

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

ESTRUTURA POPULACIONAL E HISTÓRIA FILOGEOGRÁFICA DA TONINHA
(*Pontoporia blainvillei*)

Elenara Vêras dos Santos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (051) 320-3500 - Fax: (051) 339-1564
CEP 90619-900 Porto Alegre - RS

Brasil

2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

ESTRUTURA POPULACIONAL E HISTÓRIA FILOGEOGRÁFICA DA TONINHA
(*Pontoporia blainvillei*)

Elenara Vêras dos Santos

Orientador: Sandro Luis Bonatto

Co-Orientadora: Tatiane Campos Trigo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2011

Sumário

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | V |
| Resumo | VII |
| Abstract | VIII |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Considerações sobre Genética da Conservação..... | 1 |
| 1.2. Diversidade e Conservação de Cetáceos no Brasil..... | 2 |
| 1.2.1. <i>Pontoporia blainvillei</i> | 3 |
| 1.2.1.1 Status de Conservação de <i>Pontoporia blainvillei</i> | 4 |
| 1.2.1.2. Definição de Unidades de Conservação para <i>Pontoporia blainvillei</i> | 4 |
| 1.3. Marcadores Moleculares em estudos de populações naturais..... | 6 |
| 1.3.1. DNA mitocondrial..... | 6 |
| 1.3.2. DNA Microsatélite..... | 7 |
| 2. Objetivos..... | 7 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 8 |
| 3.1. Obtenção das Amostras..... | 8 |
| 3.2. Extração e Quantificação do DNA..... | 9 |
| 3.3. Amplificação dos Locos de Microsatélite..... | 10 |
| 3.4. Amplificação e Sequenciamento do DNA mitocondrial..... | 11 |
| 3.5. Análise dos Dados de Microsatélites..... | 12 |
| 3.6. Análise dos dados – DNA mitocondrial..... | 14 |
| 4. Resultados..... | 15 |
| 4.1. DNA Microsatélite..... | 15 |
| 4.2. DNA Mitocondrial..... | 24 |
| 5. Discussão..... | 33 |
| 5.1. Diversidade genética..... | 33 |
| 5.2. Estruturação Populacional..... | 34 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5.3. Conservação e Manejo..... | 35 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 36 |

Agradecimentos

Ao meu orientador Sandro por ter me acolhido e aceitado me orientar e também pela paciência a mim dedicada.

A minha Co-orientadora e amiga Tatinha pela ajuda, amizade e paciência incondicional. Sem ela nada disso seria possível e serei eternamente grata por isso.

Ao colega Paulo Ott por disponibilizar os dados brutos de sua Tese de doutorado e por toda colaboração e ajuda nas análises dos dados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado, sem a qual este estudo não seria possível.

Aos Professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos e experiências passadas.

Aos meus colegas de pós-graduação pelas trocas de experiências, amizade e auxílio prestados, em especial à Tanilene, a Tati, e ao David, que muito me ajudaram e fizeram sorrir nos momentos difíceis.

Aos ex-colegas mas eternos amigos de pesquisa em Ecologia de primatas, Anamélia, Jonas, David, Danusa e Lílian pela amizade, carinho, compreensão e conselhos dados nas horas difíceis e pelos momentos engraçados sem os quais teria sido bem mais difícil.

Ao Bicca por todos os ensinamentos, conselhos e por ter me aceitado e me entendido. Muito do que sei hoje devo a ele, tanto em assuntos profissionais como em ensinamentos para a vida. Por tudo mesmo, pelos conselhos e puxões de orelha hoje o considero mais que um ex-orientador, mais que um professor, mais que um amigo, um verdadeiro pai.

Aos meus colegas genômicos que me acolheram e aceitaram no momento que mais precisei, em especial ao Henrique pela ajuda com questões computacionais.

Às minhas colegas e agora amigas genômicas que me proporcionaram dias de muita alegria, por terem me acolhido, me ajudado e compreendido em todas as circunstâncias desse tempo de convivência, em especial a Talita, a Cris, a Ane, a Lisie, a Aninha, a Carla, a Rê e a Laura.

A minha amiga-irmã, Marina pela amizade, pelos conselhos, pela ajuda nas análises e por ter sido essencial no meu processo de engajamento no “mundo genômico” e em especial pelos momentos de alegria e descontração que me proporcionou.

A Cladi por toda a ajuda dada e por manter o laboratório organizado.

Às minhas “três mães”, Naiara, Sinara e Jussara por terem me criado e me ajudado a ser a pessoa que sou hoje, pelo carinho e amor incondicionais a mim dedicados. Sem elas, com certeza eu não estaria aqui e sou muito grata por isso.

À minha família por todo o apoio dado em todos os momentos difíceis, por acreditarem em mim e por todo o carinho a mim dedicado em especial a minha irmã Tamara que sempre me incentivou, apoiou e compreendeu.

Ao meu marido amado, Vínicius por me amar, me entender, me aceitar, por me fazer a mulher mais feliz do mundo e principalmente por ter me ajudado a “fazer” a coisa mais importante da minha vida que é a minha filha Sofia.

À minha filha linda e amanda Sofia simplismente por existir e sorrir para mim todos os dias de manhã.

RESUMO

A toninha, *Pontoporia blainvillei* é o único representante atual da família de odontocetáceos Pontoporiidae. Esta espécie ocorre ao longo da costa atlântica da América do Sul, entre Itaúnas, Espírito Santo e o Golfo Nuevo, Península Valdés, Argentina. A principal ameaça à espécie são as capturas acidentais em redes de pesca, que em algumas localidades chegaram a atingir o número de 1000 capturas anuais. Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem revelado a existência de variações genéticas consideráveis ao longo da distribuição geográfica de *P. blainvillei*. Visando colaborar para uma melhor compreensão dessa estruturação existente, novas informações moleculares foram analisadas, incluindo o sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial e 11 loci de microssatélites de 253 indivíduos ao longo da costa brasileira, uruguaia e argentina. Para as análises do DNA mitocondrial foram incluídas sequências previamente depositadas no GenBank, totalizando 512 sequências. Os resultados obtidos a partir dos dois marcadores moleculares revelam uma clara diferenciação da espécie em três grupos principais: 1) Rio de Janeiro/Espírito Santo, 2) São Paulo/Paraná e norte de Santa Catarina, e 3) Sul de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina. O estudo também apontou estimativas preocupantes no que se refere ao tamanho efetivo de algumas populações, em especial à do Rio de Janeiro/Espírito Santo e conseqüentemente ao seu status de conservação. Os resultados corroboram a definição das quatro áreas de manejo (Franciscana Management Areas – FMAs) previamente sugeridas por Secchi e colaboradores em 2003, e ressaltam a importância desta definição para a Conservação da diversidade genética da espécie.

