

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**Variabilidade genética de golfinhos-  
rotadores (*Stenella longirostris*) a partir de  
marcadores microssatélites**

**Ana Paula Cazerta Farro**

Botucatu – SP  
2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**Variabilidade genética de golfinhos-  
rotadores (*Stenella longirostris*) a partir de  
marcadores microssatélites**

**Ana Paula Cazerta Farro**

Orientador: Celso Luís Marino

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Botucatu para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética.

Botucatu – SP  
2006

## *Dedicatória*

*Às pessoas que foram o início de tudo.  
Delas vieram as sementes.*

*Aos meus exemplos de vida com integridade e determinação.*

*Aos que sempre têm uma história para contar.*

*Aos que me fazem perceber a importância de cada dia em nossas vidas.*

*Aos que sempre têm um conselho para dar, não por arrogância, mas  
por experiência.*

*Aos que me transmitem a vontade de viver.*

*Aos que me fazem entender o mais profundo sentido da palavra  
“saúde”.*

*Aos que me mostram que o que vale é um sorriso e uma valsa.*

*A eles que tanto amo e que estarão sempre comigo,*

**Meus Avós**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Luís Marino pelo apoio, amizade e principalmente, por toda a confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Mário Manoel Rollo Jr. pela colaboração na idealização e desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. José Martins da Silva Jr., coordenador do Centro Golfinho Rotador, por todo apoio logístico e dedicação nos trabalhos de campo.

Ao IBAMA pelas licenças concedidas e auxílio logístico em Fernando de Noronha.

A todo o grupo do Centro Golfinho Rotador pela atenção e auxílio nas coletas.

À Dra. Marie-Anne Van Sluys do laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Depto. de Botânica do Instituto de Biologia da USP, São Paulo e Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos do laboratório do Depto. de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP, Jaboticabal, por permitirem a realização dos seqüenciamentos em seus laboratórios.

À Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE) por ceder amostras de *Stenella longirostris* e *Stenella clymene*.

À Dra. Marleide Magalhães de Andrade Lima pelo auxílio na quantificação das primeiras amostras de DNA extraídas em Fernando de Noronha e pelo envio do material necessário para que pudéssemos terminar nossa primeira coleta.

À Dra. Cristina Yumi Miyaki por aceitar ser fiel depositária das amostras de pele dos golfinhos-rotadores.

Aos Dr.s Edson Seizo Mori e Cláudio de Oliveira, pelos esclarecimentos prestados e, ao segundo, por também permitir o uso do programa Kodak.

Aos docentes do Departamento de Genética que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, em especial os professores: Dra. Adriane Pinto Wasko e Dr. Guaracy Tadeu Rocha.

Ao Dr. Marcelo Soares dos Santos pela ajuda nas análises estatísticas.

À Karina Alessandra Morelli e Edna Maria Zelandi por todo o auxílio e atenção.

Aos funcionários do Depto de Genética e da Seção de Pós-graduação.

A todos do Laboratório Biogen pela ajuda e companheirismo, em especial aos amigos Karina, Cristiane, Helena, Edgard, Rodrigo, Lígia, Gabriela, Evandro e Dudu (*in memoriam*).

À Tânia Mara Bortoloto por todo o auxílio e dedicação na última etapa deste projeto, pela amizade e momentos divertidos.

A minha querida Virgínia por sua amizade e carinho.

Aos amigos Fabiana, Miguel, Alessandra, Marcelo, Millena, Eduardo, Fábio, Mariana, Marcelo (Pi), Sandra, Daniela, Viviane, Flávia, Francine, Letícia, Sílvia, Mariana (Miss), por continuarem tão presentes em minha vida apesar da distância.

À Dona Elza Tozo Rodrigues por todo carinho e por ser alguém a quem sempre pude recorrer. À sua família por serem pessoas tão queridas.

Aos grandes amigos Anee e Osni pelo carinho e amizade.

À pequena Marília por fazer do seu sorriso uma alegria em meus dias.

Aos meus tios, tias, primos e primas por todo amor e compreensão nos momentos de minha ausência.

A minha prima e irmã Helen por tudo que já vivemos juntas e ainda viveremos.

Às famílias Braga e Rosa por me acolherem tão bem e também se tornarem parte da minha vida.

Ao meu noivo Gustavo pela ajuda, por todo amor, amizade e momentos tão especiais.

Aos meus amados irmãos pela amizade e paciência (principalmente no uso do computador na fase final de elaboração da tese), que farão parte de mim sempre!

E finalmente, aos meus pais, pessoas maravilhosas que possibilitaram tudo isso, me dando força para seguir em frente e me guiando para os melhores caminhos.

Amo vocês!!!

## Índice

Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	9
Lista de Abreviações e Siglas	12
Convenções encontradas no texto	14
Resumo	15
Summary	16
1. Introdução	17
2. Objetivos	20
3. Revisão Bibliográfica	21
3.1 – Golfinhos-rotadores	21
3.2 – Fernando de Noronha	24
3.3 – Marcadores moleculares microsatélites	27
4. Materiais e Métodos	31
4.1 – Material	31
4.2 – Métodos	32
4.2.1 – Coleta de pele	32
4.2.2 – Extração de DNA	41
4.2.3 – Quantificação do DNA	42
4.2.4 – Testes com as amostras extraídas com <i>Chelex</i>	42
4.2.5 – Certificação da espécie com primers de citocromo b	43
4.2.6 – Teste de digestão do DNA	46
4.2.7 – Construção de biblioteca genômica	46
4.2.8 – Sequenciamento	55
4.2.9 – Análise das seqüências e desenhos dos <i>primers</i> microsatélites	56
4.2.10 – Amplificação dos microsatélites	57
4.2.11 – Genotipagem da população	58
4.2.12 – Sexagem via PCR	59
4.2.13 – Identificação de indivíduos re-amostrados	60
4.2.14 – Análises estatísticas	60
5. Resultados	63
5.1 – Trabalho de campo	63
5.2 – Extração do DNA genômico	65
5.3 – Quantificação do DNA	66
5.4 – Teste com as amostras extraídas com <i>Chelex</i>	66
5.5 – Certificação da espécie	67
5.6 – Construção das bibliotecas genômicas	70
5.7 – Análise das seqüências e desenho dos <i>primers</i>	71
5.8 – Teste de amplificação dos <i>primers</i>	74
5.9 – Genotipagem dos golfinhos-rotadores	74
5.10 – Sexagem	76
5.11 – Exclusão das amostras idênticas	77
5.12 – Análises estatísticas	77
5.13 – Amplificação dos microsatélites em outras espécies	94
6. Discussão	95
7. Conclusões	106
8. Referências bibliográficas	107
Anexo	117

---

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>1</b> Golfinho-rotador ( <i>Stenella longirostris longirostris</i> ).	<b>22</b>
<b>2</b> Baía dos Golfinhos, Mar de Dentro do Arquipélago de Fernando de Noronha, PE.	<b>26</b>
<b>3</b> Mapa de Fernando de Noronha com os limites do Parque Nacional Marinho.	<b>33</b>
<b>4</b> Localização dos pontos de amostragem de pele dos golfinhos-rotadores.	<b>34</b>
<b>5</b> Peças (esponja abrasiva autoclavada, cabo de madeira encapado com dedo de luva de látex e presilha plástica) para montagem do amostrador utilizado na raspagem de pele dos golfinhos.	<b>35</b>
<b>6</b> Pesquisador deitado à frente do barco inflável e o golfinho se aproximando da embarcação. A seta vermelha indica o amostrador na mão do pesquisador e a seta azul a nadadeira exposta do animal.	<b>37</b>
<b>7</b> Esponja fixada no cabo de madeira (amostrador) contendo amostra de pele de golfinho, classificada como (++) .	<b>37</b>
<b>8</b> Golfinho-rotador com marca natural evidente na nadadeira dorsal (seta branca) amostrado em 2004.	<b>64</b>
<b>9</b> Fragmentos RAPD amplificados nas amostras extraídas com o <i>Genomic Prep Cells and Tissues DNA Isolation Kit</i> (14 e 30) e com resina <i>Chelex</i> (48 e 59). Na primeira coluna está o <i>ladder</i> 100bp.	<b>67</b>

- 
- 10** Fragmentos em torno de 460 bp amplificados a partir de *primers* de citocromo b em amostras de *Pseudorca crassidens* (Pc) e *Stenella longirostris* (Sl) em diferentes concentrações de DNA (15, 25 e 50ng), visualizados em gel de agarose 1%. Ao lado das amostras estão o ladder e um controle (C). **68**
- 11** Fragmentos de 460 bp amplificados a partir de *primers* de citocromo b em amostra de músculo de golfinho (G1) e amostra de pele extraída com chelex, visualizados em gel de agarose 1%. Ao lado das amostras estão o ladder 100bp e um controle (C). **69**
- 12** Fragmentos amplificados com os *primers* M13 em 22 clones. A seta branca indica o fragmento de 500 bp. Coluna 1 = Ladder 100 bp. **71**
- 13** Fragmentos microssatélites amplificados em 13 indivíduos coletados em 2006 (coleta b) a partir do par de *primer* do loco Slo15. Coluna 6 = *ladder* 10bp. **75**
- 14** Fragmentos de aproximadamente 339 bp e 382 bp amplificados nas reações de sexagem de cinco golfinhos-rotadores. A presença das duas bandas ocorre nos machos e a presença de uma banda nas fêmeas. Na 1a coluna está apresentado o *ladder* 100 bp. A amplificação do indivíduo 42 falhou. **76**
- 15** Freqüências alélicas para cada loco microssatélite encontradas na análise temporal. **81-82**
- 16** Freqüências alélicas para cada loco microssatélite encontradas na análise espacial, que inclui três grupos: Entre Ilhas, Porto e Praias. **87-88**
- 17** Freqüências alélicas para cada loco microssatélite encontradas na análise intrapopulacional. **92-93**



## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>1</b> Número de amostras obtidas nas coletas realizadas em 2004 (A) e 2006 (B).	<b>63</b>
<b>2</b> Número de amostras extraídas para cada método com suas respectivas faixas de concentração de DNA obtidas (ng).	<b>66</b>
<b>3</b> Valores de <i>gi</i> , <i>score</i> e <i>e-value</i> apresentados na comparação realizada no GENBANK para quatro amostras de delfínideos.	<b>70</b>
<b>4</b> <i>Loci</i> microssatélites desenhados para a espécie <i>Stenella longirostris</i> com seus respectivos alelos e graus de heterozigosidade.	<b>73</b>
<b>5</b> <i>Loci</i> microssatélites avaliados com seu respectivo número de alelos, faixa de tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento ideal e PIC.	<b>75</b>
<b>6</b> Valores da diversidade dentro dos grupos (FIS), diversidade entre os grupos de golfinhos (FST e RST) e o número de migrantes para os cinco loci avaliados na análise temporal. FST (Nei, 1987); RST (Michalakis & Excoffier, 1996).	<b>79</b>
<b>7</b> Heterozigosidades observada e esperada determinadas segundo Levene (1949) na análise temporal, que inclui o grupo A (animais amostrados em 2004) e o grupo B (animais coletados em 2006). EHW = probabilidade de máxima verossimilhança para $P < 0,05$ .	<b>79</b>

- 
- 8** Número de alelos observado ( $n_a$ ), número de alelos efetivo ( $n_e$ ) (Kimura & Crow, 1964), Índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e riqueza alélica (RA) determinados para loco microssatélite na análise temporal dos grupos de golfinhos-rotadores. DP= Desvio Padrão. **80**
- 9** Alelos privados para os grupos A (coleta de 2004) e B (coleta de 2006) determinados na avaliação temporal. **80**
- 10** Valores da diversidade dentro dos grupos ( $F_{IS}$ ), diversidade entre os grupos de golfinhos ( $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) e o número de migrantes para os seis *loci* avaliados na análise espacial.  $F_{ST}$  (Nei, 1987);  $R_{ST}$  (Michalakis & Excoffier, 1996). **84**
- 11** Identidade e distância genética entre os grupos avaliados na análise espacial para os diferentes pontos de coleta. A = Entre Ilhas; B = Porto; C = Praias. Valores segundo Nei (1978). **84**
- 12** Heterozigosidades observada e esperada determinadas segundo Levene (1949) na análise espacial, que inclui os grupos A, B e C (animais coletados nas áreas determinadas como Entre Ilhas, Porto e Praias), respectivamente. **85**
- 13** Número de alelos observado ( $n_a$ ), número de alelos efetivo ( $n_e$ ) (Kimura & Crow, 1964) Índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e riqueza alélica (RA) determinados para loco microssatélite na análise temporal dos grupos de golfinhos-rotadores. DP= Desvio Padrão. **85**
- 14** Alelos privados para os grupos de animais coletados nos pontos A, B e C, que correspondem aos animais coletados nas áreas determinadas como Entre Ilhas, Porto e Praias), respectivamente. **86**
- 15** Heterozigosidades observada e esperada determinadas segundo Levene (1949), e o índice de endogamia (FIS) para os golfinhos-rotadores na análise intrapopulacional. **90**

- 16** Teste de neutralidade (Manly, 1985) para os *loci* microsatélites na análise intrapopulacional. **90**
- 17** Número de alelos observado ( $n_a$ ), número de alelos efetivo ( $n_e$ ) (Kimura & Crow, 1964) Índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e riqueza alélica (RA) determinados para loco microsatélite na análise temporal dos grupos de golfinhos-rotadores. DP= Desvio Padrão. **91**
- 18** Amplificação dos *loci* microsatélites em outras espécies de cetáceos. (+) = amplificação; (-) = não amplificação. **94**

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- % - Porcentagem  
 $\alpha$  - Alfa  
 $\beta$  - Beta  
 $^{\circ}$  - Graus Celsius  
 $\mu$  - Mi  
 $\chi$  - Qui  
 $^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius  
 $\mu\text{g}$  - Microgramas  
 $\mu\text{l}$  - Microlitros  
 $\mu\text{M}$  - Micromolar  
 A - Adenina  
 $\text{AgNO}_3$  - Nitrato de Prata  
 AluI - Enzima de restrição isolada de *Arthrobacter luteus*  
 bp - Par de base  
 BSA - *Bovine Albumin Fraction V*  
 C - Citosina  
 CG - Meio de Cultura *Circle Grow*  
 cm - Centímetro  
 $\text{DH5}\alpha$  - Células competentes  
 DMSO - Dimetilsulfóxido  
 DNA - Ácido Desoxirribonucléico, do inglês *Desoxiribonucleic Acid*  
 dNTP - Desoxiribonucleotídeo (A, G, C, ou T)  
 EDTA - Ácido Etilenoaminotetracético  
 EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg  
 $F_{\text{is}}$  - Coeficiente de Endogamia  
 $F_{\text{st}}$  - Índice de diferenciação entre grupos  
 G - Guanina  
 GTE - Glicose, EDTA, Tris  
 h - Horas  
 HCl - Ácido Clorídrico  
 HP - Cavalos, do inglês *Horse Power*  
 IAM - Modelo de Alelos Infinitos, do inglês *Infinite Allele Model*  
 IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
 IPTG - Isopropil tiogalactosídeo  
 Kg - Quilogramas  
 Km - Quilômetros  
 $\text{Km}^2$  - Quilômetros quadrados  
 KOAc - Acetato de Potássio  
 L - Litros  
*LacZ* - Região do genoma do plasmídeo responsável pela produção de  $\beta$ -Galactosidase.  
*MboI* - Endonuclease isolada de *Moraxella bovis* M.  
 $\text{MgCl}_2$  - Cloreto de Magnésio  
 m - Metros  
 min - Minutos  
 mL - Mililitro  
 mm - milímetros

mm<sup>3</sup> – milímetros cúbicos  
mM - Milimolar  
mtDNA – DNA mitocondrial  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
Ng – Nanogramas  
pb – Pares de bases  
PA – Persulfato de Amônio  
PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*  
PIC – Conteúdo Informativo de Polimorfismo, do inglês *Polimorphism Informative Content*  
PO<sub>4</sub> – Fosfato  
RAPD – Polimorfismo de fragmentos de DNA de amplificação randômica, do inglês *Random Amplified Polimorphic DNA*  
RNAse – Enzima que degrada o Ácido Ribonucléico  
rpm – Rotações por minuto  
s – Segundos  
S - Sul  
*Sau3AI* – Endonuclease isolada da cepa 3A de *Staphilococcus aureus*  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês: *Sodium Dodecyl Sulfate*  
SMM – Modelo de Mutação Passo-a-passo, do inglês *Stepwise Mutation Model*  
SSC – Solução Padrão de Citrato Salino, do inglês *Standard Saline Citrate*  
SSR – Repetições de Seqüências Simples, do inglês *Simple Sequences Repetition*  
T – Timina  
Taq – Enzima termoestável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*  
TBE – Solução tampão constituída de Tris, Ácido Bórico e EDTA  
TC – Tampão de Carregamento  
TEMED – Tetrametiletetilenodiamino  
TPM – Modelo Bifásico, do inglês *Two Phase Model*  
u – unidade  
UV – luz ultravioleta  
v – Versão  
V - Volts  
W – Oeste, do inglês *West*  
X-GAL – 5 bromo-4 cloro-3 indolyl-β-D-galactoside

## CONVENÇÕES ENCONTRADAS NO TEXTO

*Bootstrapping* – Reamostragens randômicas repetidas (com reposição) da amostra original realizadas nas análises estatísticas

*Crossing over* – Troca de segmentos entre cromátides

*Eppendorf* – microtubos de polipropileno (nome da empresa fornecedora)

H<sub>2</sub>O MiliQ – Água ultra pura (deionizada e dessalinizada)

*Ladder* – Escala molecular utilizada para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA ou RNA

*Loci* – Do Latim, plural de *Loco*, que se refere a uma dada região genômica

*Overnight* – Termo empregado para determinar o período da noite

*Primers* – Oligonucleotídeos iniciadores

*Spin* – Centrifugação rápida na qual após a rotação atingir aproximadamente 1000 rpm o processo é interrompido

*Vortex* – aparelho utilizado para homogeneização de soluções em alta velocidade

---

**RESUMO**

A utilização de marcadores microssatélites tem facilitado a compreensão de questões relevantes para a conservação de espécies animais. No entanto, para a maioria dos cetáceos, como os golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*), não existem microssatélites desenvolvidos e disponíveis na literatura. Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram desenvolver microssatélites para *S. longirostris* e estudar a dinâmica populacional de golfinhos-rotadores do Arquipélago Fernando de Noronha. O enriquecimento dos microssatélites foi realizado com oligonucleotídeos biotinilados e partículas magnéticas envoltas por estreptavidina. Para a análise populacional foram coletadas amostras de tecido epidérmico por método de raspagem. Três análises estatísticas foram realizadas, duas delas testando uma possível estruturação da população (análise temporal e espacial) e uma determinando sua diversidade genética. Vinte e quatro pares de *primers* microssatélites foram desenhados, sendo que, destes, 17 foram confeccionados e testados. Nove *loci* foram avaliados em 102 indivíduos. O número de alelos variou de quatro a dez. Verificou-se que os indivíduos amostrados no Arquipélago fazem parte de uma única população, ou seja, que não existem diferenças estatísticas significativas que separem os golfinhos amostrados nas diferentes estações do ano ou nos diferentes pontos de coleta. Na análise de diversidade foi verificada uma baixa heterozigosidade média observada e um alto coeficiente médio de endogamia. Nove dos 11 microssatélites amplificados em *Stenella longirostris* também amplificaram para três outras espécies de delfínidos, *S. clymene*, *Sotalia guianensis* e *Pseudorca crassidens*.

## SUMMARY

The use of microsatellite molecular markers has given an important support for the comprehension of relevant issues in animal conservation. However, most of the cetacean's species, as spinner dolphins (*Stenella longirostris*), do not have specific microsatellites developed and available in literature. Thus, the aims of this project were to develop microsatellites for *Stenella longirostris* and study the population dynamics of the species at Fernando de Noronha Archipelago. Enrichment of the microsatellites was done with biotinylated oligonucleotides and streptavidin-coated magnetic particles. Tissue samples from Fernando de Noronha's dolphins were obtained *in situ* using a skin swabbing method. Three statistic analyses were performed testing a possible population structure (temporal and special analyses) and assessing its genetic diversity. Twenty-four microsatellite primers were designed and 17 of these were developed and tested. Samples of 102 individuals were evaluated for nine *loci*. The number of alleles varied from four to ten. All individuals sampled belonged to a unique population, since no significantly differentiation was detected between the two seasons and the different sampling areas. Concerning the diversity analysis, a low average observed heterozigosity was obtained and a high average endogamy coefficient. Nine from the 11 microsatellite amplified for *S. longirostris* also amplified for three other delphinid species, *S. clymene*, *Sotalia guianensis* and *Pseudorca crassidens*.



## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Stenella longirostris*, comumente conhecida como golfinho-rotador, é encontrada essencialmente em águas tropicais e subtropicais do globo (PERRIN & GILPATRICK JR., 1994). Sua distribuição é ainda pouco conhecida no Oceano Atlântico, principalmente ao longo das costas da América do Sul e África (PERRIN & GILPATRICK JR., *op. cit.*). No Brasil, a espécie já foi observada ao longo dos litorais dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, bem como na região Nordeste (SECCHI & SICILIANO, 1995; ZERBINI *et al.*, 1996 Apud FURTADO-NETO *et al.*, 1998). De acordo com MORENO *et al.* (2005), a distribuição da espécie abrange quase toda a extensão do litoral brasileiro, atingindo 30°S.

*S. longirostris* é uma espécie pouco estudada no Brasil, porém, tem recebido atenção especial no Arquipélago de Fernando de Noronha, que é considerado refúgio natural de golfinhos-rotadores. Neste local, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas com relação à ecologia comportamental e interações com outras espécies (SILVA JR., 1996, SAZIMA *et al.*, 2002, SILVA JR., 2005). No entanto, apenas um estudo brasileiro de caráter genético para os golfinhos-rotadores pode ser citado (Furtado-Neto *et al.*, 1998); neste é relatada a identificação molecular de uma carcaça de golfinho encontrada encalhado no Sul da Bahia e que foi identificada como *S. longirostris*.

De modo geral, poucos estudos foram desenvolvidos com cetáceos no Brasil (OTT *et al.*, 2001). Porém, para que se possam definir estratégias adequadas de proteção e manejo de populações de animais silvestres é de suma importância um bom conhecimento da biologia básica das espécies-alvo, incluindo o grau de variabilidade genética, bem como os aspectos

espaciais e temporais da estrutura populacional intraespecífica (DIZON *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, a utilização de métodos moleculares em estudos de padrões de variação genética tem auxiliado os programas de conservação, não somente indicando quais espécies merecem maiores esforços de preservação, mas também contribuindo no delineamento da viabilidade de uma população natural (JOHNSON *et al.*, 2001).

Os estudos moleculares de cetáceos desenvolvidos nos últimos anos têm envolvido principalmente os seguintes elementos: a) estrutura populacional (PASTENE *et al.*, 1997; BROWN GLADDEN *et al.*, 1999); b) relações filogenéticas e taxonômicas (WADA & NUMACHI, 1991; WANG *et al.*, 1999; YOSHIDA & KATO, 1999; ROSENBAUM *et al.*, 2000; GALES *et al.*, 2002); c) identificação de espécies (BAKER & PALUMBI, 1996; FURTADO-NETO *et al.*, 1998; CUNHA *et al.*, 2005); d) monitoramento de pesca predatória (PALUMBI & CIPRIANO, 1998; BAKER *et al.*, 2000).

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos populacionais. Dentre estes, os microssatélites se destacam, pois são codominantes e possuem um grande número de alelos (BUCHANAN *et al.*, 1996). Além disso, os microssatélites apresentam uma ampla distribuição no genoma e podem ser identificados eficazmente, representando assim uma boa alternativa em estudos de variabilidade genética de populações.

