS; HOELZEL, 2004; NATOLI *et al.*, 2005; SELLAS; WELLS; ROSEL, 2005; MÖLLER *et al.*, 2007; ROSEL; HANSEN; HOHN, 2009; WISZNIEWSKI *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Esta estruturação populacional parece ser altamente dependente do

tipo de hábitat ocupado e da adaptabilidade dos indivíduos a este ambiente, o que pode levar ao desenvolvimento de técnicas de forrageio especializadas e à formação de grupos, diminuindo, assim, a necessidade de dispersão para demais áreas (e.g. NATOLI; PEDDEMORS; HOELZEL, 2004; BILGMANN *et al.*, 2007; MÖLLER *et al.*, 2007).

No sul do Brasil também foi demonstrada a presença de uma forte estrutura social entre os indivíduos da população residente do Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, em Laguna (SIMÕES-LOPES; FÁBIAN; MENEGHETI, 1998; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Segundo os autores, esta população apresenta um comportamento complexo de forrageio, o qual envolve interações cooperativas com os pescadores locais. Somado a esta especialização na captura de presas, Daura-Jorge, Ingram e Simões-Lopes (2012) evidenciaram a presença de alta fidelidade ao hábitat de quase toda a população, demonstrando baixas probabilidades de dispersão dos indivíduos para fora do estuário, assim como, de imigração de espécimes de áreas adjacentes.

O mesmo padrão de comportamento de forrageio foi observado, em menor intensidade, em exemplares das populações de *T. truncatus* residentes na Lagoa de Tramandaí e do Rio Mampituba, ambos no Rio Grande do Sul, o que sugere uma possível transmissão de comportamento entre as áreas (SIMÕES-LOPES; FÁBIAN; MENEGHETI, 1998). Deslocamentos de indivíduos entre Laguna e as demais localidades foram registrados nos anos 90, sendo verificada a presença de botos de Tramandaí e Torres nas áreas ocupadas pelas demais populações residentes do sul do Brasil, como na Lagoa dos Patos (MÖLLER *et al.*, 1994) e em Laguna (MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999). Entretanto, a maioria dos movimentos e interações de indivíduos destas populações ocorreu na época de migração da tainha (*Mugil spp.*) - sua principal presa -, não implicando necessariamente em reprodução e/ou fluxo gênico.

A existência de populações estuarinas residentes de *T. truncatus* ao longo da costa brasileira foi relatada apenas para a região sul do Brasil (SIMÕES-LOPES, 1995; HOFFMANN, 2004; GIACOMO, 2010; FRUET *et al.*, 2011; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Diversos estudos de longa-duração analisaram a dinâmica populacional e fizeram o reconhecimento através de marcas naturais na aleta dorsal de cada indivíduo residente das mencionadas populações (SIMÕES-LOPES, 1995; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999; HOFFMANN, 2004; GIACOMO,

2010; DAURA-JORGE, 2011; DAURA-JORGE *et al.*, 2012). Porém, o grau de relação/parentesco das populações da região sul, bem como sua estrutura genética ainda são pouco conhecidos.

Com um tamanho populacional pequeno (n=54), a população estuarina de Laguna tende a sofrer grandes ameaças, quando comparada com populações de áreas de vida maiores (MCCARTHY; THOMPSON, 2001; TRAILL; BRADSHAW; BROOK, 2007; FURY; HARRISON, 2008). Populações estuarinas/costeiras de cetáceos são, geralmente, as mais afetadas pelas ações antrópicas, podendo sofrer uma redução na sua variabilidade genética. O aumento das atividades humanas provoca mudanças no uso do hábitat, redução das taxas de reprodução e taxas de mortalidade elevadas (COCKCROFT, 1990; SIMÕES-LOPES; PAULA, 1997; SIMÕES-LOPES; DAURA-JORGE, 2008; VIAUD-MARTINEZ *et al.*, 2008). A identificação da estrutura genética desta população e a sua relação com outros grupos populacionais são de extrema importância para a definição de medidas de conservação e manejo apropriadas.

Neste sentido, o presente estudo pretende verificar a presença de fluxo gênico atual entre a subpopulação residente de *T. truncatus* do Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, em Laguna, e os espécimes amostrados ao longo da costa norte do Rio Grande do Sul através do uso de marcadores microssatélites.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de dados e Extração de DNA

Para as análises com marcadores microssatélites foram utilizadas 10 amostras de pele de *T. truncatus* provenientes de biópsias realizadas no Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos e uma amostra de tecido de um exemplar (UFSC 1398) encalhado ao longo do litoral catarinense. Todas as amostras citadas acima foram coletadas e cedidas pelo Laboratório de Mamíferos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Além disso, foram analisadas também 25 amostras de *T. truncatus* coletadas no litoral norte gaúcho (29°20'S, 49°43'W; 31°17'S, 50°57'W) e cedidas pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS), sendo a maioria proveniente de espécimes mortos e encalhados entre os anos de 1993 e 2011, com exceção da amostra de pele MP001 oriunda de uma biópsia realizada na desembocadura do Rio Mampituba, Torres/RS (Anexo 1).

O espécime UFSC 1398, que encalhou na Praia do Iró, em Laguna/SC (Anexo 1), foi agrupado para as análises subsequentes junto com os demais botos encalhados ao longo do litoral gaúcho.

Todas as amostras foram preservadas em álcool 90% ou DMSO e armazenadas à -20° C.

A extração de DNA seguiu o método de fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Genotipagem do DNA microssatélite

Quatro loci de DNA microssatélites foram analisados para 36 exemplares de *T. truncatus*. O primer KWM12a foi desenvolvido e testado primeiramente para *Orcinus orca* (HOELZEL; POTTER; BEST, 1998), EV37Mn para *Megaptera novaeangliae* (VALSECCHI; AMOS, 1996) e os primers D08 (SHINOHARA; DOMINGO-ROURA; TAKENAKA, 1997) e TexVet7 (ROONEY; MERRITT; DERR, 1999) foram para *T. truncatus*.

O DNA extraído foi amplificado através de uma reação com 10 µl, onde foram adicionados 2 µl de DNA (concentração de cerca de 20 ng/µl) à 0,13 µM de primer senso e 0,2 µM de primer anti-senso, 1x Tampão de PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 0,5 mM

de MgCl₂, 0,1 mM de dNTPs, 0,02 U/μl de Taq DNA Polimerase e 2 μM de fluorescência (FAM).

O primer sentido senso recebeu uma sequência M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') como cauda, a qual foi combinada com um primer com marcador de fluorescência (FAM) (BOUTIN-GANACHE *et al.*, 2001).

As reações de PCR para os loci de microssatélites consistiram de uma desnaturação inicial à 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94° C por 40 s, temperaturas de anelamentos por 1 min e extensão à 72° C por 1 min, além da extensão final à 72° C por 10 min (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos primers dos quatro loci de microssatélites utilizados e suas respectivas temperaturas de anelamento. F = *forward* (senso) e R = *reverse* (anti-senso).

Loci	Sequência dos primers	Temperatura de anelamento (°C)
KWM12a	F: 5'_CCATACAATCCAGCAGTC_3'	46°
	R: 5'_CACTGCAGAATGATGACC_3'	
D08	F: 5'_GATCCATCATATTGTCAAGTT_3'	57°
	R: 5'_TCCTGGGTGATGAGTCTTC_3'	
TexVet7	F: 5'_TGCACTGTAGGGTGTTTCAGCAG_3'	57°
	R: 5'_CTTAATTGGGGGCGATTTC_3'	
EV37Mn	F: 5'_AGCTTGATTTGGAAGTCATGA_3'	57°
	R: 5'_TAGTAGAGCCGTGATAAAGTGC_3'	

Cerca de 2 μl de produto de PCR foram diluídos em água ultra-pura e genotipados em um sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) do Centro de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Análise dos dados

O tamanho dos alelos em pares de bases nucleotídicas (pb) foi quantificado através da leitura dos fragmentos com o auxílio do programa Genetic Profiler versão 2.2 (Amersham

Biosciences). Para a realização do arredondamento do tamanho dos alelos e verificação de eventuais erros nos genótipos foi utilizado o programa Allelogram (MANASTER, 2002).

A frequência dos genótipos observada foi comparada com a esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada um dos loci através do teste de probabilidade baseado no método da cadeia de Markov (GUO; THOMPSON, 1992), implementado no Arlequin 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). O teste de desequilíbrio de ligação foi avaliado através do programa GenePop 4.1.3 (ROUSSET, 2012). Loci que apresentaram desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação tiveram seu nível de significância ajustado através da aplicação da correção de Bonferroni. Os níveis de significância ($p < 0,05$) para desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg e para desequilíbrio de ligação foram ajustados considerando as múltiplas comparações no mesmo conjunto de dados, segundo a correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989).

A medida de desvio das proporções de Hardy-Weinberg dentro das subpopulações (F_{is}) foi estimada para cada população usando Arlequin 3.1. Valores positivos de F_{is} indicam um déficit de heterozigotos e valores negativos, um excesso de heterozigotos (HEDRICK, 2011).

A diversidade genética dos quatro loci de microssatélites foi estimada para cada uma das populações amostradas através do número de alelos por locus (A), os alelos raros (A_r) e a frequência dos alelos, calculados no GenAlEx 6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

A riqueza de alelos (AR) foi testada no Fstat 2.9.3 e as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o), no programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

O Teste t de Student foi aplicado para estimar diferenças significativas entre as médias de heterozigosidades e riqueza de alelos entre as populações, através do programa Systat 12.0.