ABSTRACT

Population Structure and Phylogeography of Franciscana (*Pontoporia blainvillei*)

Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) is the only extant representative of the Pontoporiidae family. This species occurs along the Atlantic coast of South America from Itaunas, Espirito Santo in Brazil to Golfo Nuevo, Valdes Peninsula in Argentina. The most important threat to the species is the accidental by-catch that in some places reached the number of 1000 related events per year. In recent years an increasingly number of studies had revealed the existence of considerable genetic variation along the geographical distribution of *P. blainvillei*. In this study, looking to collaborate towards a better comprehension of such existing structure, we analyzed new molecular data, including the sequencing of mitochondrial DNA control region and 11 microsatellite loci from 253 individuals along the Brazilian, Uruguayan and Argentine coast. For the mitochondrial DNA analysis, we added sequences previously deposited in GenBank, totalizing 512 sequences. Results obtained based on the two molecular markers revealed a clear differentiation of the species in three main groups: (1) Rio de Janeiro / Espirito Santo, (2) Sao Paulo and north of Santa Catarina, and (3) south of Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguay and Argentina. The study also shows alarming estimates in reference to the effective size of some populations, mainly from Rio de Janeiro/Espirito Santo which will probably reflect on its conservation status. These results supports the definition of the four management areas (Franciscana Management Area - FMAs) previously suggested by Secchi and associates in 2003, and point out the importance of this definition to the conservation of the genetic diversity of the species.

1. Introdução

1.1. Considerações sobre Genética da Conservação

A Genética da Conservação é uma área da genética molecular que vem sendo largamente empregada em estudos que visam a manutenção da diversidade genética de inúmeros táxons, em especial aqueles que se encontram ameaçados de extinção. Dentre os principais estudos realizados dentro desta área podemos citar a avaliação dos níveis de variabilidade genética encontrados em populações naturais, a detecção de modos de reprodução e estruturas familiares e a definição de estruturas populacionais por meio da filogeografia (Avice, 1994).

Muitos estudos dentro da Genética da Conservação são voltados primeiramente para a descrição dos níveis de variabilidade existentes nos organismos, pois altos níveis de variabilidade genética são considerados importantes para a viabilidade e a sobrevivência de uma população. Quanto maior for a variabilidade existente em uma população, maior será a amplitude de possibilidades onde a seleção natural poderá agir para gerar novas adaptações e, desta forma aumentar a probabilidade de sobrevivência desta população ao longo do tempo evolutivo (Avice, 1994; Lacy, 1997). Neste contexto, processos como a deriva genética (flutuações ao acaso das frequências alélicas entre as gerações) e o endocruzamento (cruzamentos entre indivíduos aparentados), são fundamentais, visto que estes podem provocar a perda da variabilidade genética, principalmente, em populações isoladas e de tamanho pequeno (Amos & Balmford, 2001). O valor adaptativo das espécies pode sofrer vários impactos por excesso de endocruzamento, por exemplo, fenômeno denominado de Depressão endogâmica. Dentre estes impactos, podem ser citados, altas taxas de mortalidade, baixa fecundidade, crescimento lento, instabilidade no desenvolvimento e grande suscetibilidade a doenças (p.e. Lacy, 1997; Keller & Waller, 2002). Levando-se em conta a importância da diversidade genética para as populações e as possíveis consequências de alterações em seus padrões naturais, diversos estudos envolvem a caracterização dos níveis de variabilidade genéticas dentro das populações e a caracterização de como as alterações humanas estão afetando esta variabilidade (p.e. Nader *et al.*, 1998; Grativol *et al.*, 2001).

A análise de estruturas populacionais através da genética de populações e a filogeografia constituem, com certeza, o principal assunto abordado e investigado na

área da Genética da Conservação. A filogeografia, particularmente, como uma disciplina integrativa que une dados da genética molecular, da genética de populações, demografia e geografia histórica, é o tipo de estudo mais freqüente na literatura científica da área. O seu principal objetivo é delimitar a história evolutiva das linhagens genealógicas, especialmente ao nível intra-específico (Avise, 1998; Avise, 2000). É por meio das análises realizadas no campo da filogeografia que podemos avaliar a distribuição geográfica da variabilidade genética dentro de cada espécie, e assim identificar áreas geográficas com restrita troca de indivíduos que reflitam linhagens evolutivamente independentes, assim como áreas prioritárias para o monitoramento, manejo e proteção (Avise, 1994; Taylor & Dizon, 1999).

De acordo com Moritz (1994), dois tipos de linhagens evolutivas para fins de manejo podem ser identificadas dentro de cada espécie a partir de estudos de filogeografia e estrutura populacional: as Unidades Evolutivamente Significativas (UES) e as Unidade de Manejo (UM). As UES consistem de populações substancialmente isoladas reprodutivamente de outros grupos co-específicos e representam, assim, um importante componente da herança evolutiva de uma espécie (Moritz, 1994; Eizirik, 1996; King & Burke, 1999). Já as UM representam um nível de unidade de conservação abaixo das UES, consistindo de populações regionais com restrita conexão demográfica entre si. O foco das UM reside mais na estruturação contemporânea da população do que em fatores históricos como no caso das UES (Moritz, 1994). Em programas de conservação de espécies, estes conceitos tem sido bastante usados na intenção de se preservar os padrões históricos de diferenciação das populações, que podem, por sua vez, refletir padrões de adaptações ecológicas locais (Dimmick *et al.*, 2001).

1.2. Diversidade e Conservação de Cetáceos no Brasil

A Ordem Cetacea corresponde ao mais diverso grupo de mamíferos aquáticos da costa brasileira, sendo composta por duas subordens: Mysticeti (baleias com cerdas bucais) e Odontoceti (animais com dentes) (Rice, 1998). Em águas brasileiras é possível encontrar 42 das 80 espécies conhecidas no mundo desta Ordem (Rice, 1998).

A subordem Odontoceti, no Brasil está representada por 34 espécies pertencentes a sete famílias: Delphinidae, Iniidae, Kogiidae, Phocoenidae, Physeteridae,

Pontoporiidae e Ziphiidae. Diferentemente dos Mysticeti, os Odontoceti não são animais migratórios e portanto, podem ser encontrados durante o ano todo ao longo no nosso litoral (Zerbini *et al.*, 1999).

Estudos envolvendo espécies de cetáceos em águas brasileiras têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. A partir do início da década de 1960, pode-se perceber um aumento na quantidade de estudos com estes animais. No entanto, estes trabalhos, em sua maioria, estão relacionados apenas com a indústria baleeira (Paiva & Grangeiro, 1965; Ellis, 1969), à definição da distribuição das espécies, à aspectos gerais da biologia destes animais (Carvalho, 1963; Hershkovitz, 1963) ou à ocorrência de novos registros para locais específicos (Castello & Gianuca, 1976; Gianuca & Castello, 1976). A partir de 1990 começaram a surgir trabalhos mais elaborados tratando da história natural e dos problemas de conservação de várias espécies de cetácios da nossa costa (*e.g.* Di Benedetto *et al.*, 2001; Secchi *et al.*, 2001).