Alguns microssatélites já foram desenvolvidos para algumas espécies de cetáceos (BUCHANAN *et al.*, 1996; ROSEL *et al.*, 1999; WALDICK *et al.*, 1999; KRÜTZEN *et al.*, 2001; CALDWELL *et al.*, 2002). No entanto, a disponibilidade de microssatélites para o grupo em questão ainda é restrita e nenhum microssatélite foi descrito especificamente para *S. longirostris*. Para

este gênero existe apenas um trabalho de caracterização de microssatélites para a espécie *Stenella coeruleoalba* (MIRIMIN *et al.*, 2006).

*Primers* heterólogos são marcadores desenvolvidos para determinada espécie, mas que funcionam adequadamente em espécies filogeneticamente próximas. A utilização destes marcadores é uma alternativa para a falta de *primers* da espécie a ser estudada. Em alguns casos, entretanto, o uso destes pode levar a uma redução no número de *loci* polimórficos e presença de alelos nulos (não amplificados devido a mutações nas regiões flanqueadoras) (DAKIN & AVISE, 2004).

WALDICK *et al.* (2002) testaram 27 *primers* em um estudo populacional de baleias-francas (*Eubalaena glacialis*), sendo que destes marcadores 13 haviam sido previamente desenvolvidos para a espécie em estudo e 14 heterólogos. Os pesquisadores verificaram que todos os *primers* testados para a espécie foram polimórficos. Já entre os heterólogos, 11 dos 14 não amplificaram. Estudos com outros grupos de vertebrados, como aves, também demonstram a dificuldade de se amplificar *primers* heterólogos, principalmente quando existe uma distância considerável entre os táxons em questão (FARIA & MIYAKI, 2006).

Outra questão que pode levar a certa dificuldade de identificação de *primers* heterólogos para estudos de delfinídeos é o fato de a filogenia deste grupo não estar completamente esclarecida. Em se tratando de *Stenella longirostris*, para o uso de heterólogos, teriam que ser utilizados *primers* de espécies que não estão incluídas no mesmo gênero, já que microssatélites pertinentes para este só foram publicados no ano de 2006. Assim, para espécies como *S. longirostris* a utilização de *primers*

microssatélites espécie-específicos pode ser a melhor opção para análise populacional.

## **2 - OBJETIVOS**

- Desenvolver marcadores microssatélites para a espécie *Stenella longirostris*;
  
- Estudar a dinâmica populacional de golfinhos-rotadores do Arquipélago Fernando de Noronha.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - Golfinhos-rotadores

Golfinho-rotador é o nome comum para a espécie *Stenella longirostris* (GRAY, 1828) pertencente à ordem Cetácea, subordem Odontoceti, família Delphinidae. A denominação “golfinho-rotador” se deve ao comportamento aéreo marcante destes animais, caracterizado por saltos e rotações em torno do próprio eixo corporal.

*S. longirostris* está representada por quatro subespécies: *S. l. longirostris*, pantropical oceânica; *S. l. orientalis*, águas oceânicas tropicais e costeiras do México no Oceano Pacífico Leste; *S. l. centroamericana*, águas costeiras do Pacífico na América Central; *S. l. roseiventris*, águas do oeste da Indonésia, Sul da China e Golfo da Tailândia (PERRIN, 1990; PERRIN *et al.*, 1999).

Os golfinhos-rotadores são cetáceos de porte pequeno, com comprimento e peso máximos registrados de 2,3 m e 87 kg, respectivamente. Seu padrão de coloração consiste em um gradiente de tons de cinza, mais escuro no dorso, clareando em direção ao ventre. Dependendo da população considerada, pode haver uma faixa de coloração negra que se estende da região dos olhos até a base da nadadeira peitoral. Esse padrão é encontrado nos golfinhos-rotadores do oeste do Pacífico e Oceanos Índico e Atlântico, que caracterizam a subespécie *Stenella longirostris longirostris* (Figura 1), na qual estão inseridos os golfinhos de Fernando de Noronha (PERRIN *et al.*, 1991; PERRIN, 1998).



**Figura 1** – Golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris longirostris*).

Os golfinhos-rotadores vivem em grupos fluidos, considerando-se a composição de sub-grupos, ou seja, não apresentam uma conformação fixa. Os animais alternam entre os grupos de maneira dinâmica, o que leva à formação de agrupamentos de tamanhos variáveis. Segundo NORRIS & DOHL (1980), certa segregação por idade e sexo entre os grupos de *S. longirostris* pode ocorrer, com uma concentração de indivíduos mais vulneráveis (fêmeas, jovens e filhotes) no centro e de indivíduos maiores (geralmente machos) na periferia do grupo.

O período de gestação da espécie é de cerca de 10 meses com um intervalo de aproximadamente três anos entre os nascimentos. As fêmeas atingem a maturidade sexual com quatro a sete anos de idade em média, já os machos atingem a maturidade sexual entre sete e dez anos (PERRIN, 1998). O sistema de acasalamento é promíscuo, sendo múltiplos os acasalamentos de machos com a mesma fêmea.

A idade máxima que os golfinhos-rotadores podem atingir é de 20 anos (NORRIS & DOHL, 1980). Seus principais predadores de golfinhos-rotadores são tubarões, orcas (*Orcinus orca*), falsas orcas (*Pseudorca crassidens*) e baleias piloto (*Globicephala* spp.) (NORRIS *et al.*, 1985, PERRIN e GILPATRICK JR., 1994).

O movimento desta espécie ainda não está precisamente determinado. Após um estudo de captura e recaptura de animais das espécies *S. l. longirostris* e *S. l. orientalis*, marcados no Pacífico Leste, pesquisadores sugerem que o deslocamento destes animais varia de 300 a 700 km (MARTIN, 1990).

Os golfinhos-rotadores estão usualmente associados a águas calmas: ilhas ou bancos (PERRIN, 1998). Seu habitat é denominado de águas tropicais de superfície e caracteriza-se por apresentar a mistura de camadas de águas superficiais, com pequena variação anual da temperatura, em locais onde baixas e altas profundidades estão próximas (PERRIN & GILPATRICK JR., 1994).

### **3.2 – Fernando de Noronha**

O arquipélago de Fernando de Noronha situa-se a quatro graus abaixo da linha do Equador, localizando-se a 3° 54' S de latitude e 32° 25' W de longitude. Pertence ao estado de Pernambuco e dista 545 km de Recife e 345 km do Cabo de São Roque no Rio Grande do Norte.

O Arquipélago é composto por 21 ilhas, com uma área total de 26 km<sup>2</sup>, apresentando uma única ilha habitada, cujo nome é o mesmo do Arquipélago. A Ilha Fernando de Noronha possui 17 km<sup>2</sup> distribuídos longitudinalmente na direção sudoeste-nordeste, formando duas faces com 11 km de extensão. A face noroeste, denominada de Mar de Dentro, está voltada para o continente brasileiro e fica protegida dos ventos predominantes. A face sudeste, Mar de Fora, está voltada para o continente africano e apresenta mar mais agitado.

No Arquipélago é encontrado um clima tropical com duas estações pluviométricas bem definidas: período seco, de agosto a janeiro, quando a pluviosidade não ultrapassa oito mm<sup>3</sup>/dia; e período chuvoso, de fevereiro a julho, quando a pluviosidade pode atingir 193,3 mm<sup>3</sup>/dia. Predominam os ventos alísios de sudeste e leste (COSTA, 1991).



Fernando de Noronha é formado pelos topos das montanhas de uma cordilheira de origem vulcânica, com sua base localizada há cerca de 4.000 metros de profundidade: a Dorsa Mediana do Atlântico.

O Arquipélago apresenta águas com alta salinidade, baixas concentrações de sedimentos e alta transparência, com extinção de luz a 87 m da superfície (COSTA, 1991). A área é considerada um dos sítios reprodutivos oceânicos mais importantes do Atlântico.

Quase todo o litoral da Ilha é rochoso e escarpado, principalmente na face sudeste e na extremidade oeste da face noroeste, onde se localiza a Baía dos Golfinhos.

A Baía é a principal área de concentração da espécie *Stenella longirostris* e apresenta as águas mais calmas, transparentes e profundas do Arquipélago. Com profundidade de 0 a 25 m, a Baía está localizada no Mar de Dentro e apresenta encostas íngremes, sem praias de areia, com as águas chegando diretamente no penhasco (Figura 2).

Os golfinhos-rotadores em Noronha permanecem na Baía grande parte do dia, descansando e realizando comportamentos sociais, como acasalamento, amamentação, "brincadeiras" entre outros. No fim do dia os golfinhos voltam para águas mais profundas, onde se alimentam à noite de peixes, lulas e camarões. Além dos comportamentos sociais acredita-se que os golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha, permanecendo durante todo o dia na Baía ou próximo à costa do Arquipélago, estariam se protegendo em águas rasas dos seus predadores naturais (SILVA JR., 1996).



*José Martins*

**Figura 2** – Baía dos Golfinhos, localizada no Mar de Dentro do Arquipélago Fernando de Noronha, PE.

Devido ao grande número de turistas na ilha, é efetuado um rígido controle na enseada dos golfinhos quanto à presença de embarcações, de pessoas e de qualquer tipo de atividade que possa perturbar os golfinhos, seguindo as normas da Portaria nº 05 de 25 de Janeiro de 1995, anexada ao Decreto nº 78, de 05 de abril de 1991 – IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Além dessas normas que protegem diretamente os golfinhos, o Arquipélago é quase inteiramente uma unidade de conservação, graças à implantação da Área de Proteção Ambiental (APA) de Fernando de Noronha, criada em 1986, e do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha, PARNAMAR - FN, criado em 1988.

A área total do Parque é de 11.270 hectares, sendo 85% no mar. Os 15% terrestres correspondem a aproximadamente 65% das terras do Arquipélago. Os restantes 35% do território estão na Ilha de Fernando de Noronha e constituem a APA de Fernando de Noronha.

### **3.3 – Marcadores moleculares microssatélites**

Marcadores moleculares consistem em regiões do genoma ou segmentos específicos de DNA que podem ou não fazer parte de um gene. As vantagens destes marcadores são: possuem um alto nível de polimorfismo; serem geralmente neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico; em geral, serem codominantes, promovendo uma maior quantidade de informação genética por loco; serem utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de pequenas amostras de células ou tecidos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são regiões que apresentam seqüências simples repetidas lado a lado, que podem apresentar de uma a seis bases em sua estrutura. O SSR é um marcador codominante que pode apresentar um alto grau de polimorfismo, identificando diversos alelos (VOWLES & AMOS, 2004).

Os microssatélites mais comuns são os dinucleotídeos (repetições de duas bases), seguidos pelos mononucleotídeos e tetranucleotídeos, sendo menos abundantes os trinucleotídeos. Para mamíferos, os dinucleotídeos mais comuns são os com repetições de bases  $(AC)_n$  e em plantas aqueles com repetições  $(AT)_n$  (ELLEGREN, 2004).

Quanto a sua estrutura os microsatélites podem ser: perfeitos ou puros, quando não apresentam nenhuma interrupção em sua seqüência de repetição (ex.: CACACACACACACA); interrompidos, quando possuem um par de bases ou uma pequena seqüência interrompendo a série de repetição (ex.: CACACACACATGCTCACACA); compostos, quando apresentam duas seqüências de repetições distintas lado a lado (ex.: CACACACACACAGAGAGAGAGA).

Estes marcadores podem estar presentes tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras, sendo encontrados tanto em organismos eucariontes quanto em procariontes (ZANE et al., 2002) No genoma humano eles podem representar 3% do genoma total e uma proporção ainda maior no caso de outros mamíferos, tais como os roedores. A abundância dos microsatélites nos animais tende a apresentar uma correlação positiva com o tamanho do genoma, o que não ocorre com as plantas. Essas contrastantes distribuições das repetições de microsatélites nos diferentes genomas indicam que deve existir uma variação interespecífica nos mecanismos de mutação ou reparo destas repetições específicas (ELLEGREN, 2004).

As taxas de mutação de microsatélites são consideradas altas e dois processos têm sido sugeridos para explicá-las. O primeiro está baseado na recombinação entre as moléculas de DNA que estaria alterando o tamanho dos microsatélites por *crossing-over* desigual ou conversão gênica. O segundo baseia-se no mecanismo de deslize (*slippage*), que envolve a dissociação momentânea das fitas de DNA durante a replicação e um erro no realinhamento devido às repetições presentes na fita a ser replicada *in vivo* ou *in vitro* com o deslize da *Taq* DNA polimerase no PCR (OLIVEIRA, 2006).

Com relação à origem e evolução dos *loci* microssatélites ainda pouco se sabe. No entanto, alguns modelos de mutação são adotados quando se analisam *loci* microssatélites em estudos populacionais. Estes modelos são principalmente: o Modelo de Alelos infinitos (IAM – *Infinite Allele Model*), o Modelo de Mutação Escalonada ou Passo-a-passo (SMM – *Stepwise Mutation Model*) e o Modelo de Duas Fases (*Two Phase Model*). O modelo SMM é o mais utilizado para explicar as características evolutivas dos microssatélites. Ele sugere que o ganho e a perda de unidades de repetição se dão em igual probabilidade (taxa fixa) e admite uma simetria no processo, independentemente do tamanho da repetição. Por isso, dois alelos que diferem em somente uma repetição são mais relacionados (dividem um ancestral comum) do que aqueles que diferem em mais repetições. O modelo IAM prediz que o processo de mutação dos microssatélites envolve qualquer número de repetições lado a lado e que cada mutação sempre resulta em um alelo novo. A proximidade em relação ao número de repetições não indica uma forte relação filogenética. O modelo TPM surgiu como uma extensão do SMM e postula que diversos eventos mutacionais resultam em um aumento ou diminuição de uma unidade de repetição, embora também ocorram alterações de um grande número de repetições, ainda que menos freqüentemente (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Alguns pesquisadores indicam este modelo como o mais realístico entre todos os que são empregados para as análises de *loci* microssatélites, visto que a dinâmica evolutiva difere entre *loci* e principalmente entre espécies (ESTOUP *et al.*, 2002).

Nota-se que as propriedades mutacionais e evolutivas dos microssatélites ainda não estão completamente esclarecidas dos microssatélites e um profundo entendimento a esse respeito torna-se

necessário não somente para a compreensão de como o genoma é organizado, mas também para o uso e interpretação correta dos dados microssatélites (ELLEGREN, 2004). Apesar das dúvidas que envolvem a origem e evolução dos microssatélites, o fato destes marcadores serem altamente polimórficos e gerarem uma grande quantidade de dados fez com que se tornassem ótimas ferramentas em estudos genéticos, principalmente em estudos populacionais e análises forenses (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O uso dos microssatélites se deu graças à reação da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction), desenvolvida por SAIKI *et al.* (1985) e MULLIS & FALOONA (1987), que abriu caminho para BECKMANN & SOLLER (1990) desenvolverem a técnica que envolve estes marcadores. Nesta técnica, as regiões contendo seqüências simples repetidas são amplificadas individualmente através de PCR, utilizando-se um par de “*primers*” específicos (de 20 a 30 bases) complementares às seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite.

Uma das dificuldades enfrentadas para se trabalhar com microssatélites é a falta de marcadores espécie-específicos para a maioria das espécies. A necessidade de se construir estes marcadores específicos deve-se a determinados fatores. Além daqueles já citados na introdução, um outro é o fato de os microssatélites serem normalmente encontrados em regiões não codificadoras, nas quais a taxa de substituição dos nucleotídeos é maior que em regiões codificadoras, o que interfere na estratégia de se desenhar *primers* universais (ZANE *et al.*, 2002). Assim, além da seleção de *primers* heterólogos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de se desenvolver microssatélites para as mais diferentes espécies: *Gastrodia elata*, planta medicinal (XU *et al.*, 2006); *Carcinus maenas*, caranguejo

(TEPOLT *et al.*, 2006); *Carcharhinus tilstoni* e *C. Sorrah*, tubarões (OVENDEN *et al.*, 2006); *Eudocimus ruber*, ave (SANTOS *et al.*, 2006), entre outros. Em cetáceos, estudos recentes também envolveram esta questão (ROSEL *et al.*, 2005; COUGHLAN *et al.*, 2006; MIRIMIN *et al.*, 2006). A maior disponibilidade de microssatélites para espécies de cetáceos provavelmente auxiliou o aumento no número de estudos populacionais destes animais nos últimos anos (BROWN GLADDEN *et al.*, 1999; ROONEY *et al.*, 1999; WALDICK *et al.*, 2002; ESCORZA-TREVINO *et al.*, 2005; ADAMS & ROSEL, 2006; POMILLA & ROSENBAUM, 2006).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 – MATERIAL**

Nas diferentes etapas do projeto foi utilizado tecido muscular e epidérmico de golfinhos-rotadores.

Para a construção das bibliotecas genômicas utilizou-se tecido muscular de um golfinho-rotador encontrado encalhado em Fernando de Noronha, visto que, para este procedimento, é necessário DNA em grande quantidade e de boa qualidade. Duas amostras fixadas em álcool 70% foram enviadas pelo coordenador do Centro Golfinho Rotador, cuja sede é em Noronha.

Tecido epidérmico foi utilizado para avaliação dos *primers* microssatélites e determinação da diversidade dos golfinhos-rotadores de Noronha.

## **4.2 – MÉTODOS**

### **4.2.1 – Coleta de pele**

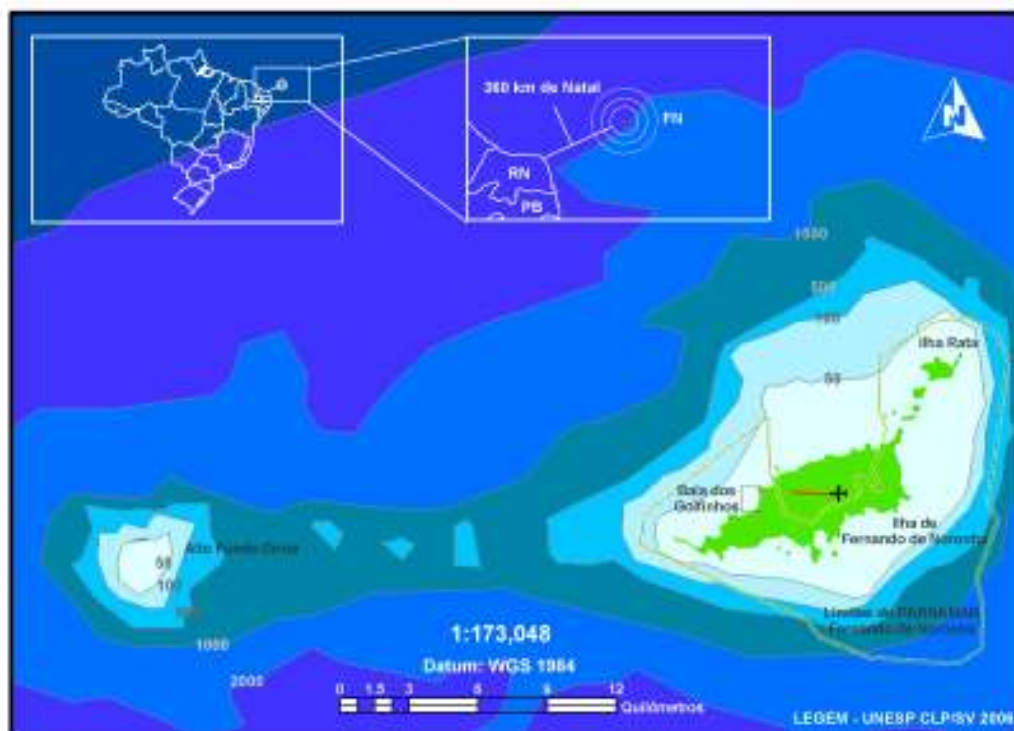
As amostras foram coletadas ao longo da costa do Arquipélago de Fernando de Noronha, PE, Brasil (Figura 3). A coleta foi realizada especificamente na metade nordeste do Mar de Dentro, fora da área de influência da Baía dos Golfinhos, que constitui área de proteção especial. O trecho amostrado englobou a área das Ilhas Dois Irmãos e imediações das Ilhas Secundárias, envolvendo, portanto, tanto a Área de Proteção Ambiental de Fernando de Noronha quanto o Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha (Figura 4).

As coletas foram conduzidas em duas etapas. A primeira coleta foi realizada em agosto de 2004, que corresponde à estação chuvosa. Já a segunda coleta foi conduzida em fevereiro de 2006, que corresponde à estação seca. As coletas foram denominadas de A e B, respectivamente.

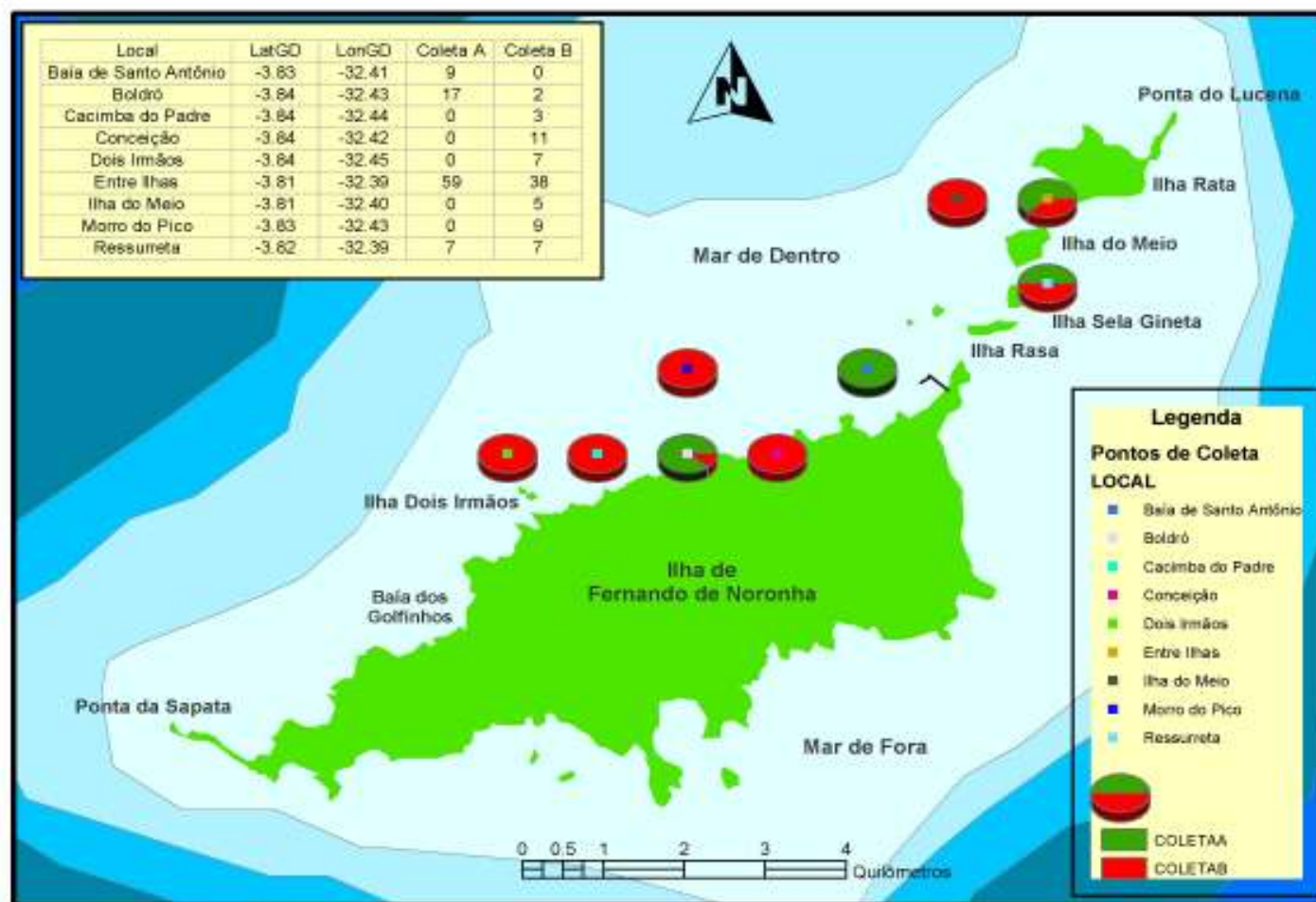
As licenças de coleta e transporte de material e manipulação do material biológico foram expedidas pelo IBAMA: licença nº073/2004 (Processo 02034.000141/03-11) e sua renovação nº232/2005 (Processo 02034.000141/03-87).