A frequência de alelos nulos foi calculada de acordo com Parker, Sheffer e Hedrick (1999), utilizando a seguinte fórmula (onde H_e é a heterozigosidade esperada e H_o , a heterozigosidade observada):

$$pn = H_e - H_o / 1 + H_e$$

O grau de diferenciação genética entre as populações foi estimado pelos índices F_{st} (WRIGHT, 1978) e R_{st} (SLATKIN, 1995), calculados a partir da AMOVA no programa

Arlequin 3.1. A significância dos métodos estatísticos foi examinada através de 10.000 permutações conforme descrito por Excoffier, Smouse e Quattro (1992).

A existência de diferenciação genética entre as subpopulações de Laguna e litoral norte do Rio Grande do Sul foi testada também através das frequências alélicas utilizando o teste G (SOKAL; ROHLF, 1981), no programa Genepop 4.1.3. A hipótese nula (H_0) considerou que as amostras foram obtidas de uma população panmítica.

O número mais provável de populações (K) que melhor explica o padrão de variabilidade genética observado foi estimado pelo programa Structure v.2 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), através de uma abordagem Bayesiana para a realização de testes de diferenciação e atribuição de indivíduos. Foi assumido o modelo “*admixture*” considerando tanto o modelo de frequência de alelos correlacionados, quanto de alelos independentes. Cinco corridas independentes para K variando de 1 à 3, com “*burn-in length*” e “*length of simulation*” definidos em 1.000.000 de repetições cada um, foram rodadas não usando informações prévias das populações.

RESULTADOS

Um total de 36 indivíduos de *T. truncatus* de duas subpopulações do sul do Brasil – Laguna (n=10) e litoral norte do Rio Grande do Sul (n=26) - foram analisados para quatro loci de microssatélites. Nenhuma evidência de alelos nulos foi observada para os loci avaliados.

A subpopulação de Laguna apresentou uma heterozigosidade observada maior do que a esperada para todos os loci. Na subpopulação do Rio Grande do Sul (RS) registrou-se níveis de heterozigosidade observada bem menores do que a esperada, com a presença de dois loci em que estas diferenças foram significativas, desviando do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2). Após a aplicação da correção de Bonferroni ($p=0,01$), ainda foi detectada a presença de desvio.

A subpopulação do Rio Grande do Sul foi a única a apresentar dois pares de loci ligados: TV7-EV37Mn e TV7-KWM12a. A mesma evidência foi detectada nestes mesmos loci quando considerando as duas subpopulações juntas. Após a correção de Bonferroni ($p=0,01$), ainda foi possível detectar que os loci TV7 e KWM12a estavam ligados. Somado a isto, o locus TV7 foi considerado monomórfico na subpopulação de Laguna. Em função destas características, o locus TV7 foi retirado das análises subsequentes.

As medidas de diversidade genética como riqueza de alelos e alelos exclusivos foram maiores para a subpopulação do litoral norte do Rio Grande do Sul, do que para a subpopulação de Laguna (Tabela 2). Contudo, o Rio Grande do Sul apresentou valores de *Fis* positivos (*Fis*: 0,23823; $p=0,000978$), o que indica déficit de heterozigotos e endogamia. Já a subpopulação de Laguna apresentou um *Fis* negativo (*Fis*: -0,59292; $p=1,000000$), sugerindo um excesso de heterozigotos na subpopulação.

Foram registrados entre cinco à oito alelos por locus e um total de 20 alelos na subpopulação do Rio Grande do Sul. Na subpopulação de Laguna, observou-se um total de sete alelos e de dois a três alelos por locus. As médias da heterozigosidade esperada e observada entre as duas subpopulações não foram significativamente diferentes ($p>0,05$; $gl=4$), ao contrário da riqueza alélica ($p<0,05$, $gl=4$). A subpopulação do Rio Grande do Sul foi a única a apresentar alelos exclusivos, aparecendo entre três e seis alelos únicos por locus.

Em relação à estruturação populacional, não foi observada diferenciação genética entre as duas subpopulações, as quais obtiveram valores de índices de fixação extremamente baixos (*Fst*:

0,03134; $p=0,10217$; $Rst: -0,11604$; $p=0,96594$). A análise de variância molecular (AMOVA) apontou que 96,87% da variação genética está dentro das subpopulações, sendo apenas cerca de 3% de variação entre as mesmas.

Tabela 2. Diversidade genética para cada locus de microssatélites em cada subpopulação estudada de *Tursiops truncatus*. A: Número de diferentes alelos; AR: Riqueza alélica; Au: Alelos exclusivos; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heterozigosidade esperada. Os asteriscos '*' indicam os loci que demonstraram desvio significativo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

		Rio Grande do Sul	Laguna
		(n=26)	(n=10)
D08	A	8	2
	AR	5,116	2,000
	Au	6	0
	Ho	0,47619*	1,00000*
	He	0,69106	0,14286
EV37Mn	A	5	2
	AR	3,657	2,000
	Au	3	0
	Ho	0,37500	0,14286
	He	0,48227	0,49451
KWM12a	A	7	3
	AR	5,558	3,000
	Au	4	0
	Ho	0,53846*	1,00000*
	He	0,79940	0,66013
Média	A	6,667	2,333
	AR	4,777	2,333
	Au	4,333	0
	Ho	0,46322	0,71429
	He	0,65757	0,56032

Os resultados obtidos pelo teste G para homogeneidade da distribuição dos alelos, todavia, demonstraram resultados diferentes dos encontrados pelos índices de fixação. Foram encontradas diferenças altamente significativas nas frequências alélicas entre as duas subpopulações estudadas (X^2_{16} : 17,3981; $p=0,008$) (Figura 1), sugerindo que as subpopulações não são geneticamente semelhantes.

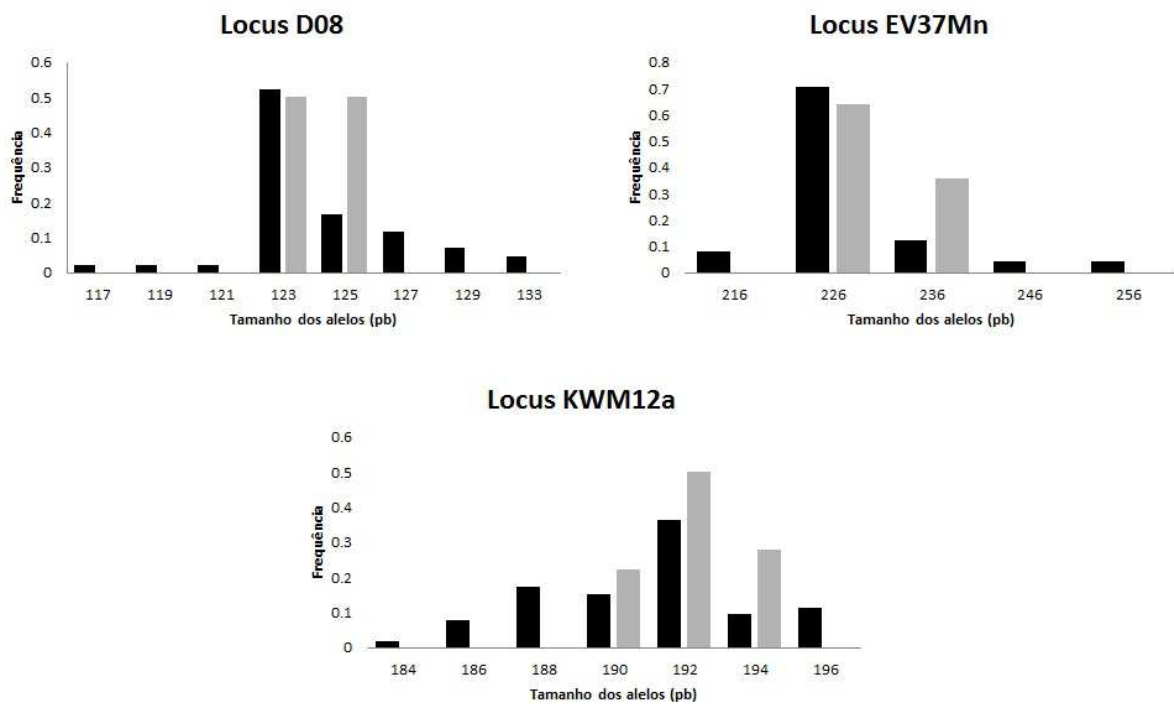


Figura 1: Frequências alélicas dos três loci de microssatélites das subpopulações do Rio Grande do Sul (preto) e Laguna (cinza claro) de *Tursiops truncatus*.

O programa Structure estimou o número de populações (K) igual à dois como a melhor quantidade de populações capaz de explicar a variabilidade genética observada. Este resultado está associado à maior probabilidade de $P(X/K)$, considerando tanto o modelo de frequência de alelos independentes, quanto correlacionados, sugerindo a subdivisão em duas populações.

Na Figura 2 gerada pelo programa, cada coluna no eixo das abscissas representa um indivíduo, o eixo das ordenadas representa a probabilidade (%) de aquele indivíduo pertencer ao novo agrupamento determinado pelo programa que é representado pela sua cor respectiva. Os primeiros indivíduos representam os espécimes originalmente do Rio Grande do Sul (linha

contínua) e os 10 últimos são da subpopulação de Laguna (linha pontilhada). Os indivíduos numerados de 1-12 (ver Figura 2) foram apontados pelo programa como pertencentes à uma população diferente, que não se refere nem ao LNRS, nem à Laguna. Desta forma, a população gaúcha estaria subdividida em duas populações, sugerindo que estes 12 indivíduos poderiam ser migrantes de uma população desconhecida (Figura 2). Com relação aos demais indivíduos analisados, o gráfico gerado pelo Structure sugere um grande compartilhamento de alelos entre as subpopulações de Laguna e Rio Grande do Sul, possivelmente como resultado de fluxo gênico atual entre estas subpopulações.