1.2.1 *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny 1844)

Pontoporiidae é uma família monoespecífica que tem como grupo irmão a família do boto vermelho da Amazônia, Iniidae, também monoespecífica. A única espécie vivente da família, *Pontoporia blainvillei*, ocorre ao longo da costa atlântica da América do Sul, entre Itaúnas (18° 25'S; 30°42'W), Espírito Santo e o Golfo Nuevo (42°35'S; 64°48'W), Península Valdés, Argentina (Crespo *et al.*, 1998). Considerada até algum tempo atrás como pertencente ao grupo dos golfinhos de rio, juntamente com o boto vermelho da Amazônia e com as três espécies de golfinhos de rio asiáticas, a toninha, *Pontoporia blainvillei*, é um dos menores cetáceos atuais com os adultos medindo entre 128 e 175 centímetros e pesando entre 35 e 55 kg. Originalmente, a toninha era caracterizada como um odontoceto de hábitos solitários, mas observações recentes mostraram que vivem em grupos pequenos de 2 a 5 animais, já tendo sido registrada a avistagem de grupos entre 10 e 20 indivíduos (Bordino *et al.*, 1999; Secchi *et al.*, 2001; Simões-Lopes, 2005).

A espécie distribui-se ao longo da costa sendo o seu habitat preferencial águas costeiras ocorrendo até no máximo 30-35 metros de profundidade (Danilewicz *et al.* 2009). Segundo Bordino e colaboradores (2002), a distribuição da espécie apresenta alguns hiatos, que parecem estar relacionados a sua estruturação populacional.

Os animais tornam-se sexualmente maduros entre 2 e 3 anos de idade (Danilewicz 2000). A reprodução da espécie e o tamanho corporal variam de acordo com a localidade geográfica. No norte do Rio de Janeiro e Sul de São Paulo, onde os animais são menores, a maturidade sexual é atingida quando os animais atingem aproximadamente 114 cm (machos) e 126 cm (fêmeas). No Rio Grande do Sul, os machos atingem a maturidade com tamanho médio de 127,4 cm e as fêmeas com 138,9 cm. O ciclo reprodutivo é anual ou bianual, sendo o período de lactação de aproximadamente oito meses (Danilewicz et al. 2004).

1.2.1.1 Status de Conservação de *Pontoporia blainvillei*

A partir de meados dos anos 80 e 90, estudos mais diretos sobre capturas acidentais de toninhas, começaram a ser realizados no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul. Estes estudos mostram que a região onde ocorre a maior taxa de mortalidade da espécie é o Rio Grande do Sul, com estimativas de capturas de 1000 animais anualmente (Siciliano *et al.*, 2006). Segundo estimativas de Kinas (2002), através de análises de viabilidade populacional, as capturas acidentais de *Pontoporia blainvillei* podem realmente, não serem sustentáveis ao longo do tempo.

Segundo a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção da União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN) a espécie está categorizada como vulnerável, com a população tendendo a diminuição. Em nível nacional, segundo a Lista das Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção do Ministério do Meio Ambiente e do IBAMA, *Pontoporia blainvillei* encontra-se categorizada como em perigo.

1.2.1.2 Definição de Unidades de Conservação para *Pontoporia blainvillei*

Um dos primeiros estudos visando estabelecer Unidades de Conservação para *P. blainvillei* foi realizado por Pinedo (1991). A autora descreve a existência de variações geográficas consideráveis com base em análises morfológicas de indivíduos da espécie. Segundo Pinedo, existiriam pelo menos duas “formas geográficas” ao longo do Atlântico Sul Ocidental. Posteriormente, Secchi e colaboradores em 1998 através de análises moleculares, corroboraram os resultados obtidos por Pinedo (1991). Neste

estudo, análises de 476 pares de base da região controladora do DNA mitocondrial (DNAMt) de indivíduos do Rio de Janeiro (n=10) e do Rio Grande do Sul (n=10), mostraram diferenças significativas entre os animais das duas regiões. Segundo os autores: a) a ausência de seqüências compartilhadas; b) a filogenia e relação dos haplótipos; c) a presença de dois sítios diagnósticos para as populações norte e sul; e d) as análises de variância molecular (AMOVA), indicariam a existência de pelo menos duas linhagens geneticamente distintas da espécie ao longo da costa brasileira. Em adição a este trabalho, também utilizando a região controle do DNAMt, Lazaro *et al.* (2004) reuniram dados de 94 indivíduos do Uruguai e Buenos Aires com os dados de Secchi *et al.* (1998) do Brasil. Os resultados deste trabalho estão de acordo com Secchi *et al.* (1998) e sugerem a existência de duas populações adicionais chamadas: Rio de la Plata, que reúne populações do Uruguai e do Norte de Buenos Aires, e Claromeco na Argentina.

Em 2003, Secchi e colaboradores seguindo uma abordagem filogeográfica de Dizon *et al.* (1992), que leva em conta dados sobre distribuição, resposta populacional, dados fenotípicos e genotípicos, dividiram a espécie em quatro áreas de manejo chamadas de “Franciscana Management Areas” ou FMA I a IV: FMA I- animais do Espírito Santo e do Rio de Janeiro; FMAII- animais de São Paulo e Santa Catarina; FMA III- animais do Rio Grande do Sul e do Uruguai e FMA IV- animais da Argentina. Embora a divisão da espécie em áreas de manejo seja importante do ponto de vista da genética da conservação, os próprios autores admitem que talvez os critérios utilizados para esta definição sejam fracos devido à escassez de dados.

Utilizando um marcador molecular, Mendez *et al.* (2008), analisando amostras de tecido de 107 indivíduos de Buenos Aires, encontraram fortes evidências quantitativas da existência de pelo menos duas populações geneticamente reconhecíveis na Argentina. Além disto, este trabalho também corrobora com a existência das populações (Uruguai e Rio Grande do Sul) encontradas por Secchi *et al.* (1998) e Lazaro *et al.* (2004). O mais recente trabalho sobre o assunto foi publicado por Mendez *et al.* (2010). Segundo esta pesquisa, baseada em dados nucleares e mitocondriais aliados a parâmetros ambientais, existem ainda populações geneticamente isoladas dentro da Argentina.

Embora os estudos anteriormente citados indiquem a existência de mais de uma forma geográfica para a espécie, há ainda um lacuna acerca da diversidade genética de *Pontoporia blainville*, visto que até o momento, nenhum estudo publicado agregou dados mitocondriais e nucleares para toda a distribuição da espécie. Segundo Baker & Palumbi (1996), é necessário uma ampla amostragem e análises de dados mitocondriais e nucleares em conjunto para que se tomem decisões de manejo de espécies ameaçadas já que estes marcadores podem apresentar resultados distintos.