Para as coletas, utilizou-se um barco inflável de 4,5 m equipado com um motor de popa de 15 HP, sendo que na primeira foi utilizado o barco pertencente ao Centro Golfinho Rotador e na segunda um outro gentilmente cedido pelo IBAMA.





**Figura 3** – Mapa de Fernando de Noronha com os limites do Parque Nacional Marinho.



**Figura 4** – Localização dos pontos de amostragem de pele dos golfinhos-rotadores.

A biópsia do material epidérmico dos golfinhos-rotadores foi realizada com base em uma técnica de baixa invasibilidade, na qual foram utilizadas esponjas compostas de fibra sintética e material abrasivo (HARLIN *et al.*, 1999; GALES *et al.*, 2002). A esponja é designada pelo fabricante (3M) como fibra de limpeza de uso geral (produto não-tecido à base de fibras sintéticas e mineral abrasivo unidas por resina à prova d'água com dimensão de 102 mm x 260 mm).

As esponjas com cerca de 4 cm X 4 cm foram fixadas com presilhas plásticas inicialmente em cabos de madeira de 70 cm (estrutura que após pronta foi denominada de "amostrador"). Anteriormente, o cabo de madeira teve sua ponta encapada com um dedo cortado de luva látex estéril e fita adesiva (Figura 5).



**Figura 5** – Peças (esponja abrasiva autoclavada, cabo de madeira encapado com dedo de luva de látex e presilha plástica) para montagem do amostrador utilizado na raspagem de pele dos golfinhos.

Com o amostrador, um dos pesquisadores (em esquema de revezamento) ficava deitado de barriga para baixo na frente do barco inflável e passava a esponja no dorso de um dos golfinhos, toda vez que estes se aproximavam da proa da embarcação (Figura 6).

Logo após o contato (esfregação da esponja no dorso do animal), ainda na embarcação, o pedaço da esponja que continha a amostra de pele era removido do amostrador e colocado em um frasco contendo solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 20%, saturada em NaCl ou álcool 70%.

As amostras retiradas dos amostradores foram classificadas em três categorias: (--) não apresentava material epidérmico visível na esponja; (+-) pele visível na esponja; (++) grande quantidade de pele visível (Figura 7).

Algumas informações foram anotadas em uma prancheta impermeável logo após a estocagem da amostra: número da amostra, categoria quanto à quantidade de pele presente na esponja, local e horário de coleta, e qualquer evento que pudesse ser relevante posteriormente (por ex: indivíduo com marca natural).



**Figura 6** – Pesquisador deitado à frente do barco inflável e o golfinho se aproximando da embarcação. A seta vermelha indica o amostrador na mão do pesquisador e a seta azul a nadadeira exposta do animal.



**Figura 7** - Esponja fixada no cabo de madeira (amostrador) contendo amostra de pele de golfinho, classificada como (++).

Para o barco foram levados 10 amostradores por dia que foram repostos conforme o uso, mesmo com a embarcação em movimento. Para isso, todo dia eram embarcadas várias esponjas e presilhas plásticas, provenientes de um estoque levado para o Arquipélago. As esponjas foram autoclavadas e isoladas com alumínio para a viagem.

Para reduzir a probabilidade de reamostragem dos indivíduos, o curso da embarcação era remanejado com frequência, variando a *velocidade*, de modo a evitar que os mesmos animais se mantivessem intermitentemente junto à proa. Cada indivíduo era atentamente observado na tentativa de visualização de qualquer marca natural no corpo dos animais que pudesse auxiliar na sua identificação junto ao catálogo de fotos do Centro Golfinho Rotador. Além disso, a exclusão definitiva de indivíduos amostrados mais de uma vez foi realizada após a análise dos microssatélites (detalhada no item 4.2.13).

Após o quarto dia de coleta quatro amostras foram escolhidas para um teste de extração realizado em Fernando de Noronha. Esta avaliação foi realizada para confirmar qual quantidade de pele dos golfinhos seria necessária na esponja para obtenção de DNA. As amostras escolhidas representavam as três categorias citadas acima.

O teste de extração foi iniciado no laboratório do Hospital de Fernando de Noronha. Para isso foi utilizado um método adaptado do citado por HARLIN *et al.*, 1999. A amostra foi transferida do tubo com DMSO para um tubo *ependorf* 0,6 ml com um furo no fundo e este foi inserido dentro de um outro *ependorf*, mas de 1,7 ml.

Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Com este passo a solução de DMSO presente na esponja ficava armazenada no tubo maior e a esponja já sem o DMSO era transferida para um tubo novo.

A partir desta etapa passou-se a usar as indicações do *GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit®* (AMERSHAM BIOSCIENCES). Em um tubo novo foram adicionados 600 µl da solução de lise e este deixado a 55°C por 15 min em banho-maria. Após este período, adicionou-se 5 µl de proteinase K em cada tubo e estes foram encaminhados novamente ao banho-maria para permanecer a 55°C por 3 horas.

Os outros passos (precipitação e lavagem) do protocolo do *kit* foram realizados no quarto do alojamento. Ao final, as amostras de DNA foram diluídas em 50 µl de solução de hidratação e armazenadas a 4°C.

No dia seguinte, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, PE, para que fosse realizada a quantificação.

Em gel de agarose 1%, 2µl de cada amostra foram aplicados e misturados com tampão de carregamento. A visualização das bandas foi feita em UV. Utilizou-se um *ladder* (tamanho conhecido) para a comparação de intensidade. O resultado da quantificação nos foi enviado pelo grupo de Recife via e-mail.

Com o término da coleta as amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente e trazidas para São Paulo.

Com alguns dias de campo, ainda na primeira viagem, foram realizadas as seguintes observações e alterações:

- Os cabos de madeira para os amostradores foram substituídos por cabos maiores (de 70 cm passou-se para 130 cm) para um melhor resultado no contato com os animais, que nadam rápido.

- Na primeira coleta tivemos um número de amostras maior que o esperado e os tubos *falcon* contendo DMSO 20%, que levamos do laboratório, acabaram. Por isso, passou-se a acondicionar as peles em tubos *ependorf* contendo uma solução de álcool 70%. Além de não perdermos a oportunidade de coleta por falta de frascos, testamos a preservação deste tipo de tecido (pele) em uma solução mais acessível, barata e de fácil preparo.

- Com a extração realizada em Noronha e quantificação das amostras no laboratório em Recife, foi possível verificar que somente as amostras com pele visível (+- e ++) apresentavam quantidade de DNA suficiente para análises genéticas e que por isso não havia necessidade de estocagem das amostras (--) e que o esforço amostral deveria ser dado às amostras de maior quantidade de pele. A partir deste ponto começou-se a descartar amostras consideradas sem material visível (--).

Com a experiência da primeira coleta e com testes subseqüentes realizados no laboratório Biogem (UNESP – Botucatu) foi possível determinar procedimentos melhor adequados para a segunda coleta, realizada com as seguintes alterações:

- Para a fixação das esponjas e contato com os golfinhos foram utilizados os cabos maiores;



- Todas as amostras foram acondicionadas em álcool 70% e não mais em DMSO;

- Somente as amostras com pele visível (+- e ++) foram rotuladas e armazenadas. Um maior esforço foi realizado para a obtenção de amostras que continham uma quantidade de pele bem visível na esponja.

#### **4.2.2 – Extração de DNA**

As amostras de tecido muscular foram extraídas utilizando-se o *Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit*<sup>®</sup>, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, já citado anteriormente. Para a extração de DNA das amostras de pele foram realizados três testes em laboratório.

No primeiro teste, extrações foram conduzidas com o mesmo procedimento realizado no Arquipélago, anteriormente descrito. No segundo, utilizou-se a metodologia descrita em HARLIN *et al.*, 1999, que utiliza solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção 25:24:1) em vez do *Kit*. No terceiro teste, as amostras foram extraídas utilizando-se a resina *Chelex*<sup>®</sup> (SIGMA). Para este último teste de extração, 200 µL da resina a 5% foram acrescentados e uma pequena quantidade da pele retirada da esponja em um tubo *ependorf* com o auxílio de um palito de dente (autoclavado). Os tubos foram levados ao banho-maria a 65°C e deixados durante a noite inteira. No dia seguinte, os tubos foram colocados a uma temperatura de 95°C por 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 14000 rpm por 3 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Desta forma, o DNA ficou pronto para uso.

### 4.2.3 - Quantificação do DNA

As amostras de DNA que foram extraídas de ambos os tecidos, muscular e epidérmico, foram quantificadas em espectrofotômetro (GENEQUANT - PHARMACIA BIOTECH).

### 4.2.4 - Testes com as amostras extraídas com *Chelex*

Como não foi possível fazer a visualização das bandas de DNA extraídos com *Chelex* em gel de agarose, foram realizados alguns testes para verificar se o DNA estava amplificando adequadamente. Foi realizada uma reação utilizando *primer* RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e também seqüenciamento do fragmento gerado por *primers* do citocromo b.

O teste RAPD foi realizado com duas amostras extraídas com *Chelex* e duas com o *Kit* citado anteriormente. Os produtos submetidos à PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram compostos por: tampão 10X, 1,93 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,4 µL de BSA a 4,5%, 0,8mM de dNTP (10mM), 1u de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), 0,3µM de *primer* (OPERON TECHNOLOGIES INC), 10ng de DNA e água MiliQ autoclavada para um volume final de 13 µL de solução. A amplificação foi realizada utilizando-se um termociclador (MJ Research / modelo PTC 100<sup>TM</sup>), nas seguintes condições: 96°C por 3 min; 41 vezes, 92°C por 1 min, 35°C por 1 min e 72°C por 2 min e 72°C por 5 min. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% acrescido de brometo de etídio (0,2 µg para 100 ml de gel), usando como tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0). No gel foram aplicados os produtos acrescidos de 3 µL de Tampão de Carregamento (TC) e ao lado um *ladder* 100 bp. A visualização das bandas foi realizada no sistema de fotodocumentação

---

digital EAGLE-EYE II (STRATAGENE), sob luz UV com o programa EAGLESIGHT (STRATAGENE).

#### 4.2.5 - Certificação da espécie com *primers* do citocromo b

Para a construção da biblioteca genômica foram disponibilizados dois tecidos musculares de golfinhos-rotadores. Os exemplares, ambos do sexo feminino, haviam encalhado na costa de Fernando de Noronha nos anos de 1999 e 2004. Essas amostras foram numeradas como 1 e 2 e submetidas a um teste molecular com o objetivo de descartar qualquer falha na identificação da espécie *Stenella longirostris*.

Para a análise molecular destas amostras foi realizada uma reação polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se *primers* do citocromo b (DNA mitocondrial) (PALUMBI, 1996). Os *primers* GLUDG-L e CB2, que amplificam a região do citocromo b, foram diluídos com água miliQ autoclavada para uma concentração inicial de 100 $\mu$ M e depois a 10 $\mu$ M para solução de trabalho. Um dos *primers* atuou como *Forward* e o outro como *Reverse*. O produto submetido à PCR foi composto por: 25 ng de DNA, Tampão 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,2 mM de dNTP (10 mM), 1u de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), 0,4  $\mu$ M de cada *primer* (10 $\mu$ M cada) e água MiliQ autoclavada para completar um volume final de 25 $\mu$ L.

A quantidade de DNA foi definida com um teste que utilizou três diferentes concentrações (15, 25 e 50ng), variando o volume de água miliQ autoclavada. Para efeito de comparação, nesta análise foram usadas duas amostras: uma falsa-orca, *Pseudorca crassidens*, encontrada em Bertioga, litoral sul de São Paulo, em 2004, e uma de golfinho, amostra de músculo

(número 2, citada no item "material" recebido para construção da biblioteca), possivelmente de *Stenella longirostris*.

Com a quantidade de DNA estabelecida no primeiro teste, no segundo foram incluídas duas outras amostras de golfinho: o tecido número 1 (também citado no item "material") e uma das amostras de pele extraída com *Chelex* (amostra 68A). A inclusão desta foi para verificar se as amostras extraídas com a resina estavam funcionando para a análise mitocondrial.

A amplificação foi realizada utilizando-se um termociclador GENEAMP® PCR SYSTEM 9600, nas seguintes condições: 95°C por 2 min, 35 vezes (94°C por 30 s; 60°C por 1 min; 72°C por 30 s) e 72°C por 5 minutos. Após a reação sair do termociclador foi realizado um gel de agarose 1% para verificar se realmente o fragmento desejado (por volta de 460bp) tinha sido amplificado. Em seguida, uma reação de seqüenciamento foi realizada com o produto amplificado.

Para a confecção da reação foi utilizado o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (PE APPLIED BYOSYSTEMS), na qual foram misturados 0,5 µL do produto da reação citada acima, 1,8 µL de *Big Dye*, v.3.01, 1 µL de *Save money*, 0,5 µL do *primer* GLUDG-L ou CB2 (ambos a 10µM) e água miliQ autoclavada para completar um volume de 10µL. Os fragmentos amplificados para oito reações foram seqüenciados, quatro *Forward* (um dos *primers*) e quatro *Reverse* (outro *primer*). Depois de prontas, as reações foram encaminhadas ao termociclador anteriormente citado para serem amplificadas nas seguintes condições: 96°C por 2 min e 25 vezes de 96°C por 45 s, 52°C por 30 s e 60°C por 4 minutos.

Em seguida, foi realizada a precipitação das reações. Para tal, 80  $\mu$ L de isopropanol 75% foram adicionados e a placa invertida moderadamente. As reações foram deixadas por 15 min no escuro e posteriormente centrifugadas por 45 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e um *spin* foi dado com a placa invertida. Após, 150 $\mu$ L de etanol 70% foram adicionados e a placa foi centrifugada por 10 min a 4000 rpm. Novamente o sobrenadante foi descartado e um *spin* dado com a placa invertida. Por fim, a placa foi deixada no escuro para secar por 1 hora em temperatura ambiente.

Com a placa seca, 10 $\mu$ L de formamida (Hi-Di, APPLIED BIOSYSTEMS) foram aplicados para cada reação e foi realizada uma desnaturação a 95°C por 5 minutos. A placa, então, foi encaminhada para um seqüenciador automático ABI 3100 (APPLIED BIOSYSTEMS).

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, SP. As seqüências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa SEQUENCHER™, versão v.3.1. Uma seqüência consenso foi gerada, e em seguida, submetida a uma comparação com outras seqüências depositadas no GENBANK. Além da comparação no GENBANK as seqüências também foram submetidas a um site que realiza comparações entre seqüências, mas, neste caso, somente entre cetáceos, DNA SURVEILLANCE (<http://www.cebl.auckland.ac.nz:9000>), que nos forneceu uma árvore filogenética, nos informando com qual táxon já depositado nossa seqüência possui maior homologia (Ross *et al.*, 2003).

#### 4.2.6 - Teste de digestão do DNA

Após a obtenção do DNA do tecido muscular, um teste de digestão deste material foi realizado para se dar início a construção de biblioteca genômica.

O produto submetido à digestão foi composto por: tampão 10x, 25 ng de DNA, 0,5 µL de enzima de restrição e água MiliQ autoclavada para completar um volume de 10 µL.

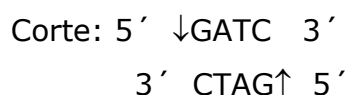
A amostra digerida foi a selecionada (após ter sido verificada como pertencendo realmente a *Stenella longirostris*). As enzimas utilizadas foram: *AfaI*, *AluI* e *Sau3AI*. Uma amostra sem DNA foi utilizada como controle. A digestão foi realizada em termociclador, no qual as amostras permaneceram *overnight* a 37°C. A confirmação foi realizada em gel de agarose 1%, no qual o produto de digestão foi todo aplicado com 5µL de TC. *Ladder* 100bp foi aplicado como padrão. A corrida eletroforética foi ajustada a 120 V e durou 1h e 40 minutos.

#### 4.2.7 - Construção das bibliotecas genômicas

Para o desenvolvimento das bibliotecas genômicas utilizou-se um protocolo adaptado ao utilizado no Laboratório de Análise Genética e Molecular – CBMEG – UNICAMP / IAC, sendo que este último pode ser considerado uma modificação a partir de KIJAS *et al.*, 1994. Um outro método foi testado anteriormente, descrito por CRISTOFANI *et al.* (1998), no entanto este não proporcionou resultados satisfatórios e por isso foi substituído.

### Digestão

A digestão do DNA extraído de tecido muscular de golfinho-rotador foi realizada primeiramente com a enzima *Sau3AI* (GIBCO BRL®); No entanto, devido a indisponibilidade do produto pelo fornecedor, esta foi substituída pela enzima *MboI* (INVITROGEN®), já que apresenta o mesmo tipo de corte da primeira.



Na solução de digestão foram adicionados água miliQ autoclavada, cerca de 3,75µg de DNA, 50 u da enzima *MboI* e seu tampão 10X. A solução foi mantida a 37°C por uma noite. A digestão foi verificada em gel de agarose 0,8% a 120 V por 1 h e 30 minutos e visualizada sob luz ultravioleta (UV): os sinais foram capturados e registrados pelo programa EAGLESIGHT.

### Extração dos fragmentos de restrição do gel

Com a digestão do DNA, um arrasto foi visualizado e com o auxílio de uma lâmina, a região do gel com 400 a 1000 bp, ainda sob luz UV, foi recortada e colocada em um tubo de 1,7mL. Um processo de purificação da banda do gel foi realizado utilizando-se o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (AMERSHAM BIOSCIENCES), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Um novo gel de agarose 0,8% foi produzido nas mesmas condições anteriores para verificar se a banda do gel havia sido recortada corretamente, ou seja, se a faixa de tamanho dos fragmentos estava realmente entre 400 e 1000 bp.

---

### Ligação do DNA digerido aos adaptadores

Após a seleção do tamanho dos fragmentos foi realizada uma ligação destes aos adaptadores, que são específicos para a terminação deixada pela *MboI*.

Adaptadores para a enzima *MboI*:

- Curto: 5' - CAGCCTAGAGCCGAATTCACC - 3'
- Longo: PO<sub>4</sub> - 5' - GATCGGTGAATTCGGCTCTAGGCC - 3'

Os oligonucleotídeos (longo e curto) foram diluídos inicialmente para uma concentração de 100 µM em água miliQ autoclavada. Em seguida, foi produzida uma solução destes adaptadores a 10µM. Os adaptadores (longo e curto) a 10 µM foram mantidos por 15 min a 37°C para serem anelados e posteriormente, acertados para uma concentração de 5µM. Para a solução de ligação foram adicionados 0,4 µM de cada adaptador (ambos a 10µM), 6 µL do DNA selecionado purificado do gel, 4 u de T4 ligase (3u/µL), tampão 5X e água miliQ autoclavada para completar 50µL. Em seguida, a reação foi mantida por 2h a 20°C. Uma reação PCR foi sintetizada contendo Tampão 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,8 mM de dNTP, 1u de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), 0,4 µM de cada *primer* (10µM cada) e água MiliQ autoclavada para completar um volume final de 50µL. nas seguintes condições: 96°C por 4 min e 20 vezes de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de 8 min a 72°C. O produto de PCR foi purificado com o *kit* GFX™, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para o enriquecimento, os 100 µL do produto de PCR do passo anterior (ligação do DNA digerido aos adaptadores) foram colocados em um tubo adicionados a 400 µL de água miliQ autoclavada. Esta solução foi colocada a 95°C por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 16 µL de SSC 20x e



3  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo biotilado de repetição  $\text{AC}_{15}$  ( $50\mu\text{M}$ ). A solução foi então deixada à temperatura ambiente por 20 min, agitando-a lentamente a cada 2 minutos.

#### *Preparação das partículas magnéticas ("beads")*

Antes de adicionar as partículas magnéticas envoltas por estreptavidina (DYNAL®) ao oligonucleotídeo, estas partículas foram lavadas. Para isso, 600  $\mu\text{L}$  da solução contendo estas partículas, que veio do fabricante, foram homogeneizados e colocados em um tubo *ependorf*. Com o auxílio de um ímã as partículas foram aderidas à parede do tubo e após cerca de 30 s foi removido o sobrenadante. O tubo foi removido do ímã e 300  $\mu\text{L}$  de SSC 0,5 x foram adicionados e misturados às partículas. Este passo foi repetido por três vezes. Após o sobrenadante ser removido pela última vez, as partículas foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de SSC 0,5x/ SDS 0,1%.

Com as partículas já lavadas, foi então preparada uma solução misturando-se os 100  $\mu\text{L}$  das partículas com os 519  $\mu\text{L}$  do produto purificado com os oligonucleotídeos. Esta solução foi deixada à temperatura ambiente por 10 min, agitando-se suavemente o tubo.

Após este período, o sobrenadante foi removido com o auxílio de um ímã e as partículas aderidas à parede do tubo foram lavadas com 300 $\mu\text{L}$  SSC 0,1x/ SDS 0,1%. Estes dois últimos passos foram repetidos por três vezes. Em seguida, as partículas foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de água miliQ autoclavada. As partículas magnéticas foram separadas do sobrenadante com o auxílio do ímã, só que desta vez este foi removido para um tubo novo, no qual foi acrescido de 150  $\mu\text{L}$  de água miliQ autoclavada, resultando em um volume final de 250  $\mu\text{L}$ .

---

### Verificação de seleção dos fragmentos

Para confirmar a seleção dos fragmentos foi realizada uma reação, na qual foram adicionados água miliQ autoclavada, DNA selecionado no passo anterior, tampão 10X, dNTP, um dos *primers* (adaptador longo a 10 $\mu$ M) e *Taq* DNA polimerase (5u/ $\mu$ L). A amplificação foi realizada no termociclador já citado anteriormente e apresentou as seguintes condições: 96°C por 5 min; 40 ciclos de 96°C por 45 s, 62°C por 1 min e 72°C por 2 min; alongamento final a 72°C por 2 min. O produto foi aplicado em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V por 1h e 40 min. A amplificação foi visualizada sob UV e a foto realizada no EAGLESIGHT.

### Reação de ligação de DNA ao vetor

Para a reação de ligação do produto de PCR do passo anterior ao plasmídeo foi utilizado o kit *pGEM<sup>®</sup>-T EasyVector System I* (PROMEGA<sup>®</sup>). Foram adicionados Tampão T<sub>4</sub> ligase 2X, 1  $\mu$ L do *pGEM<sup>®</sup>-T* (54 ng/ $\mu$ L), 1,5  $\mu$ L do produto de PCR, 1  $\mu$ L de T<sub>4</sub> ligase e água miliQ autoclavada para completar um volume de 10  $\mu$ L. A reação foi mantida a 4°C durante a noite. Neste passo, os fragmentos de interesse, os microssatélites, foram inseridos na região *lacZ* do plasmídeo para que este servisse de vetor e os fragmentos fossem multiplicados (clonados) dentro de bactérias.