De acordo com os resultados obtidos pelo programa Structure optou-se por considerar as subpopulações de Laguna (n=10) e litoral norte do Rio Grande do Sul (n=14) uma única população denominada como “Estuarina”, enquanto que os 12 potenciais migrantes amostrados no LNRS foram considerados como membros de uma nova população denominada “Costeira/Oceânica”. Desta forma, todos os testes acima citados foram refeitos considerando a existência destas duas populações.

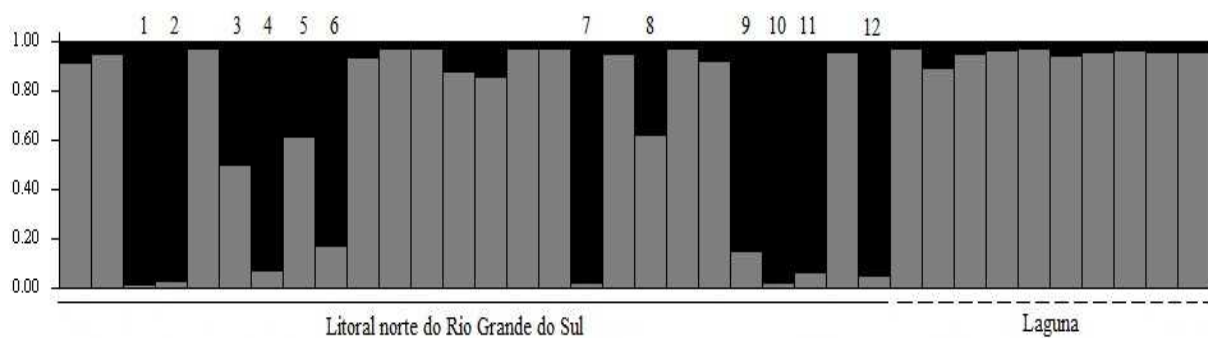


Figura 2. Melhor estruturação populacional sugerida pelo programa Structure para as subpopulações estudadas de *Tursiops truncatus* através da análise de três loci de microssatélites. Os indivíduos foram agrupados originalmente em duas populações conforme a área de coleta da amostra (Laguna versus Litoral norte do Rio Grande do Sul). As duas cores representam as novas subdivisões populacionais (k=2), sendo caracterizado pela cor cinza o grupo estuarino e em preto, possivelmente, a população costeira (e/ou oceânica). Cada coluna vertical representa um indivíduo e sua respectiva probabilidade (%) de pertencer a uma ou outra população de acordo com as frequências dos seus genótipos.

As medidas de variação genética como riqueza de alelos, alelos exclusivos e frequências dos alelos foram maiores para a população “Costeira/Oceânica” do que para a “Estuarina” (Tabela 3 e Figura 3). De acordo com a Figura 3 é possível notar que os alelos mais frequentes dos loci D08 e KWM12a são diferentes entre as duas populações. Apenas o alelo de 226 pb do locus EV37Mn apresenta frequências similares em ambas populações. Para o locus D08, 70% da população “Estuarina” apresentou o alelo de 123 pb, enquanto quase 40% da população “Costeira/Oceânica” continha o alelo de 127 pb. Aproximadamente 60% dos indivíduos estuarinos portavam o alelo de 226 pb do locus KWM12a, enquanto os alelos de 188 pb e de 196 pb do mesmo locus apresentaram uma frequência de 30% cada um na população “Costeira/Oceânica”. Apesar das nítidas diferenças entre as frequências alélicas entre as populações estudadas, as diferenças nas médias das riquezas alélicas não foram significativas entre as populações “Estuarina” e “Costeira/Oceânica” ($p=0,886$; $gl=4$). Segundo os valores de *Fis*, a população “Costeira/Oceânica” apresentou um valor positivo (*Fis*: 0,14416; $p=0,134897$) que sugere déficit de heterozigotos e endogamia, enquanto a “Estuarina”, *Fis* negativo (*Fis*: -0,11666; $p=0,826979$). As médias da heterozigosidade esperada e observada entre as duas populações não foram significativamente diferentes ($p>0,05$; $gl=4$).

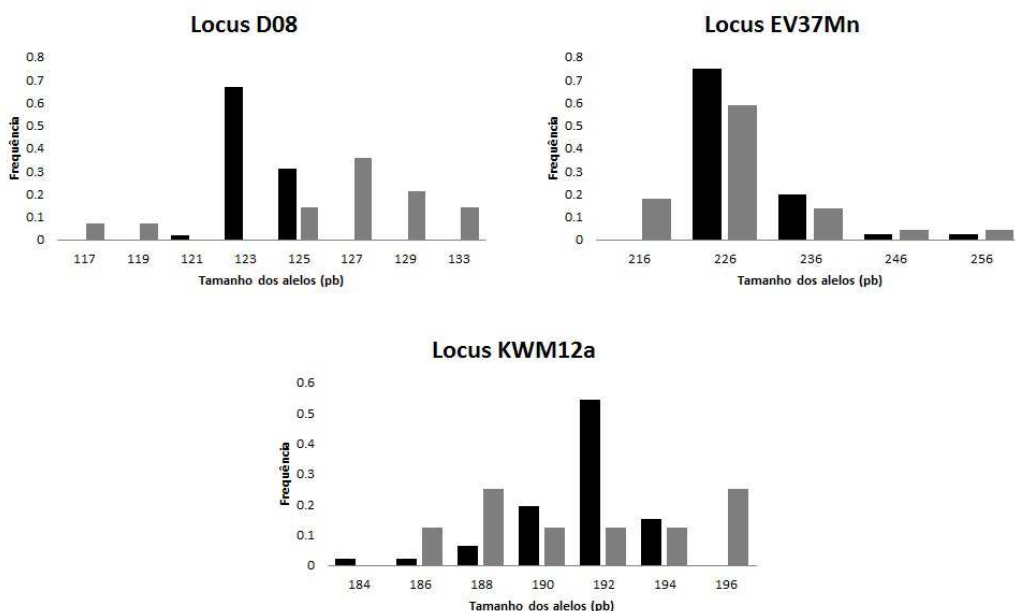


Figura 3. Frequências alélicas dos três loci de microssatélites das populações “Estuarina” (preto) e “Costeira/Oceânica” (cinza escuro) de *Tursiops truncatus*.

Tabela 3. Diversidade genética para cada locus de microssatélites em cada população – “Estuarina” e “Costeira/Oceânica”. A: Número de diferentes alelos; AR: Riqueza alélica; Au: Alelos exclusivos; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heterozigosidade esperada.

		Estuarina	Costeira/Oceânica
		(n=24)	(n=12)
D08	A	3	6
	AR	2,290	6,000
	Au	2	5
	Ho	0,58333	0,85714
	He	0,46720	0,83516
EV37Mn	A	4	5
	AR	2,680	4,227
	Au	0	1
	Ho	0,25000	0,45455
	He	0,40641	0,62338
KWM12a	A	6	6
	AR	4,194	5,760
	Au	1	1
	Ho	0,73913	0,50000
	He	0,65217	0,84783
Média	A	4,333	5,667
	AR	3,055	5,395
	Au	1,000	2,333
	Ho	0,52415	0,60390
	He	0,50859	0,76879

Os índices de fixação (F_{st} e R_{st}) mostraram níveis de estruturação populacional diferentes entre as populações. De acordo com o F_{st} , há uma moderada diferenciação genética entre as duas populações (F_{st} : 0,17232, $p \leq 0,0000$). Já para o R_{st} , não há evidências de estruturação entre as populações (R_{st} : 0,03258; $p = 0,20265$).

A análise de variância molecular (AMOVA) apontou que 82,8% da variação genética está dentro das populações, sendo 17,2% a variação entre as mesmas. Somado à isso, os resultados

obtidos pelo teste G para homogeneidade da distribuição dos alelos foram altamente significativos entre as populações “Estuarina” e “Costeira/Oceânica” (X^2_6 : infinito; $p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

Os resultados apontados neste trabalho pelos índices de fixação (F_{st} e R_{st}), considerando a existência inicial de duas populações, não verificaram a presença de estruturação populacional entre os espécimes de Laguna e Rio Grande do Sul. Contudo, de acordo com as diferenças significativas nas frequências alélicas e subdivisão de duas populações pelo Structure foi possível verificar um nível de estruturação populacional entre os indivíduos de *Tursiops truncatus* amostrados. Os dois grupos populacionais encontrados neste estudo foram denominados, a princípio, de “Estuarino” (composto pelos 10 espécimes da subpopulação estuarina de Laguna e 14 indivíduos do litoral norte do RS - espécimes supostamente estuarinos com base nos exemplares de Laguna) e “Costeiro/Oceânico” (formado pelos 12 indivíduos apontados pelo Structure como pertencentes à uma população desconhecida. Por encalharem na costa, mas sendo geneticamente diferentes do grupo estuarino, não foi possível definir se a amostra pertencia a grupos populacionais costeiros ou oceânicos).

Diferenças morfológicas entre espécimes de *T. truncatus* ao longo da costa sul do Brasil já foram registradas anteriormente, sugerindo ora a presença de formas costeiras e oceânicas (*c.f.*, SIMÕES-LOPES, 1996), ora a presença de duas subespécies de acordo com diferenças latitudinais (*c.f.*, BARRETO, 2000). Estudos recentes (*e.g.* OTT *et al.*, 2009), utilizando a região controladora do mtDNA, demonstraram também diferenças genéticas entre exemplares costeiros do Rio Grande do Sul, botos amostrados na região sudeste e uma população insular/oceânica da costa nordeste do país. Além disso, novas pesquisas, utilizando marcadores microsatélites, têm observado diferenças significativas entre populações de *Tursiops* que ocorrem em diferentes latitudes e isóbatas ao longo da costa brasileira (Larissa R. de Oliveira, comunicação pessoal). Somado à isso, encontram-se os 12 exemplares, apontados pelo presente estudo na análise gerada pelo programa Structure como geneticamente diferentes das duas subpopulações estudadas.