1.3 Marcadores Moleculares em estudos de populações naturais

Estudos mais aprofundados sobre a variabilidade genética tanto de humanos como de outras espécies, somente começaram a ser realizados após a descrição da técnica de eletroforese de proteínas em meados da década de 1960. Posteriormente, os trabalhos nessa área foram direcionados ao estudo das variações em nível do DNA. A partir daí, uma grande quantidade de técnicas começaram a ser desenvolvidas para investigar as variações existentes em nível molecular sendo estas, então, utilizadas como ferramentas para investigar questões como parentesco, história filogenética, ecologia e evolução das espécies.

Atualmente, o DNA mitocondrial e o DNA microssatélite tem sido bastante empregados em estudos de diversidade genética e história filogeográfica entre populações de cetáceos.

1.3.1 DNA mitocondrial

Em animais, o DNA mitocondrial é uma molécula presente na quantidade de centenas a milhares de cópias em cada célula e é formada por aproximadamente 15 a 20 kilobases (kb). É nesta molécula que estão localizados os genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa das mitocôndrias. A região controladora (também chamada de D-Loop) do DNAm_t é a única porção que não tem nenhuma função codificante. As altas taxas evolutivas e o padrão de herança predominantemente matrilinear fazem do DNAm_t uma ótima alternativa no estudo de relações filogenéticas e na identificação de subdivisões populacionais (Awise, 1994). Segundo Clayton (1994), em mamíferos, as taxas de

mutação desta molécula são cerca de 5 a 10 vezes mais altas do que as observadas no DNA nuclear. Uma das limitações deste marcador molecular é o fato de ele representar apenas a história evolutiva da linhagem das fêmeas, já que seu padrão de herança é matrilinear. Sendo assim, não podem ser feitas muitas inferências a respeito da dispersão dos machos através deste marcador, fazendo com que subdivisões geográficas detectadas neste nível molecular não garantam a ausência de fluxo gênico entre as populações (Bowen, 1997).

1.3.2 DNA microssatélite

Os microssatélites estão dentre os marcadores moleculares mais utilizados ultimamente em estudos genéticos de diversidade e estrutura populacional. Eles estão incluídos dentro das sequências de DNA nuclear denominadas de “Simple Sequence Repeats” (SSRs) (Kashi *et al.*, 1997) ou “Variable Number of Tandem Repeats” (VNTRs) (Murray, 1996). Estas sequências se dividem em duas categorias de acordo com o tamanho de suas unidades repetitivas: Minissatélites (repetições de 15-70 pares de bases) e Microssatélites (repetições de 2-6 pares de base) (Murray, 1996).

Os microssatélites encontram-se amplamente distribuídos em genomas eucarióticos, podendo estar presentes em genomas procarióticos sob baixas frequências (Schlotterer, 1998). Mudanças nos números de repetições causadas por erros de pareamento devido ao deslizamento das fitas no momento da replicação são as causas de mutações nos microssatélites. Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter altamente polimórfico destes locos (Schlotterer, 1998).

2. Objetivos

- 1) Estimar os níveis de variabilidade genética existentes no DNA mitocondrial e em locos de microssatélite de populações de *Pontoporia blainvilei* ao longo de toda sua distribuição geográfica;

- 2) Analisar a distribuição geográfica desta variabilidade com o intuito de investigar a existência de unidades demográficas distintas como Unidades Evolutivamente Significativas e/ou Unidades de Manejo;
- 3) Relacionar os resultados obtidos com informações disponíveis sobre a biologia desta espécie, a fim de contribuir para a elaboração de estratégias adequadas para sua conservação e manejo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção das Amostras

Foram utilizadas, neste estudo, amostras de pele e músculo de exemplares de *P. blainvillei* capturados acidentalmente em redes de pesca, ou de indivíduos encalhados ao longo da costa atlântica, compreendendo toda a área de distribuição da espécie. A obtenção do material biológico utilizado foi realizada mediante a cooperação entre diferentes pesquisadores de diversas regiões do Atlântico Sul Ocidental (Moreno *et al.*, 1997; Secchi *et al.*, 1997; Zanelatto, 1997; Di Benedetto *et al.*, 1998; Bastida *et al.*, 2000; Bordino *et al.*, 2000; Lazaro, 2001; Bertozzi & Zerbini, 2002; Santos *et al.*, 2002). A amostragem final compreendeu as 232 amostras previamente analisadas por Ott (2002) juntamente com 21 novas amostras avaliadas neste estudo totalizando 253 indivíduos estudados. Foram obtidos exemplares provenientes de diferentes regiões abrangendo praticamente toda a extensão de distribuição da espécie: Espírito Santo (1); Rio de Janeiro (n=30); São Paulo (n=35); Paraná (n=13); Santa Catarina (n=17); Rio Grande do Sul (n=70); Uruguai (n=45) e Argentina (n=42) (Figura1). Por apresentar apenas uma amostra, decidimos considerar o indivíduo do Espírito Santo juntamente com os indivíduos do Rio de Janeiro nas análises.

As amostras de tecido foram preservadas no momento da coleta em álcool 96%, ou em uma solução de dimetil sulfóxido (DMSO) saturada com cloreto de sódio (Amos e Hoelzel 1991). Para armazenamento em longo prazo as amostras foram mantidas a -20° C.