### Transformação

Células competentes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (50 $\mu$ L) preparadas anteriormente no próprio laboratório foram adicionadas em capela ao produto da ligação do dia anterior. Esta solução foi submetida a um choque térmico

para que as bactérias fossem transformadas, ou seja, tivessem inseridos os plasmídios com o fragmento de interesse através de seus poros.

A solução de transformação (bactéria e solução de ligação) foi incubada em gelo por 30 min. Em seguida, o tubo foi transferido para um banho-maria a 42°C por 30 s e novamente em gelo por 2 minutos. Em seguida, um volume de 800µL de meio de crescimento (CG - *Circle Grow*<sup>®</sup> / Bio 101, INC.) líquido foi adicionado ao tubo que continha a solução de transformação e este foi incubado a 37°C com agitação por 1 h sob agitação.

Enquanto ocorria o crescimento das bactérias foi realizada a preparação de placas de *petri* contendo meio CG sólido (com ágar), ampicilina (50mg/ml) e os reagentes X-GAL e IPTG. Primeiramente, o meio líquido CG com Agar foi aquecido e despejado em placas de *petri*. Após solidificação destes meios, a ampicilina foi espalhada com o auxílio de uma alça de vidro. Quando os meios secaram, foram espalhados 100 µL de IPTG acrescidos de 20 µL de X-Gal. Após o período de crescimento das bactérias, com as placas já preparadas e secas, foram espalhados 200 µL desta solução. Após secar completamente as placas, estas foram então vedadas e estocadas em estufa a 37°C durante uma noite para crescimento das colônias de bactéria.

#### *Confirmação dos clones positivos via PCR*

Após o crescimento das colônias de bactérias em placas de *petri* contendo ampicilina e uma mistura de IPTG e X-Gal foi possível realizar uma seleção das bactérias que supostamente eram positivas, ou sejam, continham o plasmídio com o fragmento de interesse.

A ampicilina no meio de cultura fez com que somente as bactérias contendo o plasmídio crescessem, visto que o plasmídio possui em sua conformação uma região (gene) que confere resistência à ampicilina para as bactérias transformadas (plasmídio inserido em seu interior).

Apenas as colônias de bactérias que apresentavam o plasmídio cresceram. Entretanto ainda foi necessário saber quais destas realmente tiveram o plasmídio com o fragmento de interesse, já que o processo de ligação não apresenta 100% de eficácia. As colônias que possuem o plasmídio com o fragmento foram brancas e as que não possuíam foram azuis.

Essa diferenciação de cor ocorreu devido ao fragmento de interesse ser inserido no plasmídio em uma determinada região (gene *lacZ*), que quando íntegra realiza a produção de  $\beta$ -Galactosidase. Esta enzima degrada o açúcar cromogênico X-Gal na presença do indutor artificial IPTG (isoproipiltiogalactosídeo), ambos espalhados no meio de cultura, produzindo uma colônia de coloração azul. Quando o fragmento foi inserido ele interrompeu a formação da enzima fazendo com que a colônia em contato com o X-Gal ficasse branca.

Mesmo com todos estes passos de seleção para bactérias positivas, ainda assim existiram algumas colônias que foram "falsos positivos" que não apresentaram o fragmento, mas apresentaram-se de coloração branca. Para a identificação destas colônias foram realizadas reações com *primers* universais (M13 *forward* e *reverse*).

Cada colônia branca foi tocada com uma ponteira, que em seguida foi mergulhada primeiramente em uma solução de PCR e depois em um meio de cultura líquido contendo ampicilina (placa de reação que foi chamada de permanente).

A solução de PCR continha Tampão 10X da *Taq*, 0,67 mM de dNTP, 0,4  $\mu$ M de *primers* M13 *Forward* e *Reverse* (10 $\mu$ M), 0,75 u de *Taq* polimerase (5u/ $\mu$ L) e água miliQ autoclavada para completar um volume de 15  $\mu$ L. No termociclador foram programadas as seguintes condições: 96°C por 10 min; 35 ciclos de 95°C por 45 s, 55°C por 45 s e 72°C por 1 min; alongamento final a 72°C por 5 minutos. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% numa corrida a 120V por 1h e 40 min. Os fragmentos foram visualizados sob UV e a foto realizada com o programa EAGLESIGHT. Os produtos que apresentaram contaminação, ou seja, mais de uma banda, não foram utilizados no passo seguinte. Além disso, só foram seqüenciadas aquelas bandas acima de 400 bp.

A placa permanente foi incubada a 37°C durante a noite para novamente crescer as colônias de bactéria e no dia seguinte foi estocada num freezer a -80°C. Nesta placa ficou armazenada a biblioteca de microssatélites que será acessada sempre que necessário após conhecimento das seqüências.

#### *Inoculação e extração plasmidial*

O DNA plasmidial foi isolado das colônias recombinantes para o seqüenciamento, observando o seguinte procedimento: a quantidade de 1 ml de meio de cultura Circle Grow contendo 100 mg / ml de ampicilina foi colocada em cada pocinho de uma microplaca. Com o auxílio de um repicador, colônias individuais foram inoculadas no meio. Em seguida, a placa foi selada com adesivo e este furado com uma agulha para aeração durante o crescimento das colônias. A placa foi incubada a 37°C com agitação constante de 300 rpm por 22 horas. Após este período, o adesivo furado foi trocado por um novo e a placa foi centrifugada por 6 min a 4000 rpm, para sedimentação das células. O sobrenadante foi então descartado e a placa mantida invertida

sobre papel absorvente por 1 minuto. Em cada pocinho foram aplicados 240  $\mu$ l de GTE, em seguida a placa foi selada com adesivo, agitada no *vortex* por 2 min e centrifugada por 6 min a 4000 rpm. Enquanto isso, foi preparada uma placa com fundo "U" na qual foram adicionados 5  $\mu$ l de RNase a 10 mg/ml. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada pocinho foram aplicados 80  $\mu$ l de GTE. A placa foi selada e agitada no *vortex* por 5 minutos. Cerca de 60  $\mu$ l de cada suspensão de células foram transferidos para a placa que continha RNase. Nos pocinhos foram adicionados 60  $\mu$ l de NaOH 0,2M – SDS 1% e a placa foi selada e invertida 40 vezes. A placa foi incubada por 7 min a temperatura ambiente e posteriormente foi dado um *spin* na placa. Um volume de 60  $\mu$ l de KOAc 3M (estocado a 4°C) foi aplicado a cada pocinho, a placa foi selada com adesivo e invertida por 40 vezes. Um novo *spin* foi realizado e em seguida, o adesivo removido e a placa incubada a 90°C por exatos 30 minutos. A placa foi esfriada em gelo por 10 min e em seguida centrifugada por 4 min a 4000 rpm. Uma placa filtro foi fixada com fita adesiva no topo de uma placa em fundo "V" e todo o volume foi transferido para a placa filtro e esta centrifugada por 4 min a 4000 rpm a 20°C. A placa filtro foi removida e 110  $\mu$ l de isopropanol foi adicionado. Em seguida, a placa foi selada com adesivo e esta invertida por 20x. Posteriormente, centrifugou-se a placa por 45 min a 4000 rpm a 20°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e foram adicionados 200  $\mu$ l de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada por 5 min a 4000 rpm a 20°C e o sobrenadante novamente descartado. Inverteu-se a placa sobre papel absorvente e em seguida foi realizado um *spin* com a placa invertida. Após, a placa secou por 1 h a temperatura ambiente (ao abrigo da luz) e por fim, o precipitado foi ressuscitado em 60  $\mu$ l de água miliQ autoclavada.

#### 4.2.8 - Seqüenciamento

Com a reação dos *primers* M13, foi possível confirmar e selecionar os clones com fragmentos acima de 400 bp. Em seguida, foi realizado o seqüenciamento destes produtos. Para a confecção da reação foram misturados o produto precipitado no passo anterior com 1,6 µL de *Big Dye* v.3.01, 2 µL de *Save money*, 1 µL de *primer* SP6 e água miliQ autoclavada para completar um volume de 10 µL. Depois das reações estarem prontas, estas foram encaminhadas para um termociclador para serem amplificadas nas seguintes condições: 96°C por 2 min e 25 ciclos de 96°C por 45 s, 52°C por 30 s e 60°C por 4 minutos.

Terminado o programa, foi realizada uma precipitação da reação de seqüenciamento. Para tal, foram acrescentados 80 µL de isopropanol 75%. Em seguida, a solução foi misturada por inversão (20x) e deixada no escuro por 15 min. Passado este período, uma centrifugação foi realizada por 45 min a 4.000 rpm e 25°C. O sobrenadante foi descartado e um *spin* foi realizado com a placa invertida (fundo da placa para cima). Etanol 70% (150 µL) foi adicionado e placa centrifugada por 10 min a 4.000 rpm e 25°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e realizado um *spin* com a placa invertida. Posteriormente, a placa foi deixada por 1 h em temperatura ambiente no escuro para secar. Formamida *Hi-Di* (10 µL) foi adicionada e a placa com as reações de seqüenciamento encaminhada para um termociclador para desnaturação. Finalmente, a placa foi levada a um seqüenciador automático ABI 3100 (APPLIED BIOSYSTEM).

Os seqüenciamentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Depto. de Botânica do Instituto de Biociências da USP,

em São Paulo, SP, e Depto. de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP em Jaboticabal, SP.

#### **4.2.9 - Análise das seqüências e desenho dos *primers* microssatélites**

Após a visualização das seqüências no programa BIOEDIT foi realizada uma separação entre as seqüências que continham repetições de nucleotídeos e as que não continham. Em seguida, foram realizadas a identificação e a remoção do vetor (plasmídeo usado na construção da biblioteca) nas seqüências. Este processo foi realizado com a ferramenta *Vecscreen* do *site* do GENBANK ou NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A seqüência do adaptador foi identificada e removida em um editor de texto. Em seguida, as seqüências já limpas (com microssatélites, mas sem vetor e adaptadores) foram inseridas no programa WEBTROLL para localização da região de repetição e desenho dos *primers* nas regiões flanqueadoras.

Para a verificação da presença de mesmas seqüências contendo microssatélites, realizou-se um alinhamento entre estas com o auxílio do programa *CLUSTAL X*, versão 1.81 para PC (THOMPSON *et al.*, 1997).

Com o auxílio do programa GENE RUNNER V. 3.05 verificou-se se os *primers* escolhidos formariam estruturas inespecíficas (*hairpins* ou dímeros) e descartaram-se os *primers* que promoveram a formação destas estruturas acima de uma temperatura de 20°C.



#### 4.2.10 - Amplificação dos microssatélites

Os *primers* microssatélites selecionados e confeccionados foram diluídos em água miliQ autoclavada primeiramente para uma concentração de 100 $\mu$ M. A partir desta solução estoque uma nova diluição foi realizada para os *primers* ficarem em uma concentração final para trabalho de 10 $\mu$ M.

Para os testes de amplificação foram selecionados três indivíduos que apresentavam maiores quantidades de DNA. Os testes dos *primers* foram realizados para diferentes temperaturas de anelamento, num termociclador de gradiente (MASTERCYCLER® EPGRADIENT S – EPPENDORF), que tiveram suas faixas variando de 44°C a 60°C. No entanto, após visualização deste primeiro teste, a amplitude de temperatura variou de 56°C a 64°C, dependendo do *primer*.

As reações foram confeccionadas com os seguintes reagentes: Tampão 10X da *Taq*, 1,25mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,83 mM de dNTP, 0,42  $\mu$ M dos *primers forward* e *reverse*, e 0,75 u de *Taq* polimerase (5u/ $\mu$ L, INVITROGEN) e água miliQ autoclavada para um volume final de 12 $\mu$ L. As seguintes condições foram programadas no termociclador: 95°C por 5 min; 32 ciclos de 94°C por 30 s, anelamento (t °C = X) por 20 s e 72°C por 20 s; alongamento final a 72°C por 10 minutos. O número de ciclos foi aumentado de 30 para 32 para a maioria dos *primers* porque as reações estavam gerando bandas muito fracas.

Adicionaram-se 8 $\mu$ L de TC ao volume total do produto de PCR (12 $\mu$ L) e todo o volume foi aplicado em um gel de agarose 1,5%. A eletroforese foi realizada numa corrida a 120 V por 2 horas. Os fragmentos foram visualizados sob UV e a foto realizada com o EAGLESIGHT. Após análise das fotos, os *primers* que apresentaram problemas de amplificação foram reavaliados, no entanto, com modificações nas reações. Foram alteradas as concentrações de cloreto de magnésio, *primer* e / ou DNA.

#### 4.2.11 - Genotipagem da população

Após a verificação de amplificação dos microssatélites e determinação da temperatura de anelamento ideal para cada par de *primers*, reações foram realizadas para a avaliação da população de golfinhos-rotadores. Estas foram realizadas com as mesmas condições da reação de teste dos *primers*, com exceção da concentração de MgCl<sub>2</sub> e os *primers* que variaram de acordo com o loco avaliado.

O termociclador também foi programado para as mesmas condições citadas no teste, no entanto, para cada *primer* foi identificada uma temperatura de anelamento ideal.

Todas as reações foram realizadas no termociclador de gradiente citado anteriormente. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 8% numa corrida a 160V por cerca de 4 horas. Os géis foram corados com nitrato de prata seguindo o procedimento abaixo:

- Solução de fixação (etanol 10%, ácido acético PA glacial 0,75%) por 5 min;
- Solução de nitrato de prata (0,012M) por 20 min;
- Revelador (NaOH 0,75M) com formaldeído (1,2 mL / L) por cerca de 15 min ou até aparecerem as bandas.

Os fragmentos foram visualizados sob luz branca e a foto realizada no EAGLESIGHT e os tamanhos determinados com o auxílio do Programa KODAK DIGITAL SCIENCE 1D, versão 3.0.1.

Os *primers* foram testados para três outras espécies de cetáceos: *Stenella clymene* (golfinho de clymene), *Sotalia guianensis* (boto cinza) e *Pseudorca crassidens* (falsa-orca). A amplificação ou não destes *primers* foi testada em um indivíduo de cada espécie.

O conteúdo de informação do polimorfismo (*Polymorphism Information Content* – PIC) para cada marcador foi calculado de acordo com BOTSTEIN *et al.* (1980), com o auxílio do site <http://www.agri.huji.ac.il/~weller/Hayim/parent/PIC.htm>. O valor do PIC é calculado utilizando-se a fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1} P_i^2 - \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} P_i^2 P_j^2$$

#### 4.2.12 – Sexagem via PCR

Tendo em vista o fato de a raspagem de pele ter sido feita de cima do barco não foi possível identificar o sexo dos animais amostrados. Assim, uma alternativa foi sexar os animais molecularmente com um *multiplex* de quatro *primers*. Um total de 100 indivíduos foi sexado.

Os *primers* utilizados para identificar o gene ZFX foram: ZFX0582 e ZFX0923 (BÉRUBE & PALSOLL, 1996); e para identificar o gene SRY: PMSRYF (RICHARD *et al.*, 1994) e TtSRYR (ROSEL *et al.*, 2003).

As reações de PCR foram realizadas conforme sugerido por ROSEL *et al.*, 2003, com algumas modificações: Tampão 10x, 150 µM de dNTP, 1,5 u de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,3 µM de cada *primer*, com exceção do *reverse* para o SRY que foi aplicado 0,06 µM. O volume final foi de 25µL. Os fragmentos produzidos apresentaram um tamanho de aproximadamente 382 bp para ZFX e 339 bp para SRY.

O programa de amplificação consistiu em 92°C por 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg e 72°C por 45 segundos. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V por 2 horas. A visualização

das bandas foi feita com o auxílio de luz UV e fotografadas com o programa EAGLESIGHT.

#### **4.2.13 – Identificação de indivíduos re-amostrados**

Os indivíduos foram alinhados conforme a similaridade do tamanho dos alelos com o uso da ferramenta de classificação do Word. Em seguida, uma exclusão das amostras que apresentavam uma genotipagem idêntica foi realizada manualmente, pois provavelmente representavam golfinhos amostrados mais de uma vez.

#### **4.2.14 – Análises estatísticas**

Primeiramente, o desequilíbrio de ligação entre os *loci* foi realizado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>). Após esta verificação, duas análises foram realizadas quanto à estruturação da população de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha. Foi testada a hipótese nula de existir mais de uma população de golfinhos no Arquipélago. Assim, para a primeira análise os indivíduos foram divididos em dois grupos com relação à estação do ano em que foram amostrados (análise temporal). Para cinco *loci* microssatélites, tanto o grupo A (2004, período chuvoso) quanto o grupo B (2006, período de seca) foram compostos por 35 amostras. Para o grupo A foram escolhidas todas as amostras que amplificaram para a maioria dos *loci*. O número diminuiu com relação ao amostrado neste período (79 amostras) porque ocorreram falhas na amplificação. Para o grupo B um número maior de amostras amplificou para os *loci*, no entanto, para não serem comparados

números diferentes de amostras, os 35 indivíduos foram escolhidos aleatoriamente.

Após a análise temporal foram realizados testes para verificar se existia diferenciação entre os indivíduos de acordo com seu ponto de coleta (análise espacial). Para isso os pontos de coleta foram divididos em três grupos. Nesta avaliação foram utilizados 102 indivíduos e seis *loci*. No primeiro grupo foram inseridos 67 golfinhos amostrados na área Entre Ilhas, Ressureta e Ilha do Meio (grupo denominado "Entre Ilhas"). Esta área sofre influência do Mar de Fora e apresenta águas mais agitadas. O segundo grupo foi formado por 13 indivíduos coletados na Baía de Santo Antônio e Morro do Pico (grupo denominado "Porto"). Estes pontos sofrem influência das embarcações que rumam ao porto, presente nessa Baía. O terceiro grupo apresentou 22 animais amostrados na Conceição, Boldró, Cacimba do Padre e Dois Irmãos, que é uma área de mar calmo com a presença de praias (grupo denominado "Praias").

Para verificação de estruturação da população foram avaliados os índices do  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ , com o auxílio dos programas POPGENE, versão 1.32 (YEH *et al.*, 1999) e GENEPOP ON THE WEB, respectivamente. Os dois índices foram calculados, no entanto, o  $R_{ST}$  é considerado o mais adequado para estudos com marcadores microssatélites, pois leva em consideração o tamanho dos alelos. Os dados de Equilíbrio de Hardy-Weinberg; heterozigosidades observada e esperada, segundo LEVENE (1949); freqüências alélicas; e distância genética, segundo NEI (1978) também foram calculados com o programa POPGENE.

Após o teste de estruturação da população, uma análise com 102 indivíduos foi realizada para seis marcadores, na qual todos os golfinhos-

rotadores foram considerados como pertencentes a uma mesma população. Nesta análise intrapopulacional, com o auxílio do programa POPGENE, foram determinadas as frequências alélicas para cada loco, o número médio de alelos por loco, número médio de alelos efetivos por loco, as heterozigosidades observadas e esperadas sob o equilíbrio de HW. Além disso, foi calculado o índice de Shannon para cada *loci* analisado, que leva em consideração além do número de alelos a distribuição das frequências entre estes alelos (LEWONTIN, 1972). Para determinação de riqueza alélica foi utilizado o programa FSTAT, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Além disso, um teste de ocorrência de *Bottleneck* (efeito gargalo de garrafa) foi realizado utilizando-se o programa BOTTLENECK (CORNUET & LUIKART, 1996), que é um programa específico para verificar eventos de reduções recentes no tamanho efetivo da população a partir das frequências alélicas. Neste programa foi considerado o cálculo de WILCOXON, que apresenta um alto poder estatístico e pode ser utilizado com menos de 20 *loci*. Foi assumido o modelo mutacional bifásico (TPM) para os microssatélites, com a opção de 30% para o modelo IAM e 70% para o SMM.

As planilhas de dados para as análises de estruturação e diversidade foram construídas no EXCEL e convertidas no formato adequado para cada análise com o auxílio do programa CONVERT, versão 1.31 (GLAUBITZ, 2005). Ainda com este programa, utilizando-se a ferramenta para gerar uma tabela com as frequências alélicas, foram verificados os alelos privados, ou seja, aqueles que apareceram exclusivamente em um grupo ou outro. Com todos os programas, para as três análises (temporal, espacial e intrapopulacional) foram realizadas para 10 mil permutações e realizada a correção de Bonferroni Seqüencial (RICE, 1989).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – Trabalho de campo

Um total de 171 amostras foi obtido nas duas coletas de pele dos golfinhos-rotadores em Fernando de Noronha. Deste total, 161 amostras apresentavam pele visível, sendo 79 amostras na primeira coleta e 82 na segunda (Tabela 1).

**Tabela 1** – Número de amostras obtidas nas coletas realizadas em 2004 (A) e 2006 (B).

<b>Amostras</b>	<b>Coleta A</b>	<b>Coleta B</b>
<b>(++)</b>	40	49
<b>(+-)</b>	39	33
<b>(--)</b>	10	-
<b>Total</b>	89	82

(++) amostras com grande quantidade de pele visível na esponja;  
 (+-) amostras com pele visível;  
 (--) esponjas sem pele visível.

Dentre os indivíduos amostrados, somente um era filhote. Além disso, quatro golfinhos foram identificados no momento da coleta por serem animais já conhecidos pelo coordenador do Centro Golfinho Rotador, já que apresentavam marcas naturais bem evidentes (Figura 8). Três foram amostrados na coleta de 2004 e um na coleta de 2006. Um indício que os mesmos animais utilizam esta área com freqüência.



**Figura 8** – Golfinho-rotador com marca natural evidente na nadadeira dorsal (seta branca) amostrado em 2004.



## 5.2 - Extração do DNA genômico

Após extração de DNA das amostras da primeira coleta verificou-se que tanto as preservadas em DMSO como em álcool 70% funcionavam eficientemente (como foi verificado em teste com RAPD e citocromo b mais à frente).

Um total de 79 amostras foi extraído da primeira coleta, visto que as 10 amostras (--) foram descartadas das análises por não apresentarem DNA, conforme se verificou no teste de quantificação realizado em Recife.

O primeiro teste (mesmo procedimento realizado em Noronha), no qual se utilizou o *Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit*, a extração funcionou, mas a quantidade de DNA extraída de cada amostra foi considerada baixa e com um pequeno volume final (aproximadamente 30 µl, com algumas amostras apresentando de 10 a 20 ng/µl). Já no segundo teste, realizado com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, a extração não funcionou, por isso ele foi descartado. Os resultados desses dois métodos de extração não foram satisfatórios.

As extrações de DNA das amostras com a resina *Chelex* foram consideradas as que apresentaram melhores resultados, visto que promoveram a obtenção de uma solução com maior volume final e exigiram uma quantidade menor de pele. Com o uso da resina sobrou material aderido à esponja para futuras extrações, o que não foi possível com os outros métodos. Assim, a partir desta informação e dos resultados obtidos com os testes das amostras extraídas com *Chelex* (RAPD e citocromo b que serão detalhados nos itens 5.4 e 5.5) decidiu-se que todas as outras amostras de pele seriam extraídas com a resina (Tabela 2).

### 5.3 – Quantificação do DNA

O número de amostras da primeira coleta, extraído para os diferentes tipos de procedimentos testados (*Kit* e *Chelex*), juntamente com as respectivas faixas de concentrações de DNA, está descrito na tabela 2. Quatro amostras da coleta de 2006 (coleta B) foram perdidas no processo de extração, pois os tubos *eppendorfs* estouraram no passo da centrifugação, sobrando assim 78 das 82 amostras.

**Tabela 2** – Número de amostras extraídas para cada método com suas respectivas faixas de concentração de DNA obtidas (ng).