Desvios de HWE foram verificados durante as análises para dois loci gênicos (quando considerada a existência apenas das subpopulações do litoral norte do RS e Laguna), mesmo após a correção estatística de Bonferroni. Este fato é um possível indicativo de efeito de Wahlund (HEDRICK, 2011), que ocorre quando há uma subdivisão populacional, a qual não é considerada devido ao agrupamento de todas as subpopulações juntas, como aconteceu com a subpopulação do litoral norte do Rio Grande do Sul.

Amostras provenientes de encalhes nem sempre permitem inferir com segurança a qual população tal espécime pertencia. Muitos golfinhos encalham longe da sua área de vida devido à ação de correntes oceânicas e/ou ventos. Desta forma, o uso de amostras coletadas de carcaças pode interferir na detecção da estrutura genética entre populações. Este fenômeno foi demonstrado por Bilgmann *et al.* (2011) para *Tursiops* sp. do sul da Austrália. Utilizando espécimes mortos e encalhados, os autores verificaram uma variabilidade genética menor quando comparados com biópsias de exemplares da mesma região onde os encalhes foram registrados. Como exemplo para este fato, cita-se o indivíduo UFSC 1398 amostrado próximo à população estuarina residente de Laguna, mas com um haplótipo e genótipo extremamente diferentes dos botos desta população. Devido às similaridades genéticas com alguns indivíduos da subpopulação gaúcha, este espécime foi considerado como oriundo da subpopulação do Rio Grande do Sul, mostrando posteriormente pertencer a uma subpopulação até então desconhecida. Como os exemplares de Laguna pertencem à uma população estuarina, sugere-se que UFSC 1398 - assim como os demais exemplares geneticamente similares à ele - pertençam, possivelmente, à uma população costeira e/ou oceânica.

No Brasil, com o auxílio de estudos da morfologia craniana de espécimes do gênero *Tursiops*, foi sugerida a presença de duas subespécies (*T. truncatus truncatus* e *T. truncatus gephyreus*; BARRETO, 2000) e até mesmo espécies (*T. truncatus* e *T. gephyreus*; WICKERT, 2010) em simpatria ao longo do litoral sul do Brasil. Um estudo similar, conduzido por Charlton-Robb *et al.* (2011), onde foram analisadas diferenças morfológicas e genéticas, sugeriu a presença de duas espécies de *Tursiops* para o sul da Austrália. Todavia, a nova espécie proposta (*T. australis*) não foi aceita pela *Society for Marine Mammalogy* (COMMITTEE ON TAXONOMY, 2012) devido, entre outros itens, a um grande número de sobreposição das características métricas. Desse modo, a separação entre as espécies seria somente possível com o uso de análises multivariadas, as quais geralmente elucidam a presença de formas geográficas dentro da espécie (*e.g.* PERRIN; DOLAR; ROBINEAU, 1999; PERRIN *et al.*, 2011). Além disso, o comitê de taxonomia cita que os espécimes foram comparados somente com golfinhos-nariz-de-garrafa da costa australiana, demonstrando a necessidade de uma reavaliação rigorosa dos dados. Da mesma forma, os trabalhos realizados no Brasil com morfologia craniana (*e.g.* WICKERT, 2010) apresentaram um alto grau de sobreposição na maior parte das medidas

tomadas entre os dois grupos de *Tursiops* sp., além de não demonstrarem diferenças genéticas entre as espécies propostas. Já Oliveira *et al.* (2008) utilizando análises com marcador microsatélites sugeriram a presença de três grupos de *Tursiops* no Rio Grande do Sul – costeiro, oceânico e, possivelmente, *T. gephyreus*. Neste sentido, com base nos dados de Oliveira *et al.* (2008) e argumentos apontados pelo Comitê em Taxonomia da *Society for Marine Mammalogy*, o atual estudo optou por adotar uma medida mais conservadora chamando os dois grupos de *T. truncatus* geneticamente distintos como formas estuarina (por conter indivíduos de populações estuarinas) e costeira (e/ou oceânica), os quais podem ou não vir a ser comprovados no futuro como subespécies ou, até mesmo, espécies diferentes de *Tursiops* (*i.e.* *T. truncatus* e *T. gephyreus*).

A existência de populações costeiras e oceânicas de *T. truncatus* já foi comprovada em diversas regiões do mundo (WALKER, 1981; DUFFIELD; RIDGWAY; CORNELL, 1983; HERSH; DUFFIELD, 1990; VAN WAEREBEEK *et al.*, 1990; FINDLAY *et al.*, 1992; MEAD; POTTER, 1995; HOELZEL; POTTER; BEST, 1998; PARSONS *et al.*, 2002; SANINO *et al.*, 2005; LOWTHER, 2006; PERRIN *et al.*, 2011), e apesar de ainda não ter sido determinada para a costa do Oceano Atlântico Sul Ocidental, esta hipótese já havia sido sugerida anteriormente por Simões-Lopes (1996). Além disso, é de extrema importância destacar que alguns estudos demonstraram também diferenças genéticas entre as populações costeiras de *Tursiops* sp. de acordo com o hábitat ocupado - áreas protegidas (*e.g.* estuários) ou abertas ao longo da costa (*c.f.*, SELLAS; WELLS; ROSEL, 2005; MÖLLER *et al.*, 2007; WARING *et al.*, 2009).

A nova análise da estruturação populacional definida pelo programa Structure permitiu verificar diferenças genéticas entre as populações denominadas de “Estuarina” e “Costeira/Oceânica”, de acordo com o índice de fixação F_{st} , que leva em consideração a redução da heterozigosidade nas subpopulações relativas à população total (WRIGHT, 1978). Resultado semelhante não foi verificado pelo R_{st} , um índice que assume o modelo de mutação escalonada (*stepwise mutation model* - SMM) (OHTA; KIMURA, 1973). Se os microsatélites evoluem de acordo com o SMM, então os alelos de tamanhos similares (ou seja, com mesmo número de repetições) são mais proximamente relacionados entre si, do que com os alelos de tamanhos diferentes (VALDES; SLATKIN; FREIMER, 1993). Contudo, há ainda muita controversa a respeito da acurácia do R_{st} , pois alguns loci podem evoluir de maneira similar, enquanto outros

não. Quanto maior o tempo de divergência entre as populações, maiores as chances dos alelos de mesmo comprimento terem evoluído de ancestrais diferentes (HEDRICK, 2011).

Destaca-se ainda que diferenças entre o padrão de fluxo gênico entre populações com áreas de vida geograficamente próximas já foram constatadas por Möller *et al.* (2007) para populações de *Tursiops aduncus* da costa sudeste da Austrália. Segundo os autores, populações estuarinas interagem sexualmente (com fluxo gênico) entre si, assim como as populações costeiras. Entretanto, não foram encontradas evidências de fluxo gênico entre populações que habitam áreas mais protegidas e as populações de áreas abertas ao longo da costa, mesmo distando menos de 60 km entre si. Desta forma, não descarta-se a hipótese de que um padrão similar possa ser encontrado para a costa brasileira, havendo uma interação sexual com fluxo gênico de indivíduos de Laguna somente com indivíduos de outras populações estuarinas residentes, já que movimentos entre as áreas foram verificados anteriormente (*c.f.* MÖLLER *et al.*, 1994; SIMÕES-LOPES; FÁBIAN, 1999).

Segundo Daura-Jorge, Ingram e Simões-Lopes (2012), há uma alta frequência de permanência dos botos estuarinos residentes (de ambos os sexos) no Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos, com uma probabilidade de emigração extremamente baixa (0,0031). Simões-Lopes e Fábio (1999) mencionaram o intercâmbio de apenas 5,7% de indivíduos entre Laguna e Imbé/Tramandaí (RS). De acordo com observações feitas por Daura-Jorge *et al.* (2012), a maioria dos espécimes migrantes fazem parte do grupo que não coopera com os pescadores e, assim, não fazendo uso da técnica especializada de forrageio. Contudo, devido à falta de informação da subpopulação de origem das amostras de encalhes, provenientes do litoral norte do Rio Grande do Sul, a hipótese levantada anteriormente não pode ser verificada neste estudo.

A respeito dos altos níveis de heterozigosidade e o baixo polimorfismo observados na subpopulação de Laguna é importante ressaltar que os mesmos podem ser uma consequência do pequeno tamanho efetivo, pois tamanhos populacionais pequenos sugerem que a população foi fundada por poucos indivíduos reprodutivos, os quais eram heterozigotos para a maioria dos loci (*e.g.* LEARY; ALLENDORF; FORBES, 1993).