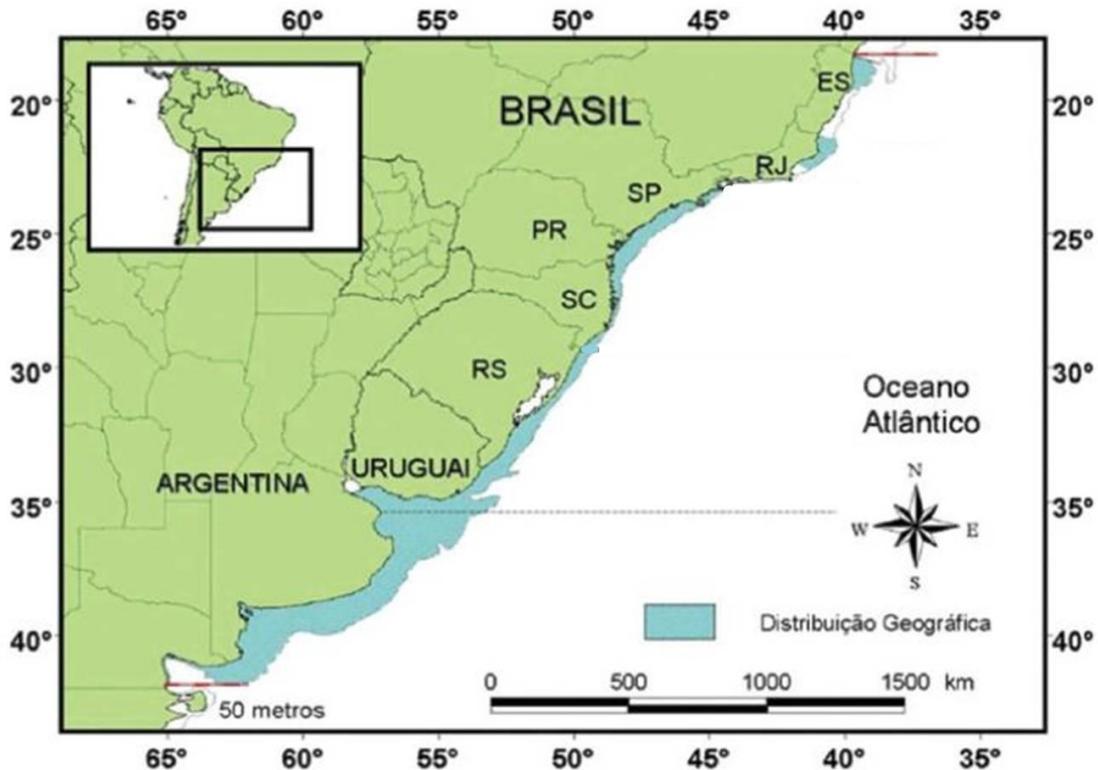


Figura 1 – Mapa das áreas, mostrando os locais de origem das amostras de *Pontoporia blainvillei*. Número de amostras por região: ES (1), RJ (30), SP (35), PR (13), SC (17), RS (70), Uruguai (45), Argentina (42).

3.2. Extração e Quantificação do DNA

As extrações do DNA genômico foram realizadas seguindo método padrão com fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) com algumas modificações (Secchi *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2003), como descrito por Ott (2002): primeiramente, foram macerados em nitrogênio líquido cerca de 200mg de tecido de cada amostra em um recipiente estéril. Depois de macerado o tecido foi transferido para tubos de 15ml e incubado por pelo menos 72h, a 37°C em 4,5ml de tampão de lise (4M uréia, 0,2M cloreto de sódio, 0,5% N-lauroil sarcosinato de sódio, 10mM CDTA [ácido 1,2 ciclohexanodiaminotetracético], 100mM Tris-HCL pH 8,0). Após 72 horas, cerca de 20 unidades/ml de proteinase K foram adicionadas às amostras e estas, incubadas a 65°C por 1 hora. Ao final deste período, foi novamente adicionada proteinase K (20 unidades/ml), e as amostras foram transferidas para uma temperatura de incubação de

37°C. Após 24 horas, mais 20 unidades/ml de proteinase K foram adicionadas, e as amostras incubadas a 37°C por outras 24 horas. As etapas seguintes da extração compreenderam as sucessivas lavagens com fenol e clorofórmio para a retirada dos restos celulares e isolamento do DNA obtido, conforme o protocolo-padrão de extração com fenol/clorofórmio mencionado anteriormente.

Ao final da extração, o DNA foi ressuscitado em um volume proporcional ao tamanho do precipitado (entre 50µl e 300µl) com tampão TNE2 (10mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM NaCl, 2mM EDTA). A verificação do DNA foi feita via gel de agarose 1% e a quantificação pela comparação com o marcador de peso molecular “DNA low mass” (Invitrogen).

3.3. Amplificação dos Locos de Microssatélite

Para a amplificação dos locos de microssatélite foram utilizados conjuntos de primers desenvolvidos para outras espécies de cetáceos (Amos *et al.*, 1993; Buchanan *et al.*, 1996; Palsboll *et al.*, 1997; Shinohara *et al.*, 1997; Valsecchi & Amos, 1996) e previamente analisados para *P. blainvillei* por Ott (2002). Um total de 11 locos com repetições dinucleotídicas foi incluído na análise: FCB2, FCB5, FCB17, D22, EV5Pm, EV76Mn, MK5, MK6, TR3G1, 464/5 e TR3F10. As 21 amostras obtidas para este estudo foram genotipadas para os 11 locos e os dados gerados foram adicionados à base de dados gerada por Ott (2002), totalizando 228 amostras genotipadas.

Para as reações de PCR, os *primers* foram marcados com uma molécula fluorescente que permite a identificação do genótipo de cada indivíduo através da separação por tamanho dos produtos de PCR em sequenciadores automáticos. Cada reação de PCR continha um volume final de 10µl composta por: 5ng de DNA genômico; 1 x Tampão de PCR (10mM Tris- HCl pH 8,3, 50mM KCl); 0,2mM de dNTPs; 2,0mM MgCl₂; 1,25µl de cada *primer*; 1 unidade *Taq* DNA Polimerase . As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas por Ott. 2002, como descrito a seguir: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento em temperaturas entre 45°C e 65°C; 45 segundos de extensão a 72°C; seguidos de um período de 10 minutos de extensão final a 72°C.

A determinação dos genótipos foi realizada com o auxílio do programa GENETIC PROFILER 1.3 (MegaBace 1000), utilizando um marcador de tamanho molecular interno (ET550-R).

3.4. Amplificação e Sequenciamento do DNA mitocondrial

A região controladora do DNAm_t foi amplificada por PCR (*polymerase chain reaction*) para as 21 amostras obtidas no presente estudo, utilizando-se *primers* universais descritos na literatura (THR e TDKD, Kocher *et al.*, 1989) e previamente testados para a espécie (Lazaro, 2000; 2001). As reações de amplificação da região controladora do mtDNA foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo: de 5 a 10ng de DNA genômico, 1 x tampão de PCR, 0,2 mM de dNTPS; 0,1 mg/ml BSA, 2,0 mM MgCL₂; 0,2 µl de cada *primer*, 1 unidade *Taq* DNA Polimerase. Posteriormente, as reações de PCR foram realizadas em termocicladores seguindo as mesmas condições descritas por Ott (2002) que consistiam nos seguintes ciclos de amplificação: uma etapa inicial de desnaturação a 93°C por 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 93°C; 1 minuto de anelamento a 51,5°C; 1 minuto de extensão a 72°C, seguidos de um período de 10 minutos de extensão final a 72°C.

Após as reações, uma pequena alíquota dos produtos de PCR (4µl) foi utilizada para verificar os resultados das amplificações através de eletroforese horizontal em géis de agarose 1,0%. No caso de amplificações de boa qualidade, o restante do volume da reação de PCR foi purificado para a retirada de nucleotídeos não incorporados, excesso de *primers* ou impurezas, utilizando-se o Kit enzimático Exo-Sap. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o “*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MEGABACE*” (Amersham Biosciences), e a seguir analisados em seqüenciador automático MEGABACE do Centro de Genômica Molecular da PUCRS, seguindo os protocolos que acompanham o aparelho. Os cromatogramas obtidos foram primeiramente analisados com o programa Chromas 2.33 (Technelysium) e para a montagem das seqüências consenso foi utilizado o programa Phred-Phrap (Ewing *et al.*, 1998).