Tipo de Extração	Coleta A		Coleta B	
	Nº de amostras	Conc. (ng/µL)	Nº de amostras	Conc. (ng/µL)
<i>Chelex</i> <sup>®</sup>	50	3,5 – 63,0	78	7,0 – 63,0
<i>Kit</i> <sup>®</sup>	27 <sup>†</sup>	7,0 – 259,0	-	-
F: C: I <sup>*</sup>	2	-	-	-

(\*) F: C: I (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico);

(<sup>†</sup>) Incluídas três das quatro amostras extraídas em Noronha;

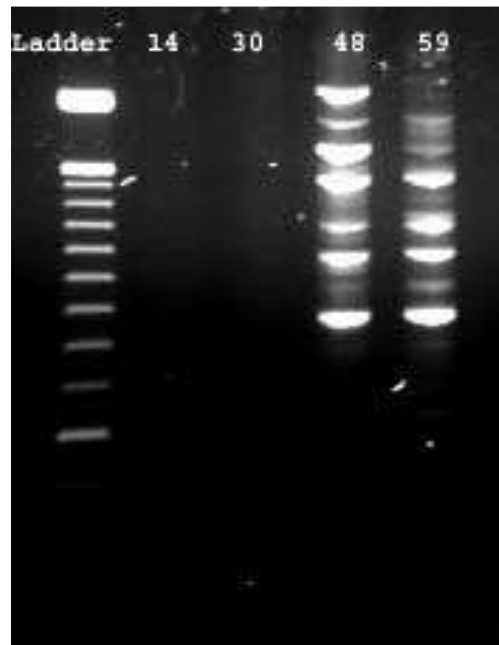
(-) Nenhum resultado.

### 5.4 – Teste com as amostras extraídas com *Chelex*

#### RAPD

Nas reações com marcador RAPD foi verificada a amplificação de bandas apenas nas amostras extraídas com o *Chelex* (Figura 9). Porém, isso não quer dizer que as amostras extraídas com o *Kit* não funcionariam, visto que escolhemos ao acaso apenas duas amostras para cada método. A

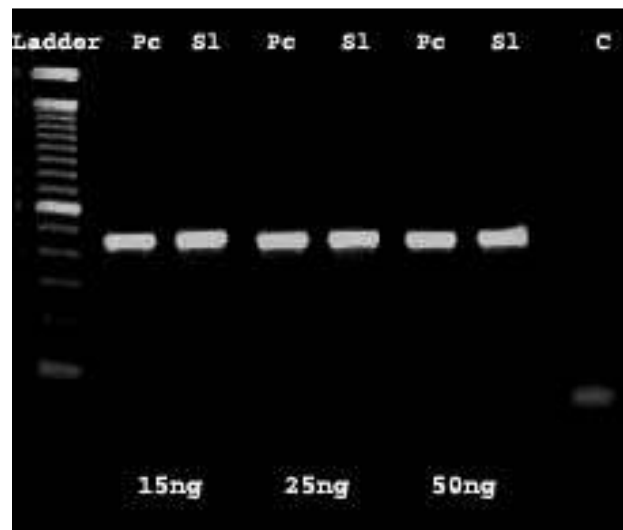
importância do teste foi verificar que as amostras extraídas com *Chelex* estavam sendo amplificadas.



**Figura 9** – Fragmentos RAPD amplificados nas amostras extraídas com o *Genomic Prep Cells and Tissues DNA Isolation Kit* (14 e 30) e com resina *Chelex* (48 e 59). Na primeira coluna está o ladder 100bp.

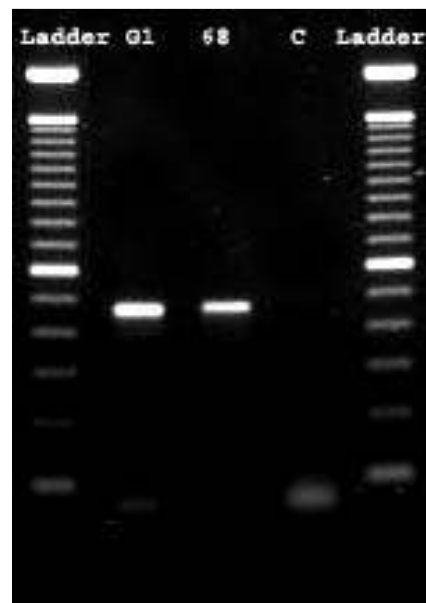
### 5.5 – Certificação da espécie

No teste com diferentes concentrações de DNA para a reação com os *primers* do citocromo b não foi verificada diferença na intensidade das bandas dos fragmentos (Figura 10). Por isso ficou estabelecido que a concentração de 25ng de DNA seria utilizada para as próximas reações.



**Figura 10** - Fragmentos em torno de 460 bp amplificados a partir de primers de citocromo b em amostras de *Pseudorca crassidens* (Pc) e *Stenella longirostris* (Sl) em diferentes concentrações de DNA (15, 25 e 50ng), visualizados em gel de agarose 1%. Ao lado das amostras estão o *ladder* e um controle (C) = branco.

Na avaliação da amostra 1 (tecido muscular de golfinho) e da amostra 68 (extraída com *Chelex*) foi possível notar que o fragmento amplificado da amostra de pele apresentou uma menor intensidade que o de músculo, mas foi um fragmento visível suficiente para ser realizado o seqüenciamento (Figura 11).



**Figura 11** - Fragmentos de 460 bp amplificados a partir de primers de citocromo b em amostra de músculo de golfinho (G1) e amostra de pele extraída com chelex, visualizados em gel de agarose 1%. Ao lado das amostras estão o ladder 100bp e um controle (C) = branco.

O resultado do GENBANK nos mostrou que uma das amostras enviadas realmente era de golfinho-rotador, *Stenella longirostris*, já a outra não era da espécie esperada e sim de *S. clymene*. A amostra 68, pele da Coleta A, também teve o resultado positivo para a espécie *S. longirostris*. A amostra de *Pseudorca crassidens* também foi confirmada para a espécie. Os valores de gi, score e e-value para cada análise encontra-se na tabela 3. Estes resultados também foram confirmados com o *site* DNA SURVEILLANCE.

**Tabela 3** - Valores de gi, score e e-value apresentados na comparação realizada no GENBANK para quatro amostras de delfínideos.

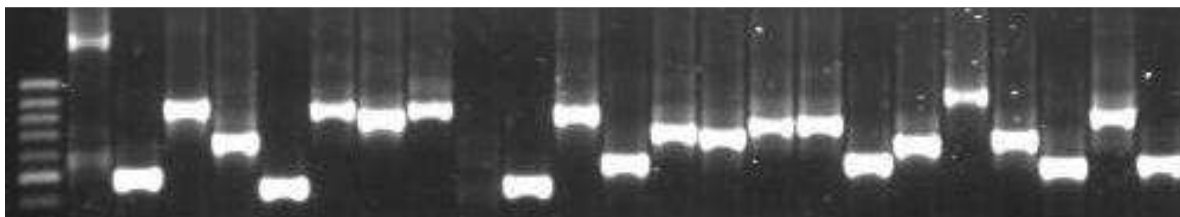
	<b>Amostra 1 = <i>S. longirostris</i></b>	<b>Amostra 2 = <i>S. clymene</i></b>	<b>Amostra 68 = <i>S. longirostris</i></b>	<b>Falsa-orca <i>P. crassidens</i></b>
gi	5870054	5870036	1199854	5870010
score	823	809	831	806
e-value	0.0	0.0	0.0	0.0

Com a confirmação de que a amostra 1 de tecido muscular é de *S. longirostris* foi possível dar início ao desenvolvimento dos microssatélites da espécie.

## 5.6 – Construção das bibliotecas genômicas

A enzima *Sau3AI* proporcionou melhores resultados na digestão do tecido muscular de golfinho-rotador. No entanto, devido ao fabricante ter deixado de disponibilizá-la passou-se a utilizar a enzima de restrição *MboI*. A troca não alterou os procedimentos posteriores porque ambas as enzimas reconhecem o mesmo sítio de restrição.

Com a construção das bibliotecas a partir do enriquecimento dos microssatélites, foram selecionadas 307 colônias brancas, com as quais foram realizadas reações com os *primers* M13. Após análise dos fragmentos gerados nessas reações, foram selecionados 288 clones que possuíam fragmentos entre 400 bp e 1.000 bp para seqüenciamento (Figura 12).



**Figura 12** – Fragmentos amplificados com os *primers* M13 em 22 clones. A seta branca indica o fragmento de 500 bp. Coluna 1 = *Ladder* 100 bp.

### 5.7 – Análise das seqüências e desenho dos *primers*

Com o protocolo de CRISTOFANI *et al.* (1998), 294 colônias foram avaliadas e 272 foram seqüenciadas. Destas, 90 apresentaram repetições do tipo microsatélites, o que representou uma eficiência de 33,09%. No entanto, quando foram avaliadas as seqüências, apenas duas delas possibilitaram o desenho de *primers* nas regiões flangeadoras, visto que as seqüências geradas eram na grande maioria redundantes ou curtas. Isso representou, portanto, uma eficiência de 2,22% na obtenção final dos pares de *primers* microsatélites.

Com o protocolo descrito no item materiais e métodos (CBMEG) das 307 colônias obtidas, 288 foram seqüenciadas. Destas, 104 apresentaram microsatélites, o que representou eficiência na obtenção de colônias positivas de 36,11%. Destas seqüências foi possível desenhar 22 pares de *primers*, o que representou uma eficiência de 21,15% com relação ao número de seqüências com microsatélites e 7,64% do total de clones seqüenciados.

O protocolo sugerido pelo CBMEG resultou em uma maior eficiência na obtenção de microssatélites quando comparado com o proposto por CRISTOFANI, *et al.* (1998). Dos 22 *primers* desenhados, 17 foram confeccionados. Dentre eles, sete apresentaram repetições perfeitas, três interrompidas, cinco interrompidas e compostas e duas compostas (Tabela 4).

Os marcadores microssatélites foram denominados de "Slo" por ser a abreviação das iniciais do nome científico da espécie *Stenella longirostris*. E o número representa a ordem crescente dos marcadores identificados (ex: Slo4).



**Tabela 4** – Loci microssatélites desenhados para a espécie *Stenella longirostris* com seus respectivos alelos e graus de heterozigidade.

<b>Loci</b>	<b>Sequências</b>	<b>Unidade de Repetição</b>	<b>Tipo</b>
<b>Slo1</b>	<b>F</b> - CAAACCAAAAGCAAACACACAC <b>R</b> - CATCTCTATCAGCCATGTCCAA	(AC) <sub>26</sub>	Perfeito
<b>Slo2</b>	<b>F</b> - TGCCTTTCCCTGTTATTCTCTC <b>R</b> - CCTTCTCCTCCTTCTGTCCTTT	(AC) <sub>9</sub> (CA) <sub>6</sub>	Composto
<b>Slo3</b>	<b>F</b> - CAAGCTCACAAATTAGGTCTCCC <b>R</b> - CTTCCCTTAACTCCTCCACAGA	(TC) <sub>9</sub>	Perfeito
<b>Slo4</b>	<b>F</b> - TAAGGTGAGAGGAGGTGGTGAT <b>R</b> - CACGGTTGAGAGAATACAGGAA	(CA) <sub>6</sub> (TA) <sub>2</sub> CATGC (AC) <sub>3</sub> (ATGC) <sub>2</sub> (AC) <sub>6</sub> (GCAC) <sub>4</sub> (AC) <sub>4</sub>	Interrompido e composto
<b>Slo5</b>	<b>F</b> - GAGGACTAAGGCTAATTTCCCA <b>R</b> - TCACACGTCAGAACCATGTC	(GT) <sub>16</sub>	Perfeito
<b>Slo6</b>	<b>F</b> - ATGAAAATGAGCCAGACTACCTG <b>R</b> - CGTGTGTGTGTATGTATGTATTCAGC	(TG) <sub>14</sub> (CA) <sub>6</sub>	Composto
<b>Slo7</b>	<b>F</b> - TATGAGCCTACAGGAGCAGTCA <b>R</b> - GTGCAAGCCCACACACAC	(CT) <sub>21</sub>	Perfeito
<b>Slo8</b>	<b>F</b> - GAGGTAAGTTCCAGCGTTTCAC <b>R</b> - GTTTCTGTCTGCGTGTGTGTTT	(A) <sub>17</sub>	Perfeito
<b>Slo9</b>	<b>F</b> - CCTTCTCCTCCTTCTGTCCTTT <b>R</b> - CTTCCCTCACTTTCCCTACCC	(TG) <sub>6</sub> C (GT) <sub>8</sub>	Interrompido
<b>Slo10</b>	<b>F</b> - CATCTCTATCAGCCATGTCCAA <b>R</b> - GTCTCTTTGGGGTTTGTAGGG	(TG) <sub>22</sub>	Perfeito
<b>Slo11</b>	<b>F</b> - ACCCAGACCCTCAAAGACCT <b>R</b> - TACAGGTATGCTGGTGAGTGGA	(CA) <sub>10</sub>	Perfeito
<b>Slo12</b>	<b>F</b> - AGATTCTGGTGAGAAAACGAC <b>R</b> - CAGCCTACACTCAAAGAAAGGG	(TC) <sub>8</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>2</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>4</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>7</sub>	Interrompido e composto
<b>Slo13</b>	<b>F</b> - AAACCTTGACATTTCTTTCCCC <b>R</b> - TCTGAGTGCTGTGTGTGTGTGT	(CA) <sub>2</sub> GA (CA) <sub>4</sub> (C) <sub>3</sub> (CA) <sub>2</sub>	Interrompido e composto
<b>Slo14</b>	<b>F</b> - GCAGGCAGAGAGAAGAAAGAAG <b>R</b> - GTGAAAGGAGGGTGGCATT	(GA) <sub>6</sub> G (GA) <sub>2</sub>	Interrompido
<b>Slo15</b>	<b>F</b> - CGTCAAACCTCCATCAAGACATC <b>R</b> - ATCTCCACCACAAGACACCAC	(TG) <sub>5</sub> TACG (TG) <sub>2</sub>	Interrompido
<b>Slo16</b>	<b>F</b> - GAGGTGAGAGAAAGGAGACGAG <b>R</b> - GTCCTCGGGTTTAGTTCTTCTG	(GA) <sub>3</sub> CA (GA) <sub>4</sub> CA (GA) <sub>2</sub> ... CAGA (CA) <sub>4</sub> (GA) <sub>3</sub> (CA) <sub>2</sub> (GA) <sub>3</sub>	Interrompido e composto
<b>Slo17</b>	<b>F</b> - TCTTCCCTTAACTCCTCCACAA <b>R</b> - CATTCCCTCCCTTCCCTTCTTT	(GA) <sub>2</sub> (G) <sub>5</sub> (GA) <sub>2</sub> (G) <sub>2</sub> (GA) <sub>4</sub> ... (GA) <sub>8</sub>	Interrompido e composto

### **5.8 – Teste de amplificação dos *primers***

Dos 17 pares de *primers* desenhados e confeccionados, dois não amplificaram (Slo5 e Slo7), mesmo com diversas modificações em suas reações. Os pares de *primers* Slo6, Slo8, Slo10 e Slo12 amplificaram, mas ainda necessitam de ajustes na reação para serem avaliados. Os outros 11 *primers* amplificaram e foram todos polimórficos. No entanto, dois destes não amplificaram em todos os indivíduos e, devido a estas falhas na genotipagem, foram excluídos das análises posteriores, restando para a análise populacional, portanto, nove marcadores. A temperatura de anelamento mais adequada para cada par de *primer* variou de 54°C (maioria dos loci) e 63°C (Tabela 5).

### **5.9 – Genotipagem dos golfinhos-rotadores**

O número de alelos dos nove pares de primers polimórficos avaliados variou de quatro a 10, e o tamanho dos alelos variou de 116 bp a 276 bp (Tabela 5). Um exemplo de como estes alelos foram visualizados no gel de poliacrilamida está apresentado na figura 13. Os valores do PIC dos nove marcadores variaram de 0,5192 a 0,78, sendo que o maior valor foi obtido para o marcador Slo9 e o menor para o marcador Slo14 (Tabela 5).

**Tabela 5** – *Loci* microssatélites avaliados com seu respectivo número de alelos, faixa de tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento ideal e PIC.

<b>Loci</b>	<b>n</b>	<b>Faixa de tamanho alélico (bp)</b>	<b>t (°C)</b>	<b>PIC</b>
<b>Slo1</b>	10	140-166	63	0,7317
<b>Slo2</b>	8	168-184	54	0,7268
<b>Slo3</b>	5	270-278	54	0,6971
<b>Slo4</b>	6	212-228	55	0,7256
<b>Slo9</b>	9	144-164	59	0,78
<b>Slo13</b>	6	220-230	63	0,7169
<b>Slo14</b>	4	116-122	59	0,5192
<b>Slo15</b>	9	218-252	54	0,7711
<b>Slo16</b>	5	158-166	54	0,5584

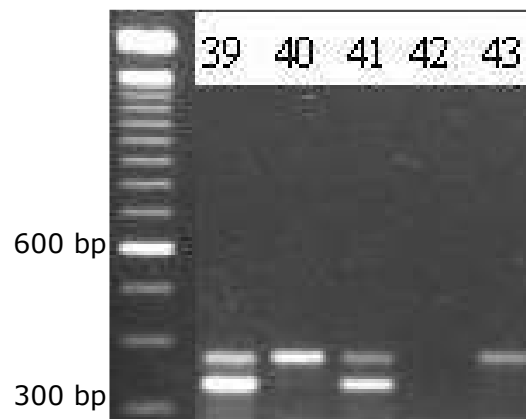
PIC = *Polymorphism Information Content*



**Figura 13** – Fragmentos microssatélites amplificados em 13 indivíduos coletados em 2006 (coleta b) a partir do par de *primer* do loco Slo15. Coluna 6 = *ladder* 10bp.

### 5.10 – Sexagem

Assim como ocorreu na amplificação dos marcadores microsatélites, o DNA de alguns indivíduos também falhou na reação de sexagem. Das amostras coletadas, um total de 100 teve o sexo determinado; destes, 27 foram identificados como fêmeas (apresentaram a banda de 382 bp) e 73 como machos (apresentaram as bandas de 339 bp e 382 bp), representando 73% (Figura 14). Destes 100, 82 estavam incluídos entre os animais avaliados como população única. Destes, 24 foram detectados como fêmeas e 58 como macho, o que representou 70,73% de machos.



**Figura 14** – Fragmentos de aproximadamente 339 bp e 382 bp amplificados nas reações de sexagem de cinco golfinhos-rotadores. A presença das duas bandas ocorre nos machos e a presença de uma banda nas fêmeas. Na 1ª coluna está apresentado o ladder 100 bp. A amplificação do indivíduo 42 falhou.

### 5.11 – Exclusão das amostras idênticas

Nove amostras foram excluídas das análises por apresentarem uma genotipagem idêntica para pelo menos sete *loci* e por isso serem supostamente réplicas de um mesmo animal. Destas, cinco foram amostradas em 2004 e quatro em 2006.

### 5.12 – Análises estatísticas

No teste de desequilíbrio de ligação verificou-se que três marcadores (Slo2, Slo13 e Slo14) dos nove avaliados se apresentavam ligados a outro marcador e por isso foram descartados das análises posteriores.

Nas avaliações de estruturação e diversidade genética da população dos golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha foram observados os resultados abaixo.

#### *Análise temporal*

Na comparação entre as amostras coletadas no período chuvoso (coleta A) e as amostras do período de seca (coleta B) não foi verificado valor estatístico significativo para a diferenciação destes grupos. A diversidade média entre os grupos foi de  $F_{ST} = 0,0535$  e o  $R_{ST} = 0,0891$ . O coeficiente médio de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi de 0,6615. Este valor demonstra que 5,35% de toda a variabilidade está entre os dois grupos e que 94,65% está dentro do grupo. A média de indivíduos migrantes foi de 4,4227 (Tabela 6).

Todos os *loci* apresentaram desvios significativos entre as frequências observadas e esperadas, um valor abaixo de 0,05 e, portanto, fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 7). Para ambos os grupos os *loci* apresentaram heterozigosidade bem menor que a esperada com uma

média de 0,237, exceção feita ao loco Slo15 que apresentou uma  $H_o$  de 0,6119 (Tabela 7). Assim, para todos os *loci* foi verificada uma deficiência de heterozigosidade.

Segundo o cálculo baseado na distância de Nei (1978), a identidade genética entre o grupo coletado na estação chuvosa e estação de seca foi de 0,7517 e a distância genética 0,2854.

A média do número de alelos foi de 7,4, sendo que o loco Slo1 foi o que apresentou o maior número, 10 alelos, que é um número considerável de alelos. No entanto, o número médio de alelos efetivos foi baixo (4,1146), sendo que o loco Slo 9 apresentou o maior índice (5,0751) (Tabela 8). Com relação aos *loci* avaliados, três alelos apareceram exclusivamente no Grupo A e seis no Grupo B (Tabela 9).

Tanto para o grupo das amostras coletadas em 2004 quanto para o grupo das amostras coletadas em 2006 foi possível verificar uma oscilação entre as freqüências alélicas, com alguns alelos aparecendo em freqüências bem maiores que outros (Figura 15). Para o grupo de 2004, o alelo F do loco Slo15 foi o que apresentou menor freqüência (0,0156); já o alelo que apresentou maior freqüência foi o B para o loco Slo14 (0,7308). Para este último loco foi verificada uma grande diferença entre as freqüências dos seus alelos (Figura 14). No grupo de 2006, os alelos que apresentaram a menor freqüência foi o alelo B do loco Slo1, o alelo D do Slo4, os alelos A, H e I do loco Slo9, o alelo A do loco Slo15 e D do loco Slo16 apresentaram a menor freqüência (0,0143). Já o que apresentou a maior freqüência foi o alelo C do loco Slo16 com freqüência de 0,6286 (Figura 15).

**Tabela 6** – Valores da diversidade dentro dos grupos ( $F_{IS}$ ), diversidade entre os grupos de golfinhos ( $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) e o número de migrantes para os cinco *loci* avaliados na análise temporal.  $F_{ST}$  (NEI, 1987);  $R_{ST}$  (MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996).

<b>Loco</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>R_{ST}</math></b>	<b><math>Nm^*</math></b>
<b>Slo1</b>	0,8266	0,0098	-0,0228	25,2288
<b>Slo4</b>	0,7391	0,0768	0,4168	3,0070
<b>Slo9</b>	0,7423	0,0799	0,3140	2,8776
<b>Slo15</b>	0,1942	0,0350	0,0479	6,8969
<b>Slo16</b>	0,9055	0,0727	0,3402	3,1877
Média	0,6615	0,0535	0,0891	4,4227

**Tabela 7** - Heterozigosidades observada e esperada determinadas segundo LEVENE (1949) na análise temporal, que inclui o grupo A (animais amostrados em 2004) e o grupo B (animais coletados em 2006). EHW = probabilidade de máxima verossimilhança para  $P < 0,05$ .

<b>Grupos</b>	<b>A</b>			<b>B</b>		
	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b>P</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b>P</b>
<b>Slo1</b>	0,0968	0,8017	0,0000	0,1509	0,7373	0,0000
<b>Slo4</b>	0,1724	0,7641	0,0000	0,1404	0,6494	0,0000
<b>Slo9</b>	0,0667	0,7525	0,0000	0,2679	0,7302	0,0001
<b>Slo15</b>	0,625	0,8323	0,0169	0,5862	0,7249	0,0151
<b>Slo16</b>	0,0000	0,4193	0,0000	0,1091	0,5745	0,0000
<b>Média</b>	0,1422	0,6746	-	0,1831	0,6648	-
<b>DP</b>	0,2083	0,1723	-	0,1874	0,0717	-

**Tabela 8** - Número de alelos observado (na), número de alelos efetivo (ne) (Kimura & Crow, 1964), Índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e riqueza alélica (RA) determinados para loco microssatélite na análise temporal dos grupos de golfinhos-rotadores. DP= Desvio Padrão.