O poder estatístico não depende apenas das diferenças entre as populações, mas varia também conforme a riqueza dos dados, como o tamanho amostral de cada população, o número

de populações e a quantidade de variáveis medidas. Tamanhos amostrais pequenos geralmente tendem a causar diferenças populacionais não-significativas, resultando em erros na estimativa do nível de estruturação populacional (WAPLES, 1998). Desta forma, é de extrema importância delinear melhor o experimento tanto através do aumento do número de loci de microssatélites a ser analisado, bem como, o número de indivíduos amostrados da subpopulação de Laguna (considerando os botos que interagem ou não com a pesca local, a fim de caracterizar cada espécime de acordo com a técnica de forrageio utilizada) e das demais subpopulações estuarinas. Somente desta forma será possível testar se há diferenças genéticas nas subpopulações estudadas relacionadas não somente à limitação de fluxo gênico entre os indivíduos de Laguna e litoral norte do Rio Grande do Sul, mas também com a estratégia de forrageio dentro da subpopulação de Laguna. A partir da continuidade deste estudo será possível determinar com maior precisão a estruturação e o padrão de fluxo gênico entre os grupos populacionais, bem como tomar medidas de manejo e conservação mais realistas e adequadas a estas populações.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, A.S. **Variação craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) (Montagu, 1821) na costa atlântica da América do Sul.** 2000. 122f. Tese de Doutorado em Oceanografia - Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande.
- BARROS, N.B.; WELLS, R.S. Prey and feeding patterns of resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Sarasota Bay, Florida. **Journal of Mammalogy**, v. 79, p. 1045-1059, 1998.
- BILGMANN, K.; MÖLLER, L.M.; HARCOURT, R.G.; BEHEREGARAY, L.B. Genetic differentiation in bottlenose dolphins from South Australia: an association with local oceanography and coastal geography. **Marine Ecology Progress Series**, v. 341, p. 265-276, 2007.
- BILGMANN, K.; MÖLLER, L.M.; HARCOURT, R.G.; KEMPER, C.M.; BEHEREGARAY, L.B. The use of carcasses for the analysis of cetacean population genetic structure: a comparative study in two dolphin species. **Plos One**, v. 6, n. 5, 2011. Published online.
- BOUTIN-GANACHE, I.; RAPOSO, M.; RAYMOND, M.; DESCHEPPER, C.F. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele sizing methods. **BioTechniques**, v. 31, n. 1, p. 24-28, 2001.
- CHARLTON-ROBB, K.; GERSHWIN, L.-A.; THOMPSON, R.; AUSTIN, J.; OWEN, K.; MCKECHNIE, S. A new dolphin species, the Burrnunan dolphin *Tursiops australis* sp. nov., endemic to Southern Australian coastal waters. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 1-17, 2011.
- COCKCROFT, V.G. Dolphin catches in the Natal shark nets, 1980 to 1988. **South African Journal of Wildlife Research**, v. 20, p. 44-51, 1990.
- COMMITTEE ON TAXONOMY. **List of marine mammal species and subspecies.** 2012. Disponível em: <http://www.marinemammalscience.org/index.php?option=com_content&view=article&id=420&Itemid=280>. Acesso em 09 jan. 2013.
- CONNOR, R.C.; WELLS, R.S.; MANN, J.; READ, A.J. The bottlenose dolphin: social relationships in a fission–fusion society. In: MANN, J.; CONNOR, R.C.; TYACK, P.L.;

- WHITEHEAD, H. (Ed.). **Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whales.** Chicago: University of Chicago Press, 2000. p. 91–126.
- DAURA-JORGE, F.G. **Quantos? Onde? Como? Múltiplos aspectos ecológicos de uma população do boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) em Laguna, sul do Brasil: Implicações para a conservação.** 2011. Tese de Doutorado em Zoologia – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DAURA-JORGE, F.G.; CANTOR, M.; INGRAM, S.N.; LUSSEAU, D.; SIMÕES-LOPES, P.C. The structure of a bottlenose dolphin society is coupled to a unique foraging cooperation with artisanal fishermen. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 702-705, 2012.
- DAURA-JORGE, F.G.; INGRAM, S.N.; SIMÕES-LOPES, P.C. Seasonal abundance and adult survival of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in a community that cooperatively forages with fishermen in southern Brazil. **Marine Mammal Science**, 2012. Published online. doi: 10.1111/j.1748-7692.2012.00571.x
- DUFFIELD, D.A.; RIDGWAY, S.H.; CORNELL, L.H. Hematology distinguishes coastal and offshore forms of dolphins (*Tursiops*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 930-933, 1983.
- EISEN, J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: Evolution and Applications.** Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 34–48.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.
- FABIANI, A.; HOELZEL, A.R.; GALIMBERTI, F.; MUELBERT, M.M.C. Long range paternal gene flow in the Southern elephant seal. **Science**, v. 299, p. 676, 2003.
- FERNÁNDEZ, R.; SANTOS, M.B.; PIERCE, G.J.; LLAVONA, A.; LÓPEZ, A.; SILVA, M.A.; FERREIRA, M.; CARRILLO, M.; CERMEÑO, P.; LENS, S.; PIERTNEY, S.B. Fine-scale

- genetic structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Atlantic coastal waters of the Iberian Peninsula. **Hydrobiologia**, v. 670, p. 111-125, 2011.
- FINDLAY, K.P.; BEST, P.B.; ROSS, G.J.B.; COCKCROFT, V.G. The distribution of small odontocete cetaceans off the coasts of South-Africa and Namibia. **South African Journal of Marine Science**, v. 12, p. 237-270, 1992.
- FORD, J.K.B.; ELLIS, G.M.; BARRETT-LENNARD, L.G.; MORTON, A.B.; PALM, R.S.; BALCOMB, K.C. Dietary specialization in two sympatric populations of killer whales (*Orcinus orca*) in coastal British Columbia and adjacent waters. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 1456–1471, 1998.
- FRUET, P.F.; SECCHI, E.R.; DI TULLIO, J.C.; KINAS, P.G. Abundance of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, inhabiting the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: Implication for conservation. **Zoologia**, v. 28, p. 23-30, 2011.
- FURY, C.A.; HARRISON, P.L. Abundance, site fidelity and range patterns of Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) in two Australian subtropical estuaries. **Marine and Freshwater Research**, v. 59, p. 1015-1027, 2008.
- GANNON, D.P.; WAPLES, D.M. Diets of coastal bottlenose dolphins from the US mid-Atlantic coast differ by hábitat. **Marine Mammal Science**, v. 20, p. 527-545, 2004.
- GIACOMO, A.B. **Análise do padrão de ocupação dos botos, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), no estuário de Tramandaí, sul do Brasil, a partir do estudo de fotoidentificação.** 2010. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé.
- GREENWOOD, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 140–162, 1980.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test for Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.
- HAIN, J.H.W.; CARTER, G.R.; KRAUS, S.D.; MAYO, C.A.; WINN, H.E. Feeding behavior of the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*, in the western North Atlantic. **Fishery Bulletin US**, v. 80, p. 259-268, 1982.
- HEDRICK, P.W. **Genetics of Populations.** Jones and Bartlett, 2011.

- HERSH, S.L.; DUFFIELD, D.A. Distinction between Northwest Atlantic offshore and coastal bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphometry. In: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 129-139.
- HOELZEL, A.R. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. **The Journal of Heredity**, v. 89, p. 451-458, 1998.
- HOELZEL, A.R.; POTTER, C.W.; BEST, P.B. Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 265, p. 1177-1183, 1998.
- HOFFMANN, L.S. **Um estudo de longa duração de um grupo costeiro de golfinhos *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) (Cetacea, Delphinidae) no sul do Brasil: Aspectos de sua biologia e bioacústica**. 2004. Tese de Doutorado em Biologia Animal – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- KRÜTZEN, M.; SHERWIN, W.B.; BERGGREN, P.; GALES, N. Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. **Marine Mammal Science**, v. 20, p. 28-47, 2004.
- KRÜTZEN, M.; MANN, J.; HEITHAUS, M.R.; CONNOR, R.C.; BEJDER, L.; SHERWIN, W.B. Cultural transmission of tool use in bottlenose dolphins. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 102, p. 8939-8943, 2005.
- LAWSON, L.J.; PERRIN, N. Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1559-1578, 2007.
- LEARY, R.F.; ALLENDORF, F.W.; FORBES, S.H. Conservation genetics of bull trout in the Columbia and Klamath River Drainages. **Conservation Biology**, v. 7, n. 4, p. 856-865, 1993.
- LEWIS, J.S.; SCHROEDER, W.W. Mud plume feeding, a unique foraging behavior of the bottlenose dolphin in the Florida Keys. **Gulf of Mexico Science**, v. 1, p. 92-97, 2003.
- LOWTHER, J.L. **Genetic variation of coastal and offshore bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the eastern North Pacific Ocean**. 2006. Tese de Mestrado em Marine Science - University of San Diego, San Diego.

- LYRHOLM, T.; LEIMAR, O.; JOHANNESON, B.; GYLLENSTEN, U. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 266, p. 347–354, 1999.
- MANASTER, C. J. **Allelogram**: a program for normalizing and binning microsatellite genotypes [Internet]. 2002. Disponível em: <<http://code.google.com/p/allelogram/>>.
- MANN, J.; SARGEANT, B.L.; WATSON-CAPPS, J.J.; GIBSON, Q.A.; HEITHAUS, M.R.; CONNOR, R.C.; PATTERSON, E. Why do dolphins carry sponges? **Plos One**, v. 3, n. 12, 2008. Published online.
- MCCARTHY, M.A.; THOMPSON, C. Expected minimum population size as a measure of threat. **Animal Conservation**, v. 4, p. 351-355, 2001.
- MEAD, J.G.; POTTER, C.W. Recognizing two populations of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) off the Atlantic coast of North America: morphologic and ecologic considerations. **IBI Reports**, v. 5, p. 31-44, 1995.
- MÖLLER; L.M.; BEHEREGARAY, L.B. Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1607-1612, 2004.
- MÖLLER, L.M.; SIMÕES-LOPES, P.C.; SECCHI, E.R.; ZERBINI, A.N. Uso da fotoidentificação no estudo do deslocamento de botos *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) na costa sul do Brasil. In: Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul, 6, 1994, Florianópolis, SC. **Anais da VI Reunião de Trabalhos de Especialistas em mamíferos Aquáticos da América do Sul**, 1994. p. 142.
- MÖLLER, L.M.; WISZNIEWSKI, J.; ALLEN, S.J.; BEHEREGARAY, L.B. Habitat type promotes rapid and extremely localized genetic differentiation in dolphins. **Marine and Freshwater Research**, v. 58, p. 640-648, 2007.
- 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**, v. 272, p. 1217-1226, 2005.
- NATOLI, A.; PEDDEMORS, V.M.; HOELZEL, A.R. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, p. 363–375, 2004.

- OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetical Research**, v. 22, p. 201-204, 1973.
- OLIVEIRA, L. R.; OTT, P.H.; MORENO, I.B.; TAVARES, M.; DANILEWICZ, D.; ALMEIDA, R.; SICILIANO, S.; BONATTO, S.L. Variabilidade genética e estrutura populacional do golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, em águas brasileiras. In: Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul, 13, 2008, Montevideo, Uruguai. **Anais da XIII Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul**, 2008. p. 80.
- OTT, P.H.; TAVARES, M.; MORENO, I.B.; OLIVEIRA, L.R.; DANILEWICZ, D. *Os cetáceos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo*. In: MOHR, L.V.; CASTRO, J.W.A.; COSTA, P.M.S.; ALVES, R.J.V. (Ed.) **Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo** (Volume II). Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2009. p. 283-300.
- PARKER, K.M.; SHEFFER, R.J.; HEDRICK, P.W. Molecular variation and evolutionarily significant units in the endangered gila topminnow. **Conservation Biology**, v. 13, n. 1, p. 108-116, 1999.
- PARSONS, K.M.; NOBLE, L.R.; REID, R.J.; THOMPSON, P.M. Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? **Biological Conservation**, v. 108, p. 175-182, 2002.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in excel. Population genetics software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.
- PERRIN, W.F.; DOLAR, M.L.L.; ROBINEAU, D. Spinner dolphins (*Stenella longirostris*) of the western Pacific and Southeast Asia: pelagic and shallow-water forms. **Marine Mammal Science**, v. 15, p. 1029-1053, 1999.
- PERRIN, W.F.; THIELEKING, J.L.; WALKER, W.A.; ARCHER, F.I.; ROBERTSON, K.M. Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: cranial differentiation of coastal and offshore forms. **Marine Mammal Science**, v. 27, n. 4, p. 769-792, 2011.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

- RICE, W.R. Analyzing table of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.
- ROONEY, A.P.; MERRITT, D.B.; DERR, J.N. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **The 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: common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 5030-5045, 2009.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANINO, G.P.; VAN WAEREBEEK, K.; VAN BRESSEM, M.-F.; PASTENE, L.A. A preliminary note on population structure in eastern South Pacific common bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 7, n. 1, p. 65-70, 2005.
- SARGEANT, B.L.; MANN, J.; BERGGREN, P.; KRÜTZEN, M. Specialization and development of beach hunting, a rare foraging behavior, by wild bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.). **Canadian Journal of Zoology**, 83, p. 1400-1410, 2005.
- SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellites markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.
- SELLAS, A.B.; WELLS, R.S.; ROSEL, P.E. Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal fine scale geographic structure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Gulf of Mexico. **Conservation Genetics**, v. 6, p. 715-728, 2005.
- SIMÕES-LOPES, P.C. **Ecologia comportamental do delfim, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) durante as interações com a pesca artesanal de tainhas (*Mugil* spp.) no sul do Brasil**. 1995. Tese de Doutorado em Zoologia - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SIMÕES-LOPES, P.C. Offshore and coastal bottlenose dolphins on southern Brazil: preliminary comparisons on coloration. In: Reunión de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 7, 1996, Viña del Mar, Chile. **Anais da VII Reunión de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur**, 1996. p. 84.

- SIMÕES-LOPES, P.C.; DAURA-JORGE, F.G. **Os Parceiros da Sobrevivência: A interação entre botos e pescadores no sul do Brasil.** Florianópolis: Insular, 2008.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; FÁBIAN, M.E. Residence patterns and site fidelity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Montagu) (Cetacea, Delphinidae) off Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 4, p. 1017-1024, 1999.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; FÁBIAN, M.E.; MENEGHETI, J.O. Dolphins Interactions with the mullet artisanal fisheries on Southern Brazil: a qualitative and quantitative approach. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 709-726, 1998.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; PAULA, G.S. Mamíferos aquáticos e impacto humano: diretrizes para conservação e “utilização não-letal”. **Aquitaine Océan**, v. 3, p. 69-78, 1997.
- SHINOHARA, M.; DOMINGO-ROURA, X.; TAKENAKA, O. Microsatellite in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 695-696, 1997.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry, the principles and practice of statistics in biological research.** 3 ed. New York, 1981.
- TYNE, J.A.; LONERAGAN, N.R.; KOPPS, A.M.; ALLEN, S.J.; KRÜTZEN, M.; BEJDER, L. Ecological characteristics contribute to sponge distribution and tool use in bottlenose dolphins *Tursiops* sp. **Marine Ecology Progress Series**, v. 444, p. 143-153, 2012.
- TORRES, L.G.; READ, A.J. Where to catch a fish? The influence of foraging tactics on the ecology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Florida Bay, Florida. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 4, p. 797-815, 2009.
- TRAILL, L.W.; BRADSHAW, C.J.A.; BROOK, B.W. Minimum viable population size: a meta-analysis of 30 years of published estimates. **Biological Conservation**, v. 139, p. 159-166, 2007.
- TSAI; Y.J.; MANN, J. Dispersal, philopatry, and the role of fission-fusion dynamics in bottlenose dolphins. **Marine Mammal Science**, 2012. Published online. doi: 10.1111/j.1748-7692.2011.00559.x
- VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Allele frequencies at microsatellite loci - the Stepwise Mutation Model revisited. **Genetics**, v. 133, p. 737-749, 1993.

- VALSECCHI, E.; AMOS, W. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 151-156, 1996.
- VAN WAEREBEEK, K.; REYES, J.C.; READ, A.J.; MCKINNON, J.S. Preliminary observations of bottlenose dolphins from the Pacific coast of South America. In: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. (Ed.) **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p.101-128.
- VIAUD-MARTINEZ, K.A.; BROWNELL, R.L.Jr; KOMNENOU, A.; BOHONAK, A.J. Genetic isolation and morphological divergence of Black Sea bottlenose dolphins. **Biological Conservation**, v. 141, p. 1600-1611, 2008.
- WALKER, W.A. **Geographical Variation in Morphology and Biology of Bottlenose dolphins (Tursiops) in the Eastern North Pacific**. National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Center, 1981.
- WAPLES, R.S. Separating the wheat from the Chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 438-450, 1998.
- WARING, G.T; JOSEPHSON, E.; MAZE-FOLEY, K.; ROSEL, P.E. **U.S. Atlantic and Gulf of Mexico marine mammal stock assessments – 2009**. 2010. Disponível em: <<http://www.nefsc.noaa.gov/publications/tm/tm213/>>. Acessado em: 06 mar. 2013.
- WICKERT, J.C. **Morfometria craniana do golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops* spp. (Mammalia: Cetacea) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo.
- WISZNIEWSKI, J.; BEHEREGARAY, L.B.; ALLEN, S.J.; MÖLLER, L.M. Environmental and social influences on the genetic structure of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) in Southeastern Australia. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 1405-1419, 2010.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations (Vol. 4). Variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.
- BARACHO, C.; CIPOLOTTI, S.; MARCOVALDI, E.; APOLINÁRIO, M.; SILVA, M.B. The occurrence of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the biological reserve of Atol das Rocas in north-eastern Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 1, 2008. Published online.
- BARRETO, A.S. **Varição craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) (Montagu, 1821) na costa atlântica da América do Sul**. 2000. 122f. Tese de Doutorado em Oceanografia - Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande.
- BASTIDA, R.; RODRÍGUEZ, D. **Marine Mammals of Patagonia and Antarctica**. 1 ed. Buenos Aires: Vazquez Mazzini, 2005.
- BERNARDI, L.R. **Estudo ecológico e comportamental do Boto-da-tainha *Tursiops truncatus* Montagu, 1821 (Cetacea, Delphinidae) na foz do Rio Mampituba, Torres, RS**. 2000. 103f. Dissertação de Mestrado em Biologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BILGMANN, K.; MÖLLER, L.M.; HARCOURT, R.G.; BEHEREGARAY, L.B. Genetic differentiation in bottlenose dolphins from South Australia: an association with local oceanography and coastal geography. **Marine Ecology Progress Series**, v. 341, p. 265-276, 2007.
- BOURRET, V.; MACÉ, M.; BONHOMME, M.; CROUAU-ROY, B. Microsatellites in Cetaceans: an overview. **The Open Marine Biology Journal**, v. 2, p. 38-42, 2008.
- BUSNEL, R.G. Symbiotic relationship between man and dolphins. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, v. 35, p. 112-131, 1973.
- CARRETTA, J.V.; FORNEY, K.A.; MUTO, M.M.; BARLOW, J.; BAKER, J.; HANSON, B.; LOWRY, M.S. **U.S. Pacific Marine Mammal Stock Assessments - 2004**. National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Center, 2005.
- CARVALHO, M.S.; ROSSI-SANTOS, M.R. Sightings of the bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Trindade Island, Brazil, South Atlantic Ocean. **Marine Biodiversity Records**, v. 4, p. 1-3, 2011.