As seqüências obtidas neste trabalho foram então inseridas em uma base de dados incluindo as sequencias da região controle do DNAm_t de *P. blainvillei* previamente geradas por Secchi *et al.* 1998 (n=20, GenBank AF037593 e AF037594),

Lázaro 2004 (n=69, GenBank AY644430.1-AY644451.1), Ott. 2002 (n= 232) e Mendez 2008 (n=264, Genbank EF394099–EF394117) totalizando 512 sequências (Rio de Janeiro, n = 31; São Paulo, n = 35; Paraná, n = 13; Santa Catarina, n = 17; Rio Grande do Sul, n = 70; Uruguai, n = 45; e Argentina, n = 301).

3.5. Análise dos Dados de Microssatélites

Para a identificação de possíveis erros de genotipagem devido à presença de *stutters* (pequenas alterações no tamanho dos alelos durante o PCR), *allele drop-out* (quando alelos maiores não amplificam tão eficientemente quanto alelos menores) e alelos nulos (quando um ou mais alelos falham ao amplificar), foi utilizado o programa MICRO-CHECKER (Oosterhout *et al.*, 2004). A diversidade genética nuclear foi calculada para cada população considerando o número de alelos por *locus* (A), a heterozigosidade observada (H_O), a heterozigosidade esperada (H_E), a riqueza alélica (AR) para todos os *loci* de microssatélites e o *F_{is}* como uma estimativa da existência de endocruzamento. Estas estimativas foram calculadas utilizando-se os programas FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) e ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). As frequências alélicas foram determinadas com o programa GENEPOP 4.1 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008). Os testes de desvio de equilíbrio de ligação entre os locos e de desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados pelos programas GENEPOP 3.4 e ARLEQUIN 3.11. A correção sequencial de Bonferroni foi aplicada aos dados a fim de ajustar os níveis de significância para os testes de equilíbrio de ligação e de Hardy-Weinberg, levando em conta múltiplas comparações no mesmo conjunto de dados (Rice 1989).

Dois diferentes programas desenvolvidos para análise da estrutura populacional dos organismos foram utilizados neste estudo. Primeiramente, o método Bayesiano implementado no programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para definir o número de populações geneticamente diferenciadas em nossa amostra total, e simultaneamente associar os indivíduos às suas populações fonte. Nesta análise foi testada a possibilidade de existência de até 10 populações diferenciadas (K= 1-10). Para cada K foram realizadas 10 corridas independentes a fim de averiguar a consistência dos dados. Para todas as corridas foi assumido o modelo de mistura com locos não ligados e frequências correlacionadas (Falush *et al.*, 2003), sem a utilização

de informações prévias de origem geográfica. A análise no STRUCTURE compreendeu 1.000.000 interações de MCMC (Markov Chain Monte Carlo) seguidas de um período de *burn-in* de 500.000 interações. A segunda análise foi realizada pelo programa STRUCTURAMA (Huelsenbeck & Andolfatto, 2007), em uma corrida consistindo de 1.000.000 de ciclos, com o número de populações definido como uma variável randômica.

A relação entre todos os indivíduos foi também verificada pela análise fatorial de correspondência (FCA) com o programa GENETIX v. 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 1996 – 1998). A FCA é uma análise exploratória que detecta a melhor combinação linear das variáveis (frequências alélicas em diferentes locos) e descreve a variação entre os indivíduos amostrados, otimizando as diferenças entre estes. Desta maneira, a relação entre os indivíduos pode ser visualizada em dois ou três eixos em um gráfico bi ou tridimensional.

Para determinar o grau de diferenciação genética entre as populações definidas, foram calculados, a partir da Análise de Variância Molecular (AMOVA), os índices F_{ST} (Wright, 1951) e R_{ST} (Slatkin, 1995), conforme os métodos descritos por Weir & Cockerham (1984) e Michalakis & Excoffier (1996), respectivamente. Estas análises de variância molecular foram realizadas utilizando o programa ARLEQUIN 3.11 (Schneider, 2005), e a significância dos testes estatísticos foi obtida por meio de 10.000 permutações segundo o método descrito por Excoffier *et al.* (1992). A AMOVA e análise de diferenciação populacional para a par foi realizada para três diferentes cenários populacionais. O primeiro compreendendo as quatro FMAs reconhecidas atualmente: FMA1 = Rio de Janeiro (RJ), FMA2 = São Paulo, Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), FMA3 = Rio Grande do Sul (RS) e Uruguai (URU) e FMA4 = Argentina (ARG). O segundo cenário envolveu uma divisão máxima ao nível político de estados e países, incluindo um total de sete populações: RJ, SP, PR, SC e RS no Brasil, e URU e ARG. Por fim, o terceiro cenário incluiu apenas as três populações identificadas nas análises com os programas STRUCTURE e STRUCTURAMA (ver resultados abaixo). A partir da análise individual de cada cenário estipulado, a representação mais plausível da estrutura populacional real de *P. blainvillei* inferida pela análise dos locos de microsatélite foi selecionada de acordo com os maiores valores obtidos para a análise da variância molecular.

Taxas de migração entre os pares de populações reconhecidas pelas análises anteriores e o parâmetro θ , foram estimados com o método de coalescência do programa MIGRATE-n 3.2.6 (Beerli & Felsenstein, 1999; 2001; Beerli, 2004). O número de migrantes por geração (Nm) foi obtido a partir da multiplicação dos valores obtidos pelo programa para a taxa de migração “M”, pelos valores obtidos de θ para a população recipiente em cada par de comparações. A análise foi realizada utilizando-se o modelo Browniano, com uma distribuição uniforme e uma taxa de mutação constante entre os locos. Foi utilizado o método Bayesiano consistindo de uma cadeia longa de 500.000 passos e incremento amostral de 100, seguidos de um *burn-in* de 50.000 passos. O tamanho efetivo das populações de acordo com os dados de microsatélite foram estimados a partir da fórmula $N_e = \theta / 4\mu g$, com uma taxa de substituição de 10^{-4} (Whitaker *et al.*, 2003; Hedrick, 2005) e também através do programa LDNE (Waples & Do, 2008) que se baseia no método do equilíbrio de ligação e implementa a correção de Waples (2006). Para tanto foi utilizado o método de Jackknife sob o modelo de cruzamento randômico e valor crítico (P_{crit}) de 0,05.

3.6. Análise dos dados – DNA mitocondrial

As sequências foram alinhadas automaticamente utilizando o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e o alinhamento corrigido manualmente com o auxílio do programa Mega v.4 (Tamura *et al.*, 2007).