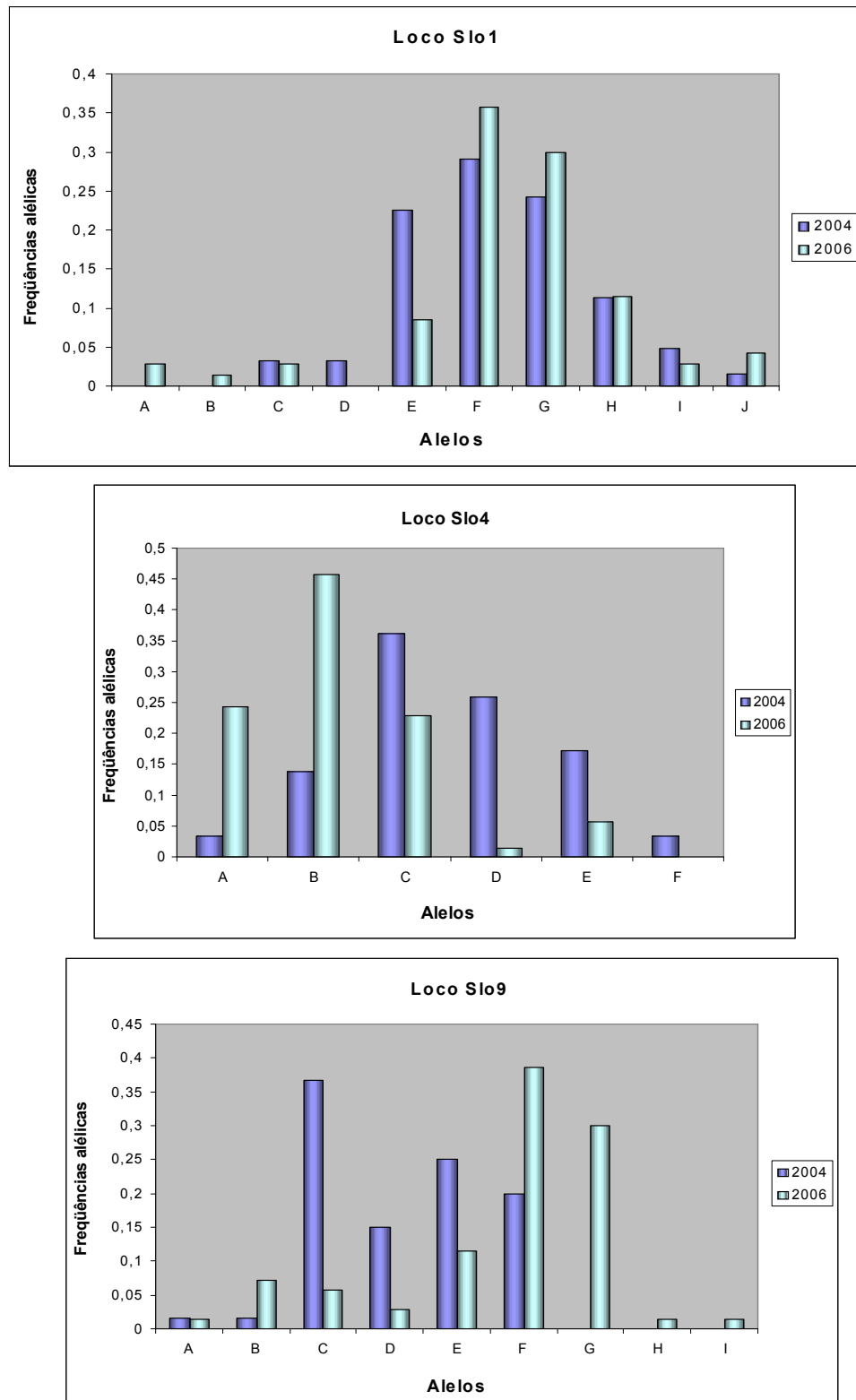
<b>Loci</b>	<b>na</b>	<b>ne</b>	<b>RA</b>	<b>I</b>
<b>Slo1</b>	10	4,5422	8,323	1,7526
<b>Slo4</b>	6	4,3275	5,649	1,5724
<b>Slo9</b>	9	5,0751	7,396	1,7740
<b>Slo15</b>	8	4,6494	7,858	1,7952
<b>Slo16</b>	4	1,9787	3,672	0,8978
<b>Média</b>	7,4	4,1146	6,5796	1,5584
<b>DP*</b>	2,4083	1,2246	1,9115	0,3797

**Tabela 9** - Alelos privados para os grupos A (coleta de 2004) e B (coleta de 2006) determinados na avaliação temporal.

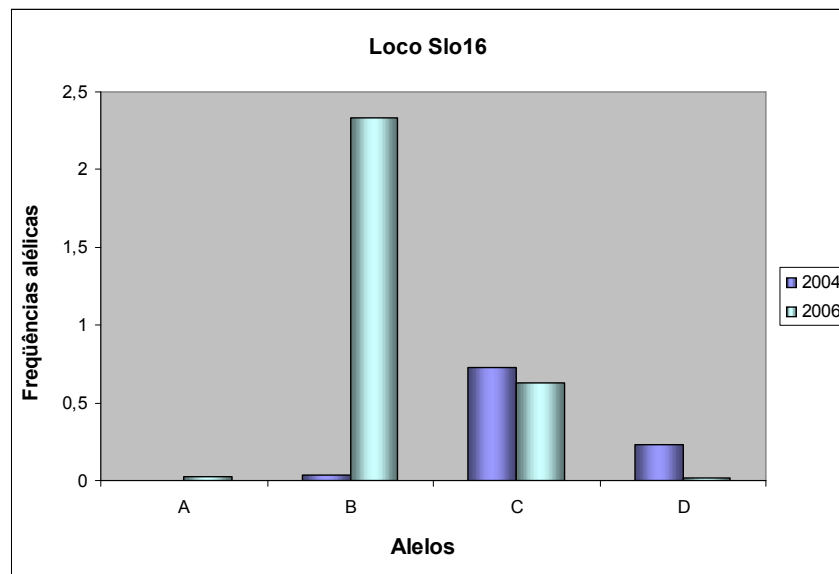
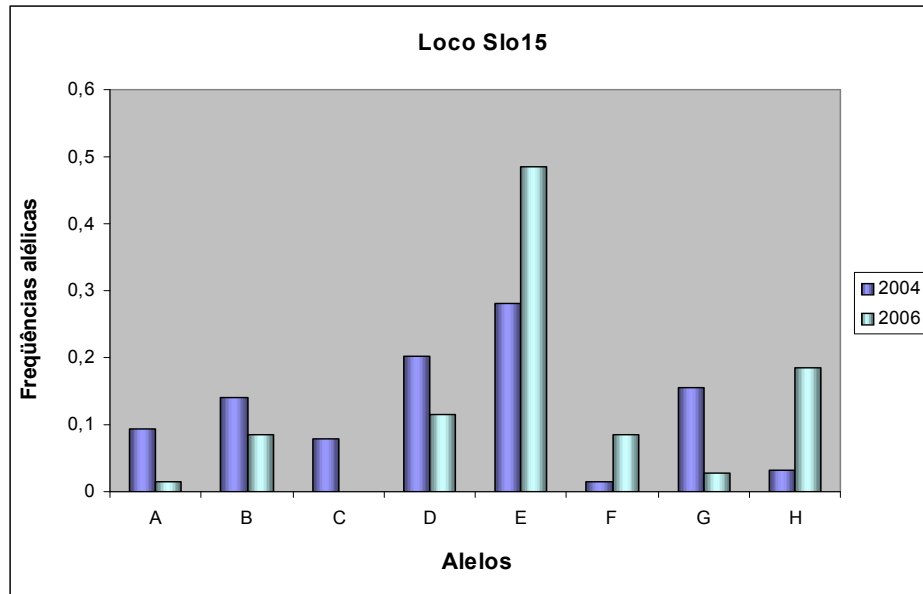
<b>Loci</b>	<b>Alelos privados</b>	
	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
<b>Slo1</b>	D	A e B
<b>Slo4</b>	F	
<b>Slo9</b>		G, H e I
<b>Slo15</b>	C	
<b>Slo16</b>		A



**Figura 15** – Frequências alélicas para cada loco microssatélite encontradas na análise temporal.



## Continuação da Figura 15.



### Análise espacial

Na segunda análise, quando se estudou uma possível separação dos golfinhos de Noronha com relação ao seu ponto de coleta, também não foi observado valor estatisticamente significativo. Os valores médios da diversidade entre os grupos foram de  $F_{ST} = 0,0442$  e  $R_{ST} = -0,012$ . A diversidade média dentro dos grupos ou o coeficiente de endogamia foram  $F_{IS} = 0,74$ . A média de indivíduos migrantes foi de 5,4108 (Tabela 10). A identidade genética e distância genética entre os grupos conforme NEI (1978) estão apresentadas na tabela 11.

Do mesmo modo que na análise temporal, os *loci* não se apresentaram em EQW e apresentaram na sua maioria heterozigosidade observada bem menor que a esperada com uma de  $H_0$  igual a 0,19, sendo a exceção o loco Slo15 com uma  $H_0$  de 0,5938 (Tabela 12).

A média de alelos foi de 7,5, já a média de alelos efetivos e do Índice de Shannon foram de 3,9047 e 1,5413, respectivamente (Tabela 13).

As diferentes freqüências alélicas para cada *loci* nos três grupos estão apresentadas na figura 15. Para o grupo Entre Ilhas, o alelo I do loco Slo9 apresentou a menor freqüência (0,0082); já o alelo que apresentou maior freqüência foi o mesmo da análise temporal, o alelo C para o loco Slo16 (0,6786) (Figura 16). No grupo Porto, os alelos C, G e H do loco Slo15 foram os que apresentaram menor freqüência com um valor de 0,0385, e o alelo G para o loco Slo9 como o de maior freqüência, 0,5. O Grupo Praias apresentou como os alelos B e H do Slo 9 de menor freqüência com 0,0227, e o de maior freqüência o alelo C do loco Slo16 com 0,55 (Figura 16). Após a análise das freqüências alélicas para os *loci*, verificaram-se dez alelos privados para o

Grupo Entre Ilhas, um par ao Grupo Porto e um para o grupo Praias (Tabela 14).

**Tabela 10** - Valores da diversidade dentro dos grupos ( $F_{IS}$ ), diversidade entre os grupos de golfinhos ( $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) e o número de migrantes para os seis *loci* avaliados na análise espacial.  $F_{ST}$  (NEI, 1987);  $R_{ST}$  (MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996).

<b>Loco</b>	<b>Nm*</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>R_{ST}</math></b>
<b>Slo1</b>	28,9393	0,9141	0,0086	-0,0243
<b>Slo3</b>	5,4620	1,0000	0,0438	0,0792
<b>Slo4</b>	4,2297	0,8390	0,0558	0,0281
<b>Slo9</b>	5,6234	0,6434	0,0426	-0,0025
<b>Slo15</b>	3,5666	0,2251	0,0655	-0,0168
<b>Slo16</b>	4,8450	0,8690	0,0491	-0,01
Média	5,4108	0,74	0,0442	-0,012

**Tabela 11** - Identidade e distância genética entre os grupos avaliados na análise espacial para os diferentes pontos de coleta. A = Entre Ilhas; B = Porto; C = Praias. Valores segundo Nei (1978).

<b>Grupo I / D</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>A</b>	****	0,7863	0,9010
<b>B</b>	0,2404	****	0,8147
<b>C</b>	0,1043	0,2050	****

**Tabela 12** – Heterozigosidades observada e esperada determinadas segundo Levene (1949) na análise espacial, que inclui os grupos A, B e C (animais coletados nas áreas determinadas como Entre Ilhas, Porto e Praias), respectivamente.

Grupos	A		B		C	
	H <sub>o</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>E</sub>
<b>Slo1</b>	0,1833	0,7810	0,0000	0,6753	0,0000	0,7340
<b>Slo3</b>	0,0000	0,7597	0,0000	0,6275	0,0000	0,6253
<b>Slo4</b>	0,2063	0,7464	0,0833	0,7645	0,0556	0,6905
<b>Slo9</b>	0,1311	0,7888	0,4000	0,7000	0,2727	0,8256
<b>Slo15</b>	0,5902	0,7116	0,6154	0,8154	0,5909	0,8478
<b>Slo16</b>	0,0536	0,5008	0,0909	0,7749	0,1000	0,6462
<b>Média</b>	0,1941	0,7147	0,1983	0,7263	0,1699	0,7282
<b>DP</b>	0,2091	0,1083	0,2522	0,0705	0,2296	0,0923

EHW = probabilidade de máxima verossimilhança para  $P < 0,05$ .

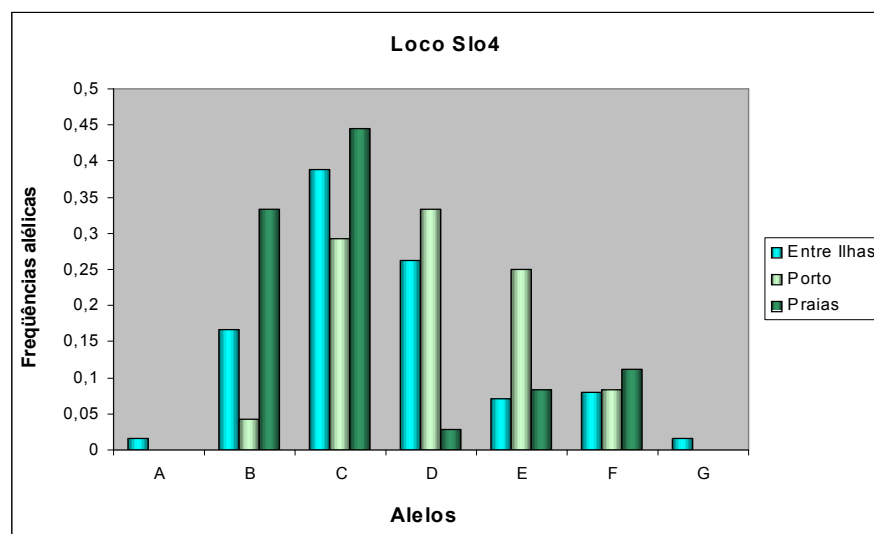
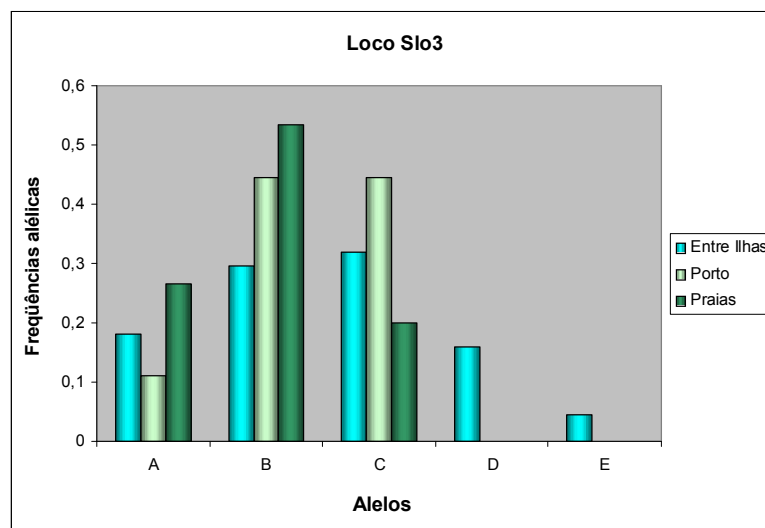
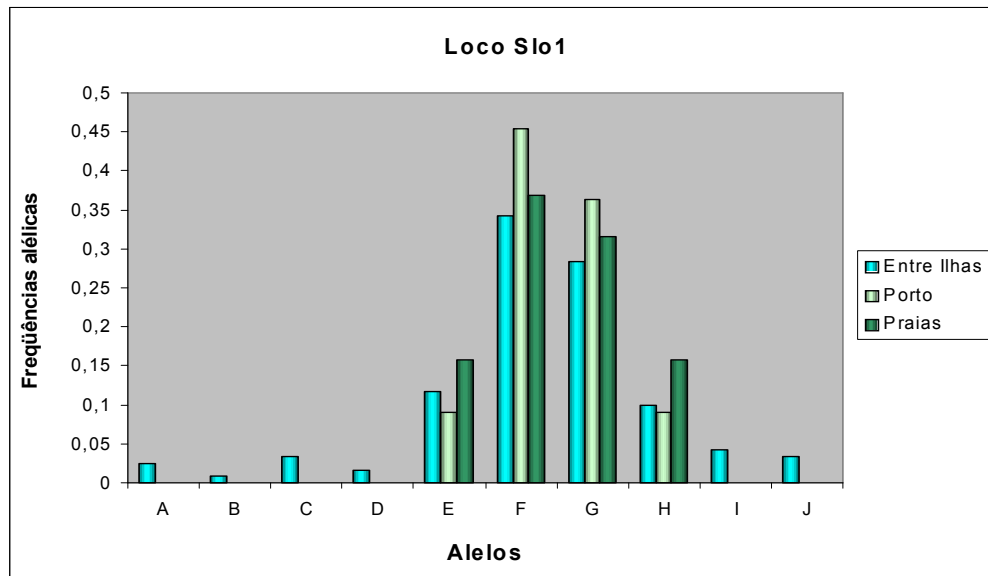
**Tabela 13** – Número de alelos observado (na), número de alelos efetivo (ne) (Kimura & Crow, 1964) Índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e riqueza alélica (RA) determinados para loco microsatélite na análise temporal dos grupos de golfinhos-rotadores. DP= Desvio Padrão.

Locus	na	ne	I	RA
<b>Slo1</b>	10	4,0020	1,6459	5,4776
<b>Slo3</b>	5	3,5901	1,3848	4,297
<b>Slo4</b>	7	3,9802	1,5485	5,012
<b>Slo9</b>	9	4,8782	1,7418	5,698
<b>Slo15</b>	9	4,5988	1,7941	6,312
<b>Slo16</b>	5	2,3787	1,1330	3,941
<b>Média</b>	7,5	3,9047	1,5413	5,1229
<b>DP*</b>	2,1679	0,88	0,2475	0,8901

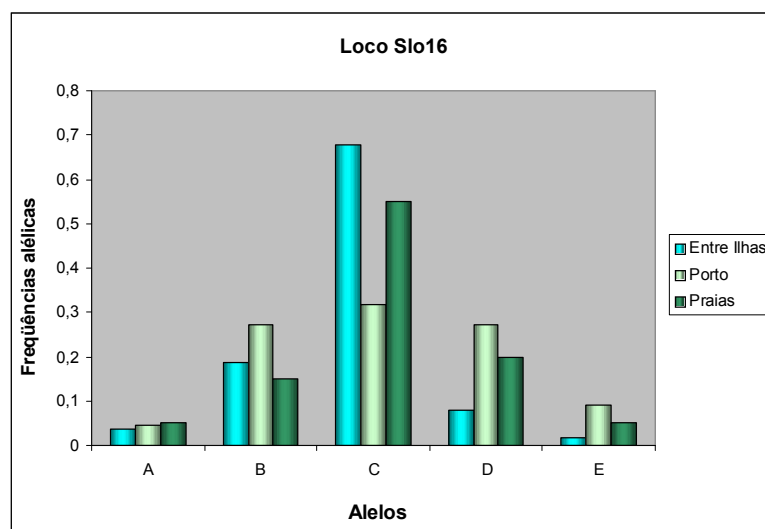
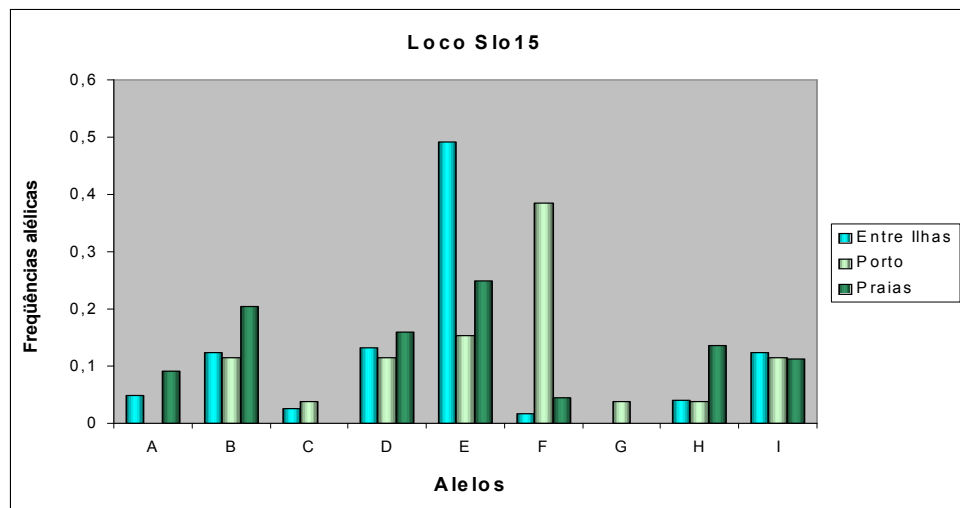
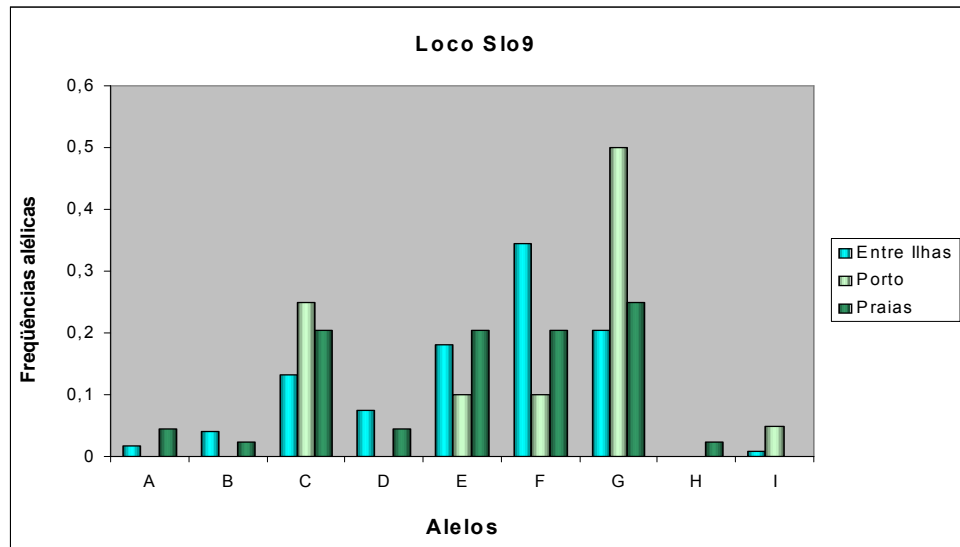
**Tabela 14** - Alelos privados para os grupos de animais coletados nos pontos A, B e C, que correspondem aos animais coletados nas áreas determinadas como Entre Ilhas, Porto e Praias), respectivamente.

Loco	Alelos privados		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
<b>Slo1</b>	A, B, C, D, I e J		
<b>Slo3</b>	D e E		
<b>Slo4</b>	A e G		
<b>Slo9</b>			H
<b>Slo15</b>		G	
<b>Slo16</b>			

**Figura 16** – Freqüências alélicas para cada loco microsatélite encontradas na análise espacial, que inclui três grupos: Entre Ilhas, Porto e Praias.



Continuação da Figura 16.