- CHARLTON-ROBB, K.; GERSHWIN, L.-A.; THOMPSON, R.; AUSTIN, J.; OWEN, K.; MCKECHNIE, S. A new dolphin species, the Burrunan dolphin *Tursiops australis* sp. nov., endemic to Southern Australian coastal waters. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 1-17, 2011.
- COMMITTEE ON TAXONOMY. **List of marine mammal species and subspecies**. 2012. Disponível em: <http://www.marinemammalscience.org/index.php?option=com_content&view=article&id=420&Itemid=280>. Acessado em 09 jan. 2013.
- CONNOR, R.C.; WELLS, R.S.; MANN, J.; READ, A.J. The bottlenose dolphin: social relationships in a fission–fusion society. In: MANN, J.; CONNOR, R.C.; TYACK, P.L.; WHITEHEAD, H. (Ed.). **Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whales**. Chicago: University of Chicago Press, 2000. p. 91–126.
- CURRY, B.E. **Phylogenetic relationships among bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in a worldwide context**. 1997. Tese de Doutorado - Texas A&M University, College Station.
- DAURA-JORGE, F.G. **Quantos? Onde? Como? Múltiplos aspectos ecológicos de uma população do boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) em Laguna, sul do Brasil: Implicações para a conservação**. 2011. Tese de Doutorado em Zoologia – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DAURA-JORGE, F.G.; CANTOR, M.; INGRAM, S.N.; LUSSEAU, D.; SIMÕES-LOPES, P.C. The structure of a bottlenose dolphin society is coupled to a unique foraging cooperation with artisanal fishermen. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 702-705, 2012.
- DAURA-JORGE, F.G.; SIMÕES-LOPES, P.C. Lobomycosis-like disease in wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* of Laguna, southern Brazil: monitoring of a progressive case. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 93, p. 163-170, 2011.
- DI TULLIO, J.C. **Uso do hábitat do boto, *Tursiops truncatus*, no estuário da Lagoa dos Patos e águas costeiras adjacentes, RS, Brasil**. 2009. Dissertação de Mestrado em Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- DUFFIELD, D.A.; RIDGWAY, S.H.; CORNELL, L.H. Hematology distinguishes coastal and offshore forms of dolphins (*Tursiops*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 930-933, 1983.

- FINDLAY, K.P.; BEST, P.B.; ROSS, G.J.B.; COCKCROFT, V.G. The distribution of small odontocete cetaceans off the coasts of South-Africa and Namibia. **South African Journal of Marine Science**, v. 12, p. 237-270, 1992.
- FRUET, P.F.; SECCHI, E.R.; DI TULLIO, J.C.; KINAS, P.G. Abundance of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, inhabiting the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: Implication for conservation. **Zoologia**, v. 28, p. 23-30, 2011.
- GIACOMO, A.B. **Análise do padrão de ocupação dos botos, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), no estuário de Tramandaí, sul do Brasil, a partir do estudo de fotoidentificação.** 2010. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé.
- GIBSON, Q.A.; MANN, J. Early social development in wild bottlenose dolphins: sex differences, individual variation and maternal influence. **Animal Behaviour**, v. 76, p. 375-387, 2008.
- GOODALL, R.N.P.; MARCHESI, M.C.; PIMPER, L.E.; DELLABIANCA, N.; BENEGAS, L.G.; TORRES, M.; RICCIALDELLI, L. Southernmost records of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. **Polar Biology**, v. 34, n. 7, p. 1085-1090, 2011.
- HALE, P.T.; BARRETO, A.S.; ROSS, G.J.B. Comparative morphology and distribution of the *aduncus* and *truncatus* forms of bottlenose dolphin *Tursiops* in the Indian and western Pacific Oceans. **Aquatic Mammals**, v. 26, p. 101-110, 2000.
- HERSH, S.L.; DUFFIELD, D.A. Distinction between Northwest Atlantic offshore and coastal bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphometry. In: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 129-139.
- HOELZEL, A.R.; POTTER, C.W.; BEST, P.B. Genetic differentiation between parapatric ‘nearshore’ and ‘offshore’ populations of the bottlenose dolphin. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 265, p. 1177-1183, 1998.
- HOFFMANN, L.S. **Um estudo de longa duração de um grupo costeiro de golfinhos *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) (Cetacea, Delphinidae) no sul do Brasil: Aspectos de sua biologia e bioacústica.** 2004. Tese de Doutorado em Biologia Animal – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- IUCN. **Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria**. IUCN Species Survival Commission, 2008. Disponível em: < <http://static.zsl.org/files/08-redlistguidelines-aug-2008-896.pdf>>. Acessado em: 24 nov. 2012.
- LEDUC, R.G.; PERRIN, W.F.; DIZON, A.E. Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. **Marine Mammal Sciences**, v. 15, p. 619-648, 1999.
- LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. Abundance of bottlenose dolphins in Corpus Christi Bay and coastal southern Texas. **Contributions in Marine Science**, v. 26, p. 179-199, 1983.
- LOWTHER, J.L. **Genetic variation of coastal and offshore bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the eastern North Pacific Ocean**. 2006. 115f. Dissertação de Mestrado em Marine Science - University of San Diego, San Diego.
- MEAD, J.G.; POTTER, C.W. Natural history of bottlenose dolphins along the Central Atlantic Coast of the United State. In: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 165-195.
- MEAD, J.G.; POTTER, C.W. Recognizing two populations of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) off the Atlantic coast of North America: morphologic and ecologic considerations. **IBI Reports**, v. 5, p. 31-44, 1995.
- MÖLLER, L.M.; BEHEREGARAY, L.B. Coastal bottlenose dolphins from southeastern Australia are *Tursiops aduncus* according to sequences of the mitochondrial DNA control region. **Marine Mammal Science**, v. 17, p. 249-263, 2001.
- MÖLLER, L.M.; BILGMANN, K.; CHARLTON-ROBB, K.; BEHEREGARAY, L.B. Multi-gene evidence for a new bottlenose dolphin species in southern Australia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 674-681, 2008.
- MÖLLER, L.M.; SIMÕES-LOPES, P.C.; SECCHI, E.R.; ZERBINI, A.N. Uso da fotoidentificação no estudo do deslocamento de botos *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) na costa sul do Brasil. In: Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul, 6, 1994, Florianópolis, Sc. **Anais da VI Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul**, 1994. p. 142.
- MORENO, I.B.; OTT, P.H.; TAVARES, M.; OLIVEIRA, L.R.; BORBA, M.R.; DRIEMEIER, D.; NAKASHIMA, S.B.; HEINZELMANN, L.S.; SICILIANO, S.; VAN BRESSEM, M.F.

- Mycotic dermatitis in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from southern Brazil, with a confirmed record of lobomycosis disease. In: IWC Scientific Committee, 2008, Santiago Chile. **Anais da IWC Scientific Committee**, 2008.
- MORENO, I.B.; OTT, P.H.; TAVARES, M.; OLIVEIRA, L.R.; DANILEWICZ, D.; SICILIANO, S.; BONNATO, S.L. Os cetáceos com ênfase no golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). In: VIANA, D.L. *et al.* (Ed.) **O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 anos de Estação**. Brasília: SECIRM, 2010. p. 286-293.
- MORITZ, C. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 401-411, 1994.
- NATOLI, A.; PEDDEMORS, V.M.; HOELZEL, A.R. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, p. 363-375, 2004.
- ODELL, D.K. Status of aspects of the life history of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in Florida. **Journal Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 7, p. 1055-1058, 1975.
- OLIVEIRA, L. R.; OTT, P.H.; MORENO, I.B.; TAVARES, M.; DANILEWICZ, D.; ALMEIDA, R.; SICILIANO, S.; BONATTO, S.L. Variabilidade genética e estrutura populacional do golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, em águas brasileiras. In: Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul, 13, 2008, Montevideo, Uruguai. **Anais da XIII Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul**, 2008. p. 80.
- OTT, P.H.; TAVARES, M.; MORENO, I.B.; OLIVEIRA, L.R.; DANILEWICZ, D. Os cetáceos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. In: MOHR, L.V.; CASTRO, J.W.A.; COSTA, P.M.S.; ALVES, R.J.V. (Ed.) **Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo** (Volume II). Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2009. p. 283-300.
- PARSONS, K.M.; NOBLE, L.R.; REID, R.J.; THOMPSON, P.M. Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? **Biological Conservation**, v. 108, p. 175-182, 2002.

- PERRIN, W.F.; REILLY, S.B. Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae. In: PERRIN, W.F.; BROWNELL, R.L.; DEMASTER, D.P. (Ed.). **Reproduction in Whales, Dolphins and Porpoises**. Cambridge, 1984. p. 97-133.
- PERRIN, W.F.; THIELEKING, J.L.; WALKER, W.A.; ARCHER, F.I.; ROBERTSON, K.M. Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: cranial differentiation of coastal and offshore forms. **Marine Mammal Science**, v. 27, n. 4, p. 769-792, 2011.
- PINEDO, M.C.; ROSAS, F.C.; MARMONTEL, M. **Cetáceos e pinípedes do Brasil: Uma revisão dos registros e guia para identificação das espécies**. Manaus: UNEP/FUA, 1992.
- PRYOR, K.; LINDBERGH, J. A dolphin-human fishing cooperative in Brazil. **Marine Mammal Science**, v. 6, n. 1, p. 77-82, 1990.
- KEMPER, C.M. Osteological variation and taxonomic affinities of bottlenose dolphins, *Tursiops* spp., from South Australia. **Australian Journal of Zoology**, v. 52, n. 1, p. 29-48, 2004.
- READ, A.J. Abundance of bottlenose dolphins in the bays, sounds and estuaries of North Carolina. **Marine Mammal Science**, v. 19, p. 59-73, 2003.
- ROSEL, P.E.; HANSEN, L.; HOHN, A.A. Restricted dispersal in a continuously distributed marine species: common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 5030-5045, 2009.
- ROSS, G.J.B. **The smaller cetaceans of the south east coast of southern Africa. Annals of the Cape Provincial Museums (Natural History)**. South Africa: Grahamstown, 1984. p. 171-410.
- ROSS, G.J.B.; COCKCROFT, V.G. Comments on Australian bottlenose dolphins and the taxonomic status of *Tursiops aduncus* (Ehrenberg, 1832). In: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 101-128.
- SANINO, G.P.; VAN WAEREBEEK, K.; VAN BRESSEM, M.-F.; PASTENE, L.A. A preliminary note on population structure in eastern South Pacific common bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 7, n. 1, p. 65-70, 2005.
- SANTOS, M.C.O; SICILIANO, S.; VICENTE, A.F.C; ALVARENGA, F.S.; ZAMPIROLI, E.; SOUZA, S.P.; MARANHO, A. Cetaceans records along São Paulo state coast, Southerastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, p. 123-142, 2010.

- SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J.P. **Subtropical Convergence Environments: The coast and sea in the Southwestern Atlantic**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 1997.
- SERGEANT, D.E.; CALDWELL, D.K.; CALDWELL, M.C. Age, growth, and maturity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from Northeast Florida. **Journal Fisheries Research Board of Canada**, v. 30, n. 7, p. 1009-1011, 1973.
- SHANE, S.H. Behaviour and ecology of the bottlenose dolphin at Sanibel Island, Florida. In: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R. (Ed.) **The bottlenose dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 369-386.
- SILVA, M.A.; MAGALHÃES, S.; PRIETO, R.; SANTOS, R.S.; HAMMOND, P.S. Estimating survival and abundance in a bottlenose dolphin population taking into account transience and temporary emigration. **Marine Ecology Progress Series**, v. 392, p. 263-276, 2009.
- SICILIANO, S.; MORENO, I.B.; SILVA, É.D.E.; ALVES, V.C. **Baleias, botos e golfinhos na Bacia de Campos**. Rio de Janeiro: ENSP/FIOCRUZ, 2006.
- SICILIANO, S.; EMIM-LIMA, N.R.; COSTA, A.F.; RODRIGUES, A.L.F.; MAGALHÃES, F.A.; TOSI, C.H.; GARRI, R.G.; SILVA, C.R.; SILVA JR, J.S.E. Revisão de conhecimento sobre os mamíferos aquáticos da costa norte do Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 66, p. 381-401, 2008.
- SIMÕES-LOPES, P.C. Interaction of coastal populations of *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) with the mullet artisanal fisheries in Southern Brazil. **Biotemas**, v. 4, n. 2, p. 83-94, 1991.
- SIMÕES-LOPES, P.C. **Ecologia comportamental do delfim, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) durante as interações com a pesca artesanal de tainhas (*Mugil spp.*) no sul do Brasil**. 1995. Tese de Doutorado em Zoologia - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SIMÕES-LOPES, P.C. Offshore and coastal bottlenose dolphins on southern Brazil: preliminary comparisons on coloration. In: Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 7, 1996, Viña del Mar, Chile. **Anais da VII Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur**, 1996. p. 84.

- SIMÕES-LOPES, P.C.; DAURA-JORGE, F.G. **Os Parceiros da Sobrevivência: A interação entre botos e pescadores no sul do Brasil.** Florianópolis: Insular, 2008.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; FÁBIAN, M.E. Residence patterns and site fidelity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Montagu) (Cetacea, Delphinidae) off Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 4, p. 1017-1024, 1999.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; FÁBIAN, M.E.; MENEGHETI, J.O. Dolphins Interactions with the mullet artisanal fisheries on Southern Brazil: a qualitative and quantitative approach. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 709-726, 1998.
- SIMÕES-LOPES, P.C.; PAULA, G.S.; BOTH, M.C.; XAVIER, F.M.; SCARAMELLO, A.C. First case of lobomycosis in a bottlenose dolphin from southern Brazil. **Marine Mammal Science**, v. 9, n. 3, p. 329-331, 1993.
- TSAI; Y.J.; MANN, J. Dispersal, philopatry, and the role of fission-fusion dynamics in bottlenose dolphins. **Marine Mammal Science**, 2012. Published online. doi: 10.1111/j.1748-7692.2011.00559.x
- VAN WAEREBEEK, K.; REYES, J.C.; READ, A.J.; MCKINNON, J.S. Preliminary observations of bottlenose dolphins from the Pacific coast of South America. *In*: LEATHERWOOD, S.; REEVES, R.R. (Ed.). **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 101-128.
- WALKER, W.A. **Geographical Variation in Morphology and Biology of Bottlenose dolphins (Tursiops) in the Eastern North Pacific.** National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Center, 1981.
- WANG, J.W.; CHOU, L.S.; WHITE, B.N. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1603-1612, 1999.
- WANG, J.Y.; CHOU, L.-S.; WHITE, B.N. Osteological differences between two sympatric forms of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. **Journal of Zoology (London)**, v. 252, p. 147-162, 2000.
- WEDEKIN, L.L.; DAURA-JORGE, F.G.; ROSSI-SANTOS, M.R.; SIMÕES-LOPES, P.C. Notas sobre a distribuição, tamanho de grupo e comportamento do golfinho *Tursiops*

- truncatus* (Cetacea: Delphinidae) na Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 4, p. 225-229, 2008.
- WELLS, R.; SCOTT, M.D. Bottlenose dolphin – *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). In: RIDGWAY, S.H.; HARRISON, R. (Ed.) **Handbook of Marine Mammals**. San Diego: Academic Press, 1999. p.137-182.
- WÜRSIG, B.; WÜRSIG, M. Behavior and ecology of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in the South Atlantic. **Fishery Bulletin**, v. 77, n. 2, p. 399-412, 1979.
- ZAPPES, C.A; ANDRIOLO, A.; SIMÕES-LOPES, P.C.; DI BENEDITTO, A.P.M. ‘Human-dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) cooperative fishery’ and its influence on cast net fishing activities in Barra de Imbé/Tramandaí, Southern Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 54, p. 427-432, 2011.
- ZHANG, D-X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetics studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 563-584, 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Informações das amostras de *Tursiops truncatus* usadas nas análises de diversidade da região controladora de mtDNA e estrutura populacional. M: Macho; F: Fêmea; I: Indeterminado.

Amostra	Sexo	Comprimento total (cm)	Data de coleta	Latitude (S)	Longitude (W)	Localidade
LG001	M	I	04/05/11	28°25'47.66"	48°48'59.79"	
LG002	M	I	05/05/11	28°26'50.21"	48°50'04.55"	
LG003	M	I	05/05/11	28°25'23.84"	48°50'12.52"	
LG004	F	I	06/05/11	28°28'04.16"	48°50'32.23"	
LG005	M	I	06/05/11	28°28'00.42"	48°49'32.43"	
LG006	M	I	06/05/11	28°28'46.87"	48°49'22.36"	
LG007	M	I	06/05/11	28°26'45.72"	48°49'45.38"	
LG008	M	I	25/09/11	28°25'57.72"	48°50'29.25"	
LG009	M	I	27/09/11	28°30'09.41"	48°47'17.63"	
LG011	F	I	27/09/11	28°27'06.50"	48°50'27.82"	
MP001	M	I	05/10/11	29°19'32,5"	49°42'38,8"	
G0115	M	300	16/10/93	-	-	Litoral norte do RS
G0192	M	209	26/08/94	-	-	Jardim do Éden, Tramandaí/RS
G0203	M	224	10/09/94	-	-	51,5 km ao sul de Quintão, Palmares do Sul/RS
G0216	F	195	30/10/94	-	-	95 km ao sul de Tramandaí-Imbé/RS
G0286	F	271	25/10/95	-	-	Mariápolis – Osório/RS
G0292	I	195	28/10/95	-	-	70 km ao sul de Imbé-Tramandaí/RS
G0333	M	345	04/01/96	-	-	Torres/RS
G0400	I	I	28/01/97	31°20'13,9"	51°00'43,2"	
G0401	M	296	19/02/97	-	-	Farol de Quintão – Palmares do Sul/RS
G0503	M	290	16/01/98	-	-	Praia do Barco – Capão da Canoa/RS
G0569	M	I	30/12/98	30°28'56,7"	50°19'28,8"	
G0816	M	333	28/02/02	31°13'51,7"	50°53'03,9"	

G0820	M	299	28/03/02	-	-	Albatroz, Imbé/RS
G0861	M	>200	17/08/02	30°47'20"	50°32'19"	
G0916	M	266	20/12/02	30°25'32,6"	50°17'53,6"	
G0928	I	247	20/12/02	31°06'46,4"	50°46'13,7"	
G0934	M	232	22/01/03	31°17'38,8"	50°57'31,5"	
G1021	I	I	09/08/03	29°52'34"	50°04'21"	
G1050	M	333	10/09/03			Guarita 22, Imbé/RS
G1094	M	346	28/10/03	31°12'08,7"	50°51'19,2"	
G1165	M	I	25/02/04			Indeterminado
G1192	I	263	10/11/04	30°11'25,7"	50°12'26,3"	
G1235	F	312,5	19/09/05	30°02'18,6"	50°08'46,4"	
G1259	M	339	03/11/05			Barra de Imbé, Imbé/RS
G1260	F	232	06/12/05	29°53'29,3"	50°04'45,5"	
G1283	M	177	20/11/06			Mini-zôo, Balneário de Santa Terezinha – Imbé/RS
G1285	F	275	I			Indeterminado
G1337	M	326	23/10/09	30°35,582'	50°23,893'	
UFSC 1011	I	I	20/11/85	27°43'	48°30'	
UFSC 1299	I	I	31/03/01	26°17'	48°32'	
UFSC 1317	I	310	09/10/03	27°25'	48°23'	
UFSC 1349	F	295	05/01/07	27°44'	48°37'	
UFSC 1398	F	280	27/02/12	28°29'	48°45'	