Estimativas de diversidade genética, tais como número de haplótipos, diversidade nucleotídica e haplotípica para a espécie como um todo, assim como para as quatro FMAs atualmente reconhecidas, foram realizadas pelo programa Arlequin 3.11. Utilizando o programa Network v. 4.201 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), foi construída uma rede de haplótipos com o método *median joining network* (Bandelt *et al.*, 1999) para estimar as relações genealógicas entre as sequências, e a distribuição e frequência dos haplótipos identificados ao longo da área amostrada. O programa BEAST v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2006) foi utilizado com para datar o ancestral comum mais recente da espécie (do inglês: *the times of the most recent common ancestor* [TMRCAs]), assim como verificar o padrão de relação filogenética dos haplótipos encontrados. Para este fim, foi utilizado o relógio molecular estrito com o modelo de substituição GTR e *gamma* de 8 categorias em uma

corrida de 50.000.000 de passos. Para esta análise foi utilizada uma taxa média de substituição de $3,25 \times 10^{-8}$ substituições/sítio/ano, com limites mínimos e máximos de 5×10^{-9} e 7×10^{-8} (Hoelzel *et al.*, 1991; Harlin *et al.*, 2003). Foi incluída a sequência de *Inia geoffrensis*, o boto-vermelho da Amazônia, espécie utilizada como grupo externo (Santos *et al* 2005., número de acesso no *GenBank*: DQ217408.1 e DQ217405.1).

Níveis de diferenciação genética entre diferentes áreas geográficas amostradas foram avaliados através da AMOVA e cálculo dos índices de fixação (Φ_{ST}) par a par, utilizando-se o programa ARLEQUIN 3.11. A significância estatística destes parâmetros foi estimada a partir da simulação de 10.000 permutações geradas randomicamente. A partir dos índices de Φ_{ST} foram estimados neste mesmo programa o número de indivíduos migrantes por geração (Nm), para cada par de populações. A AMOVA para os dados mitocondriais foi avaliada para os três mesmos cenários populacionais descritos acima na análise dos locos de microssatélite.

Estimativas do parâmetro θ para cada população e das taxas migração “M” também foram realizadas por meio da análise Bayesiana implementada no programa LAMARC (Kuhner, 2006). O número de migrantes por geração (Nm) foi obtido a partir da multiplicação dos valores de “M” pelo θ da população recipiente em cada par de comparações, conforme descrito no manual do programa. Para tanto, foi executada uma cadeia com 500.000 genealogias, com amostras coletadas a cada 100 passos e *burn-in* de 50.000 amostras descartadas.

Foram realizados testes de neutralidade com Fu’s Fs (Fu, 1997) e Tajima’s D (Tajima, 1989) com o programa ARLEQUIN 3.11. Oscilações no tamanho populacional ao longo do tempo foram avaliadas no DNAmT através do programa BEAST v 1.6.1 (Drummond *et al.*, 2005) pelo método Bayesiano *Skyline Plot*, seguindo os mesmos parâmetros utilizados na análise do ancestral comum mais recente da espécie. O programa Lamarc foi ainda utilizado para estimar o parâmetro θ utilizado no cálculo do tamanho efetivo das fêmeas através da variabilidade do mtDNA usando a fórmula $N_{ef} = \theta / 2\mu.g$ e a taxa de substituição de $3,25 \times 10^{-8}$ por sítio/ano (μ) e 2,5 anos como tempo de geração (g) (intervalo entre a idade que atinge maturidade sexual e a mínima senescência).

4. Resultados

4.1. DNA Microssatélite

Foram genotipados um total de 21 indivíduos para 11 locos distintos. Estes indivíduos foram agrupados com aqueles previamente gerados por Ott 2002 (n=207), totalizando 228 amostras genotipadas. Foram encontrados 99 alelos e todos os 11 locos analisados mostraram-se polimórficos para a espécie. Com exceção do Rio de Janeiro e do Uruguai, todas as outras regiões apresentaram alelos exclusivos, sendo o Rio Grande do Sul a região com o maior número (7) e o Paraná e Santa Catarina SC) as regiões com o menor número (1 cada um) (Figura 2). Quando considerada a população como um todo, sete dos 11 locos analisados apresentaram desvios significativos entre a heterozigosidade observada e a esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$, após correção de Bonferroni). Entretanto, considerando a amostragem total subdividida conforme às quatro FMAs atualmente reconhecidas para a espécie, apenas quatro loci apresentaram desvios significativos entre a heterozigosidade observada e a esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$, após correção de Bonferroni) (Tabela 1). O teste de desequilíbrio de ligação indicou não haver desequilíbrio entre os locos analisados para *P. blainvillei* (nível de significância $\alpha = 0,05$, incluindo correção de Bonferroni para 165 comparações). A análise dos locos de microssatélite com o programa MICROCHECKER considerando-se a amostra como um todo detectou evidências da ocorrência de alelos nulos em muitos locos. No entanto, com a divisão da amostra nas quatro FMAs nenhum loco apresentou evidências de alelos nulos, sendo as primeiras evidências associadas à estruturação genética na espécie.

Para a amostra como um todo, a diversidade genética estimada para *P. blainvillei* foi relativamente alta com $H_o = 0,629$ e número médio de alelos = 9. A análise individual para cada uma das quatro FMAs detectou os maiores índices de diversidade para as populações do RS/URU e ARG, e os menores para a população do RJ (Tabela 1). Os testes estatísticos realizados com o programa FSTAT para comparar os níveis de diversidade encontrados entre as diferentes populações indicaram a existência de valores significativamente menores de heterozigosidade observada e riqueza alélica para a população do RJ quando comparada às populações do URU/RS e ARG ($p < 0,05$). Das quatro FMAs, apenas a FMA1 referente ao RJ e a FMA2 correspondente aos estados de SP/PR/SC apresentaram valores significativos de F_{is} ,

indicando a existência de endocruzamento nestas populações ($F_{is} = 0,092$ e $0,161$, respectivamente; $p < 0,05$).