---

### *Análise intrapopulacional*

Todos os golfinhos-rotadores coletados em Fernando de Noronha para avaliação de diversidade genética foram considerados como sendo de uma única população. Nesta análise foi verificado um alto coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$  médio= 0,7394) (Tabela 15).

Os seis *loci* não se apresentaram em EHW para a população e apresentaram heterozigosidade observada menor que a esperada, apresentando uma média de 0,19, sendo a exceção o loco Slo15 que apresentou uma heterozigosidade de 0,5938. O loco Slo3 apresentou uma heterozigosidade observada de zero (Tabela 15).

Todos os marcadores apresentaram-se neutros considerando-se o limite inferior e superior de 95% de confiabilidade (Tabela 16). O número de alelos variou de cinco a dez e o número médio de alelos efetivos e o Índice de Shannon foram de 3,8944 e 1,5344, respectivamente. A riqueza alélica variou de 5,000 a 9,676 e a média foi de 7,162 (Tabela 17). As freqüências alélicas variaram de 0,0052 a 0,6034, sendo o valor mínimo o do alelo G do loco Slo15 e o máximo do alelo C do loco Slo16 (Figura 17).

A análise realizada pelo programa BOTTLENECK demonstrou que todos os *loci* se apresentaram em equilíbrio mutação-deriva, considerando-se o modelo TPM no teste de WILCOXON. A análise da distribuição das freqüências alélicas revelou uma distribuição em forma de L, o que demonstra que a população estudada não apresentou uma experiência recente de efeito gargalo que afetasse sua variabilidade genética.

**Tabela 15** - Heterozigosidades observada e esperada determinadas segundo Levene (1949), e o índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) para os golfinhos-rotadores na análise intrapopulacional.

<b>Loco</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>E</sub></b>	<b>F<sub>IS</sub></b>
<b>Slo1</b>	0,1222	0,7543	0,8371
<b>Slo3</b>	0,0000	0,7268	1,0000
<b>Slo4</b>	0,1613	0,7528	0,7835
<b>Slo9</b>	0,1935	0,7993	0,7565
<b>Slo15</b>	0,5938	0,7866	0,2413
<b>Slo16</b>	0,0690	0,5830	0,8810
Média	0,19	0,7331	0,7394

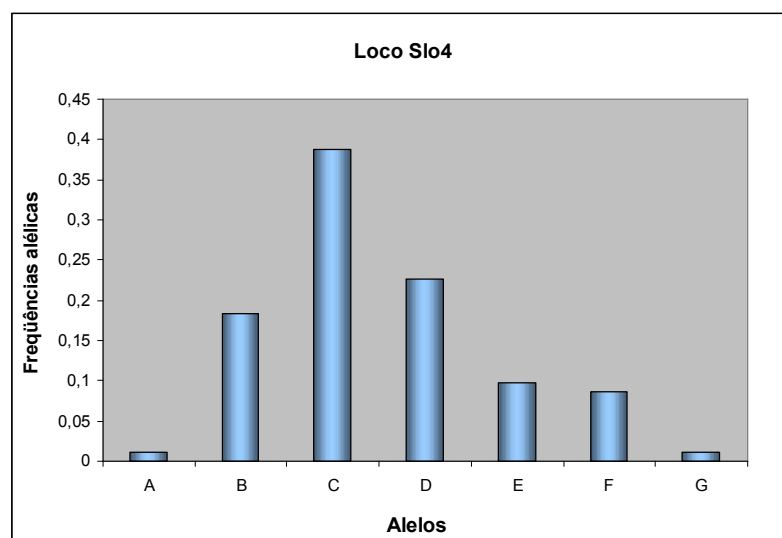
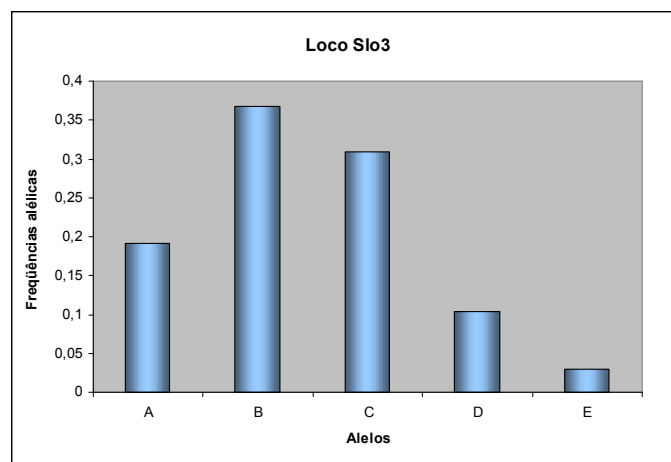
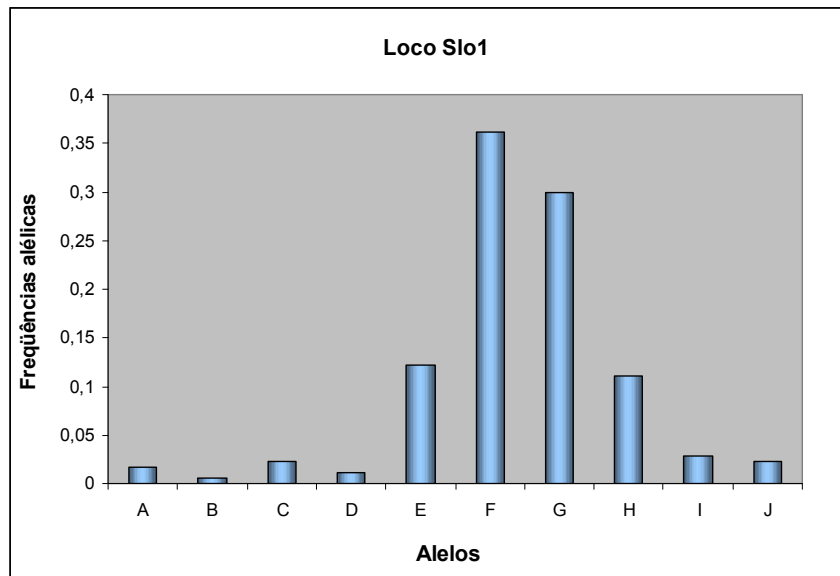
**Tabela 16** – Teste de neutralidade (MANLY, 1985) para os *loci* microssatélites na análise intrapopulacional.

<b>Locus</b>	<b>F<sub>o</sub></b>	<b>EPM</b>	<b>L95</b>	<b>U95</b>
<b>Slo1</b>	0,2429	0,3075	0,1656	0,6073
<b>Slo3</b>	0,2785	0,5094	0,2667	0,8735
<b>Slo4</b>	0,2552	0,4663	0,2419	0,8378
<b>Slo9</b>	0,2050	0,3379	0,1790	0,6520
<b>Slo15</b>	0,2174	0,3388	0,1803	0,6587
<b>Slo16</b>	0,4204	0,5257	0,2758	0,8895

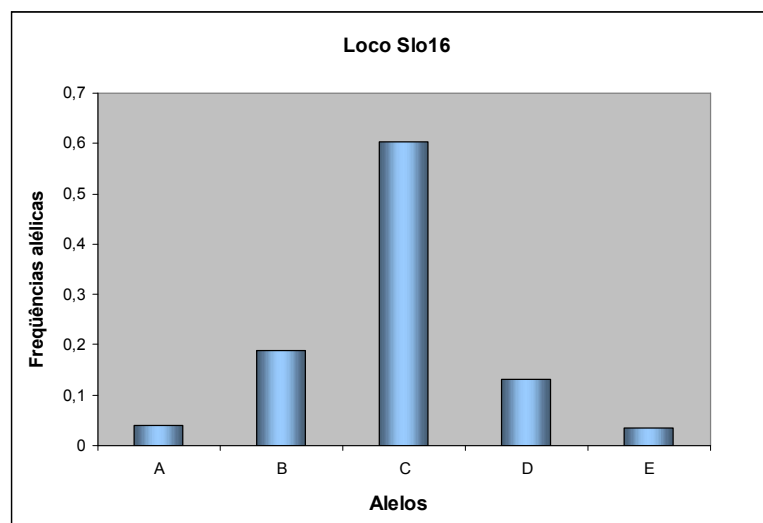
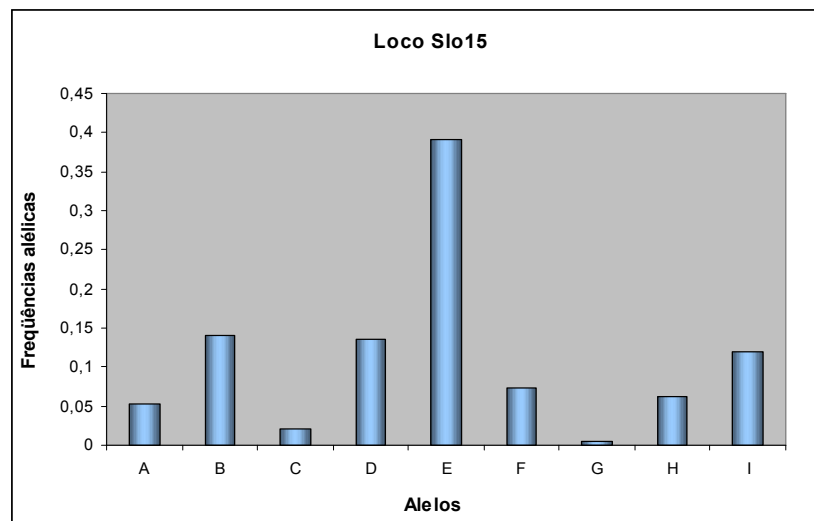
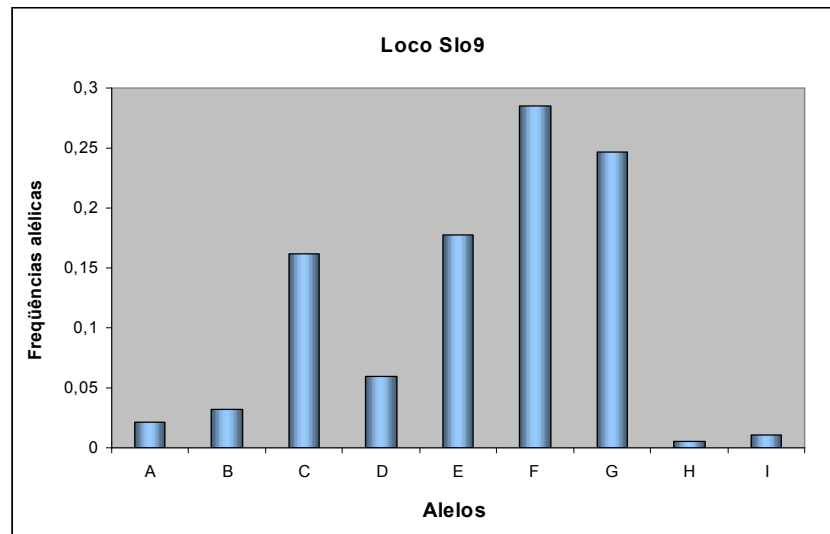
**Tabela 17** – Número de alelos observado (na), número de alelos efetivo (ne) (Kimura & Crow, 1964) Índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e riqueza alélica (RA) determinados para loco microssatélite na análise temporal dos grupos de golfinhos-rotadores. DP= Desvio Padrão.

<b>Locus</b>	<b>na</b>	<b>ne</b>	<b>RA</b>	<b>I</b>
<b>Slo1</b>	10	4,002	9,676	1,6459
<b>Slo3</b>	5	3,5901	5,000	1,3847
<b>Slo4</b>	6	3,9189	5,929	1,5070
<b>Slo9</b>	9	4,8782	8,665	1,7418
<b>Slo15</b>	9	4,5988	8,702	1,7941
<b>Slo16</b>	5	2,3787	5,000	0,2813
<b>Média</b>	7,3333	3,8944	7,162	1,5344
<b>DP*</b>	2,2509	0,8793	2,0889	0,2479

**Figura 17** – Frequências alélicas para cada loco microssatélite encontradas na análise intrapopulacional.



## Continuação da Figura 17.



### 5.13 – Amplificação dos microssatélites em outras espécies

Dos 11 primers que amplificaram para *Stenella longirostris*, nove amplificaram nas outras três espécies de cetáceos avaliadas (*Stenella clymene*, *Sotalia guianensis* e *Pseudorca crassidens*). Destes, seis tiveram resultado positivo para as três espécies, dois amplificaram para pelo menos duas delas e um para somente uma. Os dois pares de primers que não amplificaram para nenhuma das espécies foram os Slo13 e Slo17 (Tabela 18).

**Tabela 18** – Amplificação dos loci microssatélites em outras espécies de cetáceos.  
(+) = amplificação; (-) = não amplificação.

<b>Locus</b>	<b><i>Stenella clymene</i></b>	<b><i>Sotalia guianensis</i></b>	<b><i>Pseudorca crassidens</i></b>
<b>Slo1</b>	+	+	+
<b>Slo2</b>	+	+	+
<b>Slo3</b>	+	+	+
<b>Slo4</b>	+	-	+
<b>Slo9</b>	+	+	+
<b>Slo11</b>	+	+	+
<b>Slo13</b>	-	-	-
<b>Slo14</b>	+	+	+
<b>Slo15</b>	-	+	+
<b>Slo16</b>	-	+	-
<b>Slo17</b>	-	-	-

## 6 – DISCUSSÃO

### *Raspagem de pele*

HARLIN *et al.* (1999) descreveram um método de amostragem de pele para os golfinhos obscuros (*Lagenorhynchus obscurus*) por raspagem e que foi reproduzido em nosso estudo para *Stenella longirostris*, tendo sido bem sucedido. A espécie *S. longirostris* também apresenta o comportamento de acompanhar embarcações a uma distância suficiente para que seja realizado o contato com a esponja. Entretanto, sugere-se aqui que para golfinhos-rotadores se empregue uma haste de madeira mais longa (130 cm) para a confecção do amostrador, pois esta permitiu maior eficiência no contato. Como no estudo com os golfinhos obscuros, os golfinhos-rotadores também apresentaram pouca aversão aos contatos realizados com o amostrador. Isto pôde ser confirmado pelos pesquisadores no momento da coleta e pelos dados moleculares, já que nove indivíduos foram supostamente tidos como animais coletados mais de uma vez. Isto demonstra que o método de raspagem não acarreta um grande trauma para o animal, já que estes, mesmo tendo sido tocados uma vez, retornaram à frente do barco. Este comportamento também foi evidenciado com indivíduos que apresentavam marcas naturais (por isso, facilmente identificados), que após o contato continuaram acompanhando a embarcação, mas mantiveram-se a uma distância que não permitiu um novo contato, mesmo em dias diferentes de coleta. Portanto, visto que a quantidade de pele amostrada é suficiente para análises tanto de DNA mitocondrial quanto de DNA nuclear (DNA não avaliado no estudo de golfinhos obscuros), o método de raspagem pode ser considerado uma ótima alternativa para coletar amostras de pele de golfinhos-rotadores.

Para que as coletas de tecido dos golfinhos-rotadores em Fernando de Noronha pudessem ser feitas, muitas dificuldades foram enfrentadas pelos pesquisadores. Dentre estas, podem ser citadas: primeiramente, foi necessário escolher um método de coleta de tecido pouco invasivo, já que a realização de biópsias dos animais com microarpoons (procedimento usual até pouco tempo atrás, mesmo para cetáceos de pequeno porte) poderia criar dificuldades para obter uma licença junto ao IBAMA. Isto decorre do fato que Fernando de Noronha está delimitado por uma Área de Proteção Ambiental (APA) e um Parque Nacional Marinho; além disso, existe uma legislação de proteção aos golfinhos-rotadores, por ser o Arquipélago um refúgio natural da espécie; A segunda dificuldade foi a demora na obtenção das licenças de coleta e manipulação do material biológico, que foram expedidas pelo IBAMA; Além disso, foi necessário o apoio logístico para as coletas no mar (gasolina, barco, etc), que foi cedido pelo Centro Golfinho Rotador e pelo IBAMA, e também improvisar uma infra-estrutura laboratorial devido aos limitados recursos deste tipo no Arquipélago. Foi necessário levar equipamentos (pipetas, termômetro, centrífuga, etc) e reagentes para a realização do teste de extração e, mesmo assim, a parte da quantificação teve que ser realizada em um laboratório em Recife.

#### *Extração de DNA*

A quantidade de pele observada por HARLIN *et al.*, 1999 como a mais adequada para as análises genéticas pode ser considerada a mesma classificada por (++) em nosso estudo. No entanto, o método de extração realizado por eles não foi o mais adequado para as amostras de *Stenella longirostris*. Para a extração é sugerido que seja removida a pele da esponja



antes de ser iniciado o processo. Neste estudo o melhor método foi o de extração com a resina *Chelex*, que exigiu uma pequena quantidade de pele de cada amostra, resultando em um maior volume de solução e promovendo a possibilidade de estocagem do material epidérmico restante para futuras extrações. No entanto, para novos estudos outros métodos de extração podem ser estudados como alternativas para substituir a resina, já que os DNAs de alguns indivíduos amostrados na primeira coleta não amplificaram, tornando-se necessária uma nova extração. Isto pode ser devido ao fato de uma pequena quantidade de pele ter sido aderida na esponja no momento da coleta (amostras +/-), e ter resultado em um DNA de baixa qualidade, ou quantidade ou a resina *Chelex* estar promovendo uma maior degradação do DNA do que outros métodos após um mesmo período de estocagem. Como nem sempre é possível a obtenção de amostras (++), o método de extração de DNA deve ser o mais sensível possível para que as amostras que apresentem pouca pele aderida à esponja também sejam aproveitadas.

Mesmo que o DNA de alguns indivíduos tenha falhado para certos marcadores, o número considerável de amostras permitiu que estas amostras problemáticas fossem excluídas e o número restante de animais fosse ainda suficiente para serem realizadas as análises populacionais.

#### *Identificação das amostras de músculo para construção das bibliotecas*

Um dos cuidados que foi tomado para a construção das bibliotecas genômicas para a espécie *Stenella longirostris* foi assegurar que a amostra de músculo do animal enalhado a ser utilizada não tinha sofrido nenhum erro de identificação, o que poderia colocar em risco o trabalho. Para isso, o primeiro passo foi utilizar o GENBANK. No entanto, devido à existência de certo

questionamento na comunidade científica a respeito da confiabilidade das seqüências depositadas neste banco de dados utilizou-se como reforço o *site* DNA SURVEILLANCE (<http://www.cebl.auckland.ac.nz:9000>), que realiza uma análise filogenética com seqüências de diversos cetáceos presentes no banco.

Apesar dos resultados de ambos os bancos de dados tenham indicado que uma das amostras de músculo era de *Stenella clymene*, estudos mais aprofundados serão realizados para que se possa confirmar ou refutar a hipótese de existência desta espécie em Fernando de Noronha. A identificação molecular da espécie no Arquipélago vem de encontro com um estudo ecológico realizado com a mesma população, no qual os pesquisadores sugerem uma possível existência de animais de *S. clymene* em Fernando de Noronha que estariam convivendo e talvez se acasalando com os golfinhos-rotadores (SILVA JR. *et al.*, 2005).

### *Sexagem*

O maior número de machos amostrados (cerca de 70%) corrobora a idéia de que os grupos de golfinhos acompanhantes das embarcações são machos adultos e jovens que se separam do grupo principal e acompanham os barcos mantendo, desta forma, as fêmeas e os filhotes afastados (NORRIS *et al.*, 1985). Além dos dados moleculares, neste estudo os pesquisadores observaram no campo que, na maioria das vezes em que um agrupamento de golfinhos era avistado e a embarcação se aproximava, uma divisão do grupo principal dos golfinhos ocorria, sendo que um dos sub-grupos passava a acompanhar o inflável enquanto o outro se distanciava, mantendo uma distância segura. Ao se observar atentamente os grupos afastados muitas vezes foram identificadas fêmeas acompanhadas pelos seus filhotes.

### Construção dos Microssatélites

De acordo com ZANE *et al.* (2002) a utilização do método tradicional de isolamento de microssatélites resulta em uma taxa média de clones positivos (presença de seqüências microssatélites) para os mamíferos de 1,67%, sendo o mínimo de 0,13 e o máximo de 4,5%. Já com o método no qual se realiza hibridização seletiva com partículas magnéticas (utilizado neste estudo) a eficiência pode variar de 20% a 90% na identificação de clones positivos. Neste estudo, a utilização do primeiro protocolo (sugerido por CRISTOFANI *et al.*, 1998) promoveu uma eficiência foi de 33,09% e com o segundo, modificação do sugerido pelo CBMEG, foi de 36,11%. Apesar dos valores serem bem próximos, considerando-se todo o processo de construção das bibliotecas enriquecidas, que resulta na identificação de pares de *primers* microssatélites, o método utilizado no CBMEG apresentou uma maior eficiência quando comparado ao processo inicialmente desenvolvido sugerido por CRISTOFANI *et al.*, (1998). Já que este último identificou seqüências com microssatélites curtos ou redundantes que impossibilitavam o desenho dos *primers*.

A eficiência da utilização do segundo protocolo também foi maior para a obtenção de seqüências contendo repetições microssatélites quando se comparou o resultado deste estudo com outros desenvolvidos para espécies de cetáceos, no entanto a eficiência para obtenção dos pares de *primers* apresentou um valor bem próximo. Como citado acima, a eficiência na obtenção de seqüências com microssatélites foi de 36,11%. De 104 seqüências positivas foram desenhados 22 pares de primers (21,15%). Em CALDWELL *et al.* (2002) foram seqüenciadas 24 colônias positivas para GT, e a partir destas, foram desenhados cinco marcadores para a espécie *Tursiops truncatus* (golfinho

nariz-de-garrafa), uma eficiência de 20,84%, no entanto eles relatam ter avaliado um número bem maior de colônias (150000 para as bibliotecas GT e AAT). Para a mesma espécie, ROSEL *et al.* (2005) seqüenciaram diretamente 3080 colônias, 48 continham microssatélites do tipo CA (1,56%) e foram obtidos 13 marcadores, o que representa uma eficiência de 27,08% para a identificação de pares de *primers*.

### *Análise dos microssatélites*

Dos 17 marcadores desenhados, nove foram avaliados na população, sendo que o número de alelos variou de quatro a 10 para os *loci*. Apesar de ser um número de alelos considerado razoável, uma baixa heterozigosidade foi detectada para quase todos os *loci* (exceto loco Slo15). Para estes *loci* ficou evidenciada uma deficiência de heterozigotos.

A baixa heterozigosidade em uma população pode ocorrer devido à presença de alelos nulos, sistema reprodutivo preferencial (quando as fêmeas permitem que machos aparentados realizem a cópula e os outros machos não), efeito Wahlund (sub-estruturação populacional), seleção ou endogamia (ADAMS & ROSEL, 2006). A deficiência de heterozigosidade já foi detectada em outros estudos de cetáceos (ROONEY *et al.*, 1999; WALDICK *et al.*, 1999; WALDICK *et al.*, 2002; ADAMS & ROSEL, 2006; COUGHLAN *et al.*, 2006).

O efeito Wahlund é um fenômeno que leva a uma baixa frequência observada de heterozigotos quando duas ou mais sub-populações são testadas como uma população panmítica (WAHLUND, 1928). Como dois testes de estruturação foram realizados na população avaliada, o efeito Wahlund não parece ser o responsável pela baixa heterozigosidade encontrada nos golfinhos-rotadores.

Embora os *primers* tenham identificado uma baixa heterozigidade para a população de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha, isto não significa que um maior número de heterozigotos não possa ser detectado por eles quando forem avaliadas populações de outras localidades. Os marcadores desenvolvidos e testados neste estudo podem ser considerados marcadores informativos e adequados para outras análises de *Stenella longirostris*, pois além de apresentarem um número de alelos razoável, apresentaram um PIC acima de 0,5. O valor do PIC depende do número de alelos de um loco, bem como a distribuição de suas frequências. Valores acima de 0,5 são considerados o ideal para identificação de bons marcadores (BOTSTEIN *et al.*, 1980). Além disso, a maioria dos *primers* desenvolvidos para a espécie *Stenella longirostris* amplificou para outras espécies (*Sotalia guianensis*, *S. clymene* e *Pseudorca crassidens*) e que após uma melhor caracterização com grupos maiores de indivíduos poderão ser utilizados em estudos genéticos das referidas espécies.

#### *Estruturação e diversidade genética dos golfinhos-rotadores*

As análises estatísticas demonstraram que provavelmente não existe estruturação ou diferenciação genética entre os grupos de golfinhos-rotadores coletados em Fernando de Noronha, tanto com relação às estações chuvosa e seca, quanto aos diferentes locais de amostragem. Isto sugere que todos os golfinhos amostrados fazem parte de uma única população; talvez um número maior de amostras seja necessário para a análise espacial, já que o segundo grupo apresentou apenas 13 animais e o terceiro 22.

A baixa taxa de heterozigosidade observada nos grupos avaliados, tanto na análise temporal quanto na espacial, e o alto coeficiente de endogamia não estão associados a uma baixa variabilidade genética para a população já que o número alélico dos *loci* foi relativamente alto e suas freqüências bem variáveis.

Pode parecer que a alta variabilidade genética seja algo previsto para os cetáceos, pois estes apresentam ampla área de distribuição, percorrem grandes distâncias e apresentam populações com grande número de indivíduos. Entretanto, é possível que populações destes animais apresentem baixo valor de diversidade genética, principalmente quando uma pequena distância geográfica sem barreiras é considerada (PICHLER *et al.*, 1998; PICHLER & BAKER, 2000; BAKER *et al.*, 2002). Em algumas espécies de odontocetos, grandes distâncias separando diferentes populações podem não acarretar grande distâncias genéticas entre elas. A menor diferenciação genética no grupo dos cetáceos foi verificada entre baleias fin amostradas próximas ao Círculo Polar Antártico e no Pacífico Norte na Península de Kamchatka (Rússia). Cerca de 500 baleias foram comparadas e a distância genética de Nei variou de 0,0004 a 0,0007. Estes e outros estudos ressaltam que a distância geográfica e diferenciação genética necessariamente não estão diretamente relacionadas neste grupo, tornando necessária a investigação dos padrões filogeográficos para diferentes populações nas diferentes espécies de cetáceos (HOELZEL, 1998).

Um alto coeficiente de endogamia ( $F_{is} = 0,739$ ) foi identificado para os golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha, o que sugere que 74% dos acasalamentos parecem estar sendo realizados entre indivíduos aparentados.

Como não existem informações sobre comportamento reprodutivo preferencial na espécie, os resultados obtidos parecem indicar que a população é quase ou toda composta por indivíduos aparentados. Como já citado anteriormente, alguns fatores podem explicar o baixo número de heterozigotos encontrados na população. No entanto, alguns indícios nos levam a sugerir que no caso dos golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha a endogamia parece ser a explicação mais adequada para os dados obtidos. Entre os indícios está o desequilíbrio de ligação de três dos nove *loci* avaliados. Em uma população que foi formada por linhagens homozigóticas (população endocruzante) pode ocorrer desequilíbrio de ligação entre *loci* devido ao alto índice de homozigotos (excesso gamético) presente na população e não porque realmente estes *loci* estejam ligados no mesmo cromossomo (FUTUYMA, 1992). Além disso, em uma população com grande número de indivíduos e com alto endocruzamento, é possível verificar ausência do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que foi observado para todos os *loci* estudados na população. Segundo o postulado de Hardy-Weinberg, o processo de acasalamento entre indivíduos aparentados, juntamente com a deriva genética, migração, mutação ou seleção pode ser um dos fatores que afetam o EHW de uma população. Um número considerável de alelos raros (com baixa freqüência) foi verificado, e isto está diretamente relacionado a mudanças no tamanho populacional, talvez devido a um recente evento de "gargalo de garrafa" e a uma rápida expansão (SANTOS, 2005). No entanto, com a análise realizada com os microssatélites no programa BOTTLENECK não foi possível identificar uma redução da diversidade genética ("efeito gargalo"). Isto sugere que não está ocorrendo deriva genética nesta população, mas uma melhor análise a respeito desta questão poderá ser realizada com o auxílio de marcadores mitocondriais. Desta forma, dentre os

fatores acima citados a alta endogamia parece ser ainda a melhor explicação para o fato dos *loci* não estarem em EHW na população de golfinhos-rotadores em Fernando de Noronha. No entanto, a falta de dados comparáveis sobre a espécie dificulta uma inferência mais completa dos processos evolutivos pelas quais a população pode ter passado.

O interesse em se iniciar este estudo foi tentar entender alguns aspectos da dinâmica populacional dos golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha. Ao observar os animais nas águas do Arquipélago a primeira pergunta formulada foi se os golfinhos presentes quase diariamente, principalmente na Baía dos Golfinhos, pertenciam a uma mesma população. Além disso, se existem alguns animais que apenas estão de passagem (visitando) pelo Arquipélago e outros que já se tornaram residentes. Assim, surgiu a idéia de se coletar animais em dois períodos bem distintos. As coletas diferiram tanto na estação do ano (seca e chuvosa) quanto tiveram um intervalo de um ano e meio entre elas. Uma outra análise pôde ser realizada para responder se os grupos de animais coletados em determinado ponto da costa do Arquipélago possuíam alguma diferenciação genética entre si. Analisando os resultados obtidos verificou-se a ausência de diferenças significativas entre os golfinhos-rotadores coletados em 2004 e 2006, bem como nos diferentes pontos de coleta, indicando que muito provavelmente exista somente uma população de golfinhos ao redor do Arquipélago. Como foram detectados diversos alelos com baixa freqüência pode ser que existam animais visitantes no Arquipélago (que foram coletados), além de outros residentes, mas isso não pôde ser confirmado. Com a baixa variabilidade e o alto índice de endogamia encontrados nos golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha outras questões podem ser formuladas, tais como, se estas



características genéticas são encontradas em outras populações do litoral brasileiro; se a população de Fernando de Noronha, talvez por encontrar lá os recursos naturais necessários à sua sobrevivência não percorre grandes distâncias, ficando restrita às proximidades do Arquipélago; se existe algum mecanismo de reprodução preferencial na espécie; e se esta população pode ser considerada uma unidade de manejo. No entanto, estas hipóteses ou inferências só poderão ser confirmadas se outros estudos envolvendo diferentes populações de golfinhos-rotadores forem realizados.

Como nenhum estudo genético havia sido desenvolvido para *Stenella longirostris* no Brasil, o estudo de animais de Fernando de Noronha, que é uma área de importância para a espécie, nos permitiu ter uma idéia inicial de como é o padrão genético da espécie. Além disso, com estes resultados, estudos posteriores poderão ser auxiliados, principalmente com a disponibilidade de marcadores microssatélites espécie-específicos. Com microssatélites da espécie disponíveis é possível que se faça um monitoramento de tempos em tempos para se verificar um aumento ou diminuição significativa da diversidade genética dos golfinhos-rotadores de Noronha, para que se possa manter ou alterar as estratégias tomadas para conservação da espécie no Arquipélago. Além disso, outro estudo envolvendo golfinhos-rotadores coletados em Noronha e em outras localidades da costa brasileira a partir da utilização de microssatélites e marcadores mitocondriais seria uma boa alternativa para se estudar melhor a filogeografia da espécie no Brasil.

## 7 – CONCLUSÕES

- ✓ O método de raspagem de pele para obtenção de DNA pode ser utilizado para estudos genéticos tanto nucleares quanto mitocondriais da espécie *Stenella longirostris*;
- ✓ Os indivíduos amostrados em Fernando de Noronha pertencem a uma mesma população;
- ✓ A população de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha provavelmente apresenta alto grau de endogamia;
- ✓ Os microssatélites desenhados poderão ser utilizados em outros estudos de *S. longirostris*;
- ✓ Os marcadores desenvolvidos para a espécie *Stenella longirostris* amplificaram fragmentos microssatélites em outras espécies de delfínidos e poderão ser testados como heterólogos.

---

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.D. & ROSEL, P.E. Population differentiation of the Atlantic spotted dolphin (*Stenella frontalis*) in the western North Atlantic, including the Gulf of Mexico. *Marine Biology*, v. 148, p. 671-681, 2006.
- BAKER, C. S., PALUMBI, S. R. Population structure, molecular systematic and forensic identification of whales and dolphins. In: AVISE, J.C., HAMRICK J.L. (eds) *Conservation genetics: Case histories from nature*. New York: Chapman & Hall, p. 10-49, 1996.
- BAKER, C.S., LENTO, G.M., CIPRIANO, F., PALUMBI, S.R. Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. *Proc. R. Soc. Lond., B.*, v. 267, p. 1191-1199, 2000.
- BAKER, A.N., SMITH, A.N.H., PICHLER, F.B. Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, v. 32, p. 713-727, 2002.
- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, v. 8, p. 930-932, 1990.
- BÉRUBÉ, M. & PALSBOU, P. Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 283-287, 1996.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BROWN GLADDEN, J.G., FERGUSON, M.M., FRIESEN, M.K., CLAYTON, J.W. Population structure of North American beluga whales (*Delphinapterus leucas*) based on nuclear DNA microsatellite variation and contrasted with the population structure revealed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 347-363, 1999.

- BUCHANAN, F.C., FRIESEN, M.K., LITTLEJOHN, R.P., CLAYTON, J.W. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 571-575, 1996.
- CALDWELL, M., GAINES, M.S., HUGHES, C.R. Eight polymorphic microsatellite *loci* for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Molecular Ecology Notes*, v. 2, p. 393-395, 2002.
- CORNUET JM, LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- COSTA, K.M.P. *Hidrologia e Biomassa Primária da Região Nordeste do Brasil entre as latitudes de 8°00'00" e 2°44'30" S e as Longitudes de 35°56'30" e 31°56'30" W*. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Departamento de Oceanografia. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1991.
- COUGHLAN, J., MIRIMIN, E., DILLANE, E., ROGAN, E., CROSS, T.F. Isolation and characterization of novel microsatellite *loci* for the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) and cross-amplification in other cetacean species. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 490-494, 2006.
- CRISTOFANI, M.A. BRONDANI, R.V. NOVELLI, V.M., MACHADO, M.A. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para análise genética em citros. *Genetic Molecular Biology*, v. 21, p.222, 1998.
- CUNHA, H.A., da SILVA, V.M.F., LAILSON-BRITO JR, J., SANTOS, M.C.O., FLORES, P.A.C., MARTIN, A.R., AZEVEDO, A.F., FRAGOSO, A.B.L., ZANELATTO, R.C., SOLÉ-CAVA, A.M. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology*, v. 148, p. 449-457, 2005.
- DAKIN, E.E. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, p. 504-509, 2004.
- DIZON, A.E., SOUTHERN, S.O., PERRIN, W. Molecular analysis of mtDNA types in exploited populations of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). *Rep. Int. Whal. Commn*, v. 13, p. 183-202, 1991.

- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews – Genetics*, v. 5, p. 435-445, 2004.
- ESCORZA-TREVIÑO, S., ARCHER, F.I., ROSALES, M., LANG, A., DIZON, A.E. Genetic differentiation and intraspecific structure of Eastern Tropical Pacific spotted dolphins, *Stenella attenuata*, revealed by DNA analyses. *Conservation Genetics*, v. 6, p. 587-600, 2005.
- ESTOUP, A., JARNE, P., CORNUET, J.M. Homoplasmy & mutation model at microsatellite loci & their consequences for population genetic analysis. *Mol. Ecol.*, v. 11, p. 1591-1604, 2002.
- FARIA, P.J., MIYAKI, C.Y. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 231-240, 2006.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas*. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.
- FURTADO-NETO, M.A.A., QUEIROZ, E.L., ZERBINI, A.N., CARR, S.M. Uso de seqüências do mtDNA para identificação de um exemplar de golfinho rotador, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), encalhado no estado da Bahia, Brasil. *Arq. Ciên. Mar.*, v. 31, p. 83-91, 1998.
- FUTUYMA, D. J. *Biologia Evolutiva*. 2 ed. Tradução M. Vivo. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética / CNPq, 1992. 631p.
- GALES, N.J., DALEBOUT, M.L., BANNISTER, J.L. Genetic identification and biological observation of two free-swimming beaked whales: Hector's beaked whale (*Mesoplodon hectori*, Gray, 1871), and Gray's beaked whale (*Mesoplodon grayi*) Von Haast, 1876. *Marine Mammal Science*, v. 18, p. 544-551, 2002.
- GLAUBITZ J.C. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 309-310, 2004.

GOUDET, J. FSTAT A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3.2). URL: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>, 2002.

GRAY, J.E. *Spicilegia zoologica*; or original figures and short systematic descriptions of new and unfigured animals. Treüttel, Würtz and Co. and W. Wood, London. 1828. 7 p.

HARLIN, A.D. Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal science*, v. 15, p. 409-425, 1999.

HOELZEL, A.R. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. *The journal of heredity*, v. 5, p. 451-458, 1998.

JOHNSON, W.E., EIZIRICK, E., ROELKE-PARKER, M., O'BRIEN, S.J. Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation. In: GITTLEMAN, J.L., FUNK, S.M., MACDONALD, D., WAYNE, R.K. (eds) *Carnivore conservation*. Cambridge: Cambridge, Univ. Press / The Zoological Society of London, 2001.

KIJAS, J.M., FOWLER, J.C., GARBETT, C.A., THOMAS, M.R. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*, v. 16, p. 656-662, 2002.

KIMURA, M., CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, v. 49, p. 725-738, 1964.

LEVENE, H. On a matching problem in genetics. *The annals of mathematical statistics*, v. 20, p. 91-94, 1949.

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.*, v. 6, p. 381-398, 1972.

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

- MANLY, B.F.J. *The statistics of natural selection*. Chapman & Hall, London. 1985.
- MARTIN, A.R. *Whales and Dolphins*. London: Salamander Books Ltda, 1990. 192 p.
- MICHALAKIS, Y., EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, v. 142, p. 1061-1604, 1996.
- MIRIMIN, L., COUGHLAN, J., ROGAN, E., CROSS, T.F. Tetranucleotide microsatellite loci from the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 493-495, 2006.
- MORENO, I.B., ZERBINI, A.N., DANILEWICZ, D., SANTOS, M.C.O., SIMÕES-LOPES, P.C., LAILSON-BRITO JR., J., AZEVEDO, A.F. Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog Ser*, v. 300, p. 229-240, 2005.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, v. 55, p. 335-350, 1987.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NEI, M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- NORRIS, K.S., DOHL, T.P. Behavior of the Hawaiian Spinner Dolphin *S. longirostris*. *Fishery Bulletin*, v. 77, p. 821-849, 1980.
- NORRIS K.S., WÜRSIG, B., WELLS, R.S., WÜRSIG, M., BROWNLEE, S.M., JONHSON, C., SOLOW, J. *The Behavior of the Hawaiian Spinner Dolphin, Stenella longirostris*. La Loja: Southwest Fisheries Center,. Administrative Report, 1985. 211 p.
- OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCOVSKY, R., VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 294-307, 2006.

- OTT, P.H., FREITAS, T.R.O., FLORES, P.A.C., WHITE, B.N. Mitochondrial DNA variation among southern right whales (*Eubalaena australis*) from two wintering grounds (Brazil and Argentina) in the South West Atlantic Ocean, in *14th Biennial Conference on the biology of marine mammals*, Vancouver B.C., Canadá, , 2001. 164 p.
- OVENDEN, J.R., STREET, R., BRODERICK, D. New microsatellite *loci* for Carcharhinid sharks (*Carcharhinus tilstoni* and *C. sorrah*) and their cross-amplification in other shark species. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 415-418, 2006.
- PALUMBI, S.R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In HILLIS, D.M., MORITZ C., MABLE B.K. (eds.) *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 205-247. 1996
- PALUMBI, S.R. & CIPRIANO, F. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *The Journal of Heredity*, v. 89, p. 459-464, 1998.
- PASTENE, L.A., GOTO, M., ITOH, S., WADA, S., KATO, H. Intra- and inter-oceanic patterns of mitochondrial DNA variation in the Bryde's whale, *Balaenoptera edeni*. *Rep. Int. Whal. Commn.*, v. 47, p. 569-574, 1997.
- PERRIN, W.F. Subspecies of *Stenella longirostris* (Mammalia: Cetacea: Delphinidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, v. 103, p. 453-463, 1990.
- PERRIN, W.F., AKIN, P.A., KASHIWADA, J.V. Geographic Variation in External Morphology of the Spinner Dolphin *Stenella longirostris* in the Eastern Pacific and Implications for Conservation. *Fischery Bulletin, USA*, v. 89. p. 411-428, 1991.
- PERRIN, W.F. & GILPATRICK JR, J.W. Spinner Dolphin *Stenella longirostris* (Gray, 1828). In: RIDGWAY, S.H. & HARRISON, R. (eds) *Handbook of marine mammals: the first book of dolphins*. London: Academic Press, cap. 5, p. 99-128, 1994.
- PERRIN, W.F. *Stenella longirostris*. *Mammalian Species*, v. 599, p. 1-7, 1998.



- PERRIN W.F., DOLAR M.L.L., ROBINEAU D. Spinner dolphins (*Stenella longirostris*) of the western Pacific and Southeast Asia: Pelagic and shallow-water forms. *Marine Mammal Science*, v. 15, p. 1029-1053, 1999.
- PICHLER, F., DAWSON, S. M., SLOOTEN, E., BAKER, C. S. Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. *Conservation Biology*, v. 12 p. 676-682, 1998.
- PICHLER, F., BAKER, C. S. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, v. 2, p. 97-102, 2000.
- POMILLA, C. & ROSENBAUM, H.C. Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Molecular Ecology*, v. 15, p. 2541-2555, 2006.
- RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, p. 223-225, 1989.
- RICHARD, K.R., McCARREY, S.W., WRIGHT, J.M. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Can. J. Zool.*, v. 72, p. 873-877, 1994.
- ROONEY, A.P., HONEYCUTT, R.L., DAVIS, S.K., DERR, J.N. Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whales from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria. *J. Mol. Evol.*, v. 49, p. 682-690, 1999.
- ROSEL, P.E.; FRANCE, S.C.; WANG, J.Y.; KOCHER, T.D. Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, v.8, p.S41-S54, 1999.
- ROSEL, P.E. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation Genetics*, v.4, p. 647-649, 2003.
- ROSEL, P.E., FORGETTA, V., DEWAR, K. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 830-833, 2005.

- ROSENBAUM, H.C., BROWNELL, R.L., BROWN, M.W., SCHAEFF, C., PORTWAY, V., WHITE, B.N., MALIK, S., PASTENE, L.A., PATENAUDE, N.J., BAKER, C.S., GOTO, M., BEST, P.B., CLAPHAM, P.J., HAMILTON, P., MOORE, M., PAYNE, R., ROWNTREE, V., TYNAN, C.T., BANNISTER, J.L., DESALLE, R. Worldwide genetic differentiation of *Eubalaena*: questioning the number of right whale species. *Molecular Ecology*, v. 9, p. 1793-1802, 2000.
- ROSS, H.A., LENTO, G.M., DALEBOUT, M.L., GOODE, M., EWING, G., MCLAREN, P., RODRIGO, A.G., LAVERY, S., BAKER, C.S. DNA Surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. *Journal of Heredity*, v. 94, p. 111-114, 2003.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S.J., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SANTOS, M.S. Análises de populações naturais de *Eudocimus ruber* (Ciconiiformes: Threskiornithidae) através de marcadores microssatélites: implicações para a conservação da espécie. Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2005.
- SANTOS, M.S., GONÇALVES, E.C., BARBOSA, M.S.R., SILVA, A., SCHNEIDER, M.P.C. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* – Threskiornithidae – Aves). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 307-309, 2006.
- SAZIMA, I., SAZIMA, C., SILVA JR, J. M. Golfinhos e cangulos: reciclagem no mar. *Ciência Hoje*, p. 80-82, 2002.
- SECCHI, E.R., SICILIANO, S. Comments on the southern range of spinner dolphin, *Stenella longirostris*, in the western South Atlantic. *Aquatic Mammals*, v. 21, p. 105 -108, 1995.
- SILVA JR, J.M. Aspectos do comportamento do *Golfinho-rotador*, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), no arquipélago de Fernando de Noronha. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 1996. 131p.

- SILVA JR, J.M. Ecologia comportamental do golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) em Fernando de Noronha. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005. 120 p.
- SILVA JR, J.M., SILVA, F.J.L., SAZIMA, I. Two presumed interspecific hybrids in the genus *Stenella* (Delphinidae) in the Tropical West Atlantic. *Aquatic Mammals*, v. 31, p. 467-471, 2005.
- TEPOLT, C.K., BAGLEY, M.J., GELLER, J.B., BLUM, M.J. Characterization of microsatellite *loci* in the European green crab (*Carcinus maenas*). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, 343-345, 2006.
- THONPSON, J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, v, 15, p. 4876-4882, 1997.
- VOWLES, EJ, AMOS, W. Evidence for widespread convergent evolution around human microsatellites. *PLoS Biology*, v.2, p. 1157-1167, 2004.
- WADA, S. & NUMACHI, K. Allozyme analyses of genetic differentiation among the populations and species of the *Balaenoptera*. *Rep. Int. Whal. Commn.*, v. 13, p. 124-154, 1991.
- WAHLUND, S. Composition of populations from the perspective of the theory of heredity. *Hereditas*, v. 11, p. 65-105, 1928.
- WALDICK, R.C., BROWN, M.W., WHITE, B.N. Characterization and isolation of microsatellite *loci* from the endangered North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 1753-1768, 1999.
- WALDICK, R.C., KRAUS, S., BROWN, M.W., WHITE, B.N. Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 2241-2249, 2002.
- WANG, J.Y., CHOU, L.S., WHITE, B.N. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in chinese waters. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 1603-1612, 1999.

XU, Y., WANG, Y., LI, Z., BAO, Z., ZHOU, J., HUANG, H. Characterization of polymorphic microsatellite *loci* in a traditional Chinese medicinal plant, *Gastrodia elata*. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 316-318, 2006.

YEH, FC, YANG, RC, BOYLE, T. Popgene version 1.32. Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada, 1999.

YOSHIDA, H. & KATO, H. Phylogenetic relationships of Bryde's whales in the western north pacific and adjacent waters inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine mammal science*, v. 15, p. 1269-1286, 1999.

ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 1-16, 2002.

## ANEXO

### **Soluções:**

**SSC 20x:** - 175,3 g NaCl;  
- 0,5mL SDS 0,1%;  
- 500 mL H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada;  
Ajustar o pH para 7,0 e completar para 1L.

**SSC 2x:** - **5mL SSC 20x;**  
- **0,5mL SDS 0,1%.**

**SSC 1x:** - 2,5mL SSC 20x;  
- 0,5mL SDS 0,1%.

**GTE:** - 23 ml de Glicose 20%;  
- 10 ml EDTA 0,5M pH 8,0;  
- 13 ml de Tris-HCl 1M pH 7,4;  
- Completar para 500 ml de H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada.

**0,2M NaOH / 1% SDS:** - 25 ml de NaOH 4M;  
- 50 ml de SDS 10%;  
- Completar para 500 ml de H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada.

**KOAc 3M pH 5,4:** - 147,2g de KOAc 5M;  
- 7,5 ml de Ácido Acético Glacial;  
- Completar para 500 ml de H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada.  
- Autoclavar e estocar a 4°C.