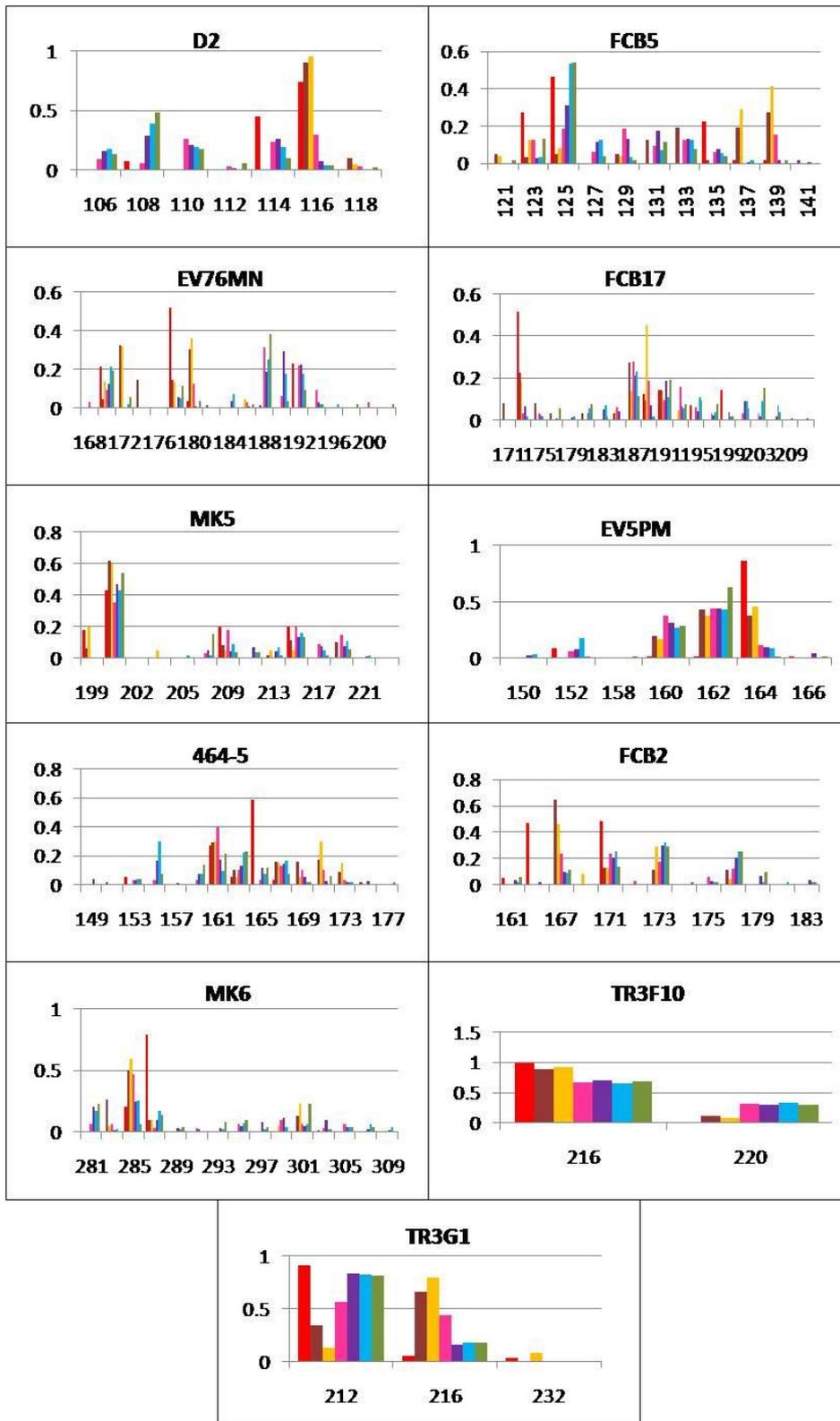


Figura 2- Frequências alélicas para cada loco por região: ■ Rio de Janeiro, ■ São Paulo, ■ Paraná, ■ Santa Catarina, ■ Rio Grande do Sul, ■ Uruguai,

Tabela 1 – Diversidade genética encontrada para cada loco de microsatélite analisado, considerando a amostra como um todo e para cada uma das 4 FMAs atualmente reconhecidas para *P. blainvillei*. A = número de alelos, E = número de alelos exclusivos, Ho = heterozigosidade observada, He = heterozigosidade esperada.

| Loco | FMA 1 | | | | | FMA 2 | | | | | FMA 3 | | | | | FMA 4 | | | | | Geral | | |
|---------------|-------|---|-------|--------|-------|-------|---|-------|--------|-------|-------|----|-------|-------|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--------|-------|
| | A | E | AR | Ho | He | A | E | AR | Ho | He | A | E | AR | Ho | He | A | AR | E | Ho | He | A | Ho | He |
| D22 | 3 | 0 | 3,00 | 0,310 | 0,416 | 11 | 0 | 5,89 | 0,237* | 0,444 | 11 | 0 | 5,37 | 0,743 | 0,773 | 6 | 6,96 | 0 | 0,615 | 0,720 | 7 | 0,541* | 0,785 |
| FCB2 | 3 | 0 | 2,99 | 0,517 | 0,557 | 15 | 1 | 6,41 | 0,600 | 0,697 | 20 | 1 | 8,56 | 0,792 | 0,801 | 9 | 8,88 | 1 | 0,807 | 0,825 | 11 | 0,701* | 0,825 |
| FCB17 | 5 | 0 | 5,00 | 0,643 | 0,682 | 26 | 1 | 10,97 | 0,775 | 0,855 | 34 | 3 | 14,71 | 0,848 | 0,897 | 13 | 12,88 | 0 | 0,961 | 0,907 | 20 | 0,817 | 0,899 |
| MK6 | 2 | 0 | 2,00 | 0,276 | 0,333 | 19 | 0 | 8,20 | 0,620 | 0,695 | 29 | 1 | 12,27 | 0,834 | 0,870 | 11 | 10,96 | 0 | 0,807 | 0,867 | 15 | 0,702* | 0,847 |
| TR3G1 | 3 | 0 | 2,98 | 0,103 | 0,163 | 7 | 0 | 2,68 | 0,305* | 0,483 | 4 | 0 | 2,00 | 0,258 | 0,277 | 2 | 2,00 | 0 | 0,360 | 0,301 | 3 | 0,262* | 0,410 |
| FCB5 | 5 | 0 | 4,72 | 0,724 | 0,667 | 24 | 0 | 9,43 | 0,745 | 0,856 | 18 | 0 | 7,95 | 0,752 | 0,797 | 9 | 8,88 | 0 | 0,653 | 0,681 | 11 | 0,735* | 0,837 |
| EV76Mn | 4 | 0 | 3,99 | 0,536* | 0,642 | 21 | 3 | 10,35 | 0,586* | 0,844 | 22 | 3 | 8,72 | 0,858 | 0,818 | 11 | 10,84 | 2 | 0,807 | 0,800 | 17 | 0,742* | 0,874 |
| TR3F10 | 2 | 0 | 1,89 | 0,036 | 0,035 | 6 | 0 | 2,00 | 0,305 | 0,283 | 4 | 0 | 2,00 | 0,407 | 0,429 | 2 | 2,00 | 0 | 0,461 | 0,434 | 2 | 0,340 | 0,362 |
| MK5 | 4 | 0 | 4,00 | 0,678 | 0,720 | 17 | 1 | 7,41 | 0,614 | 0,675 | 22 | 4 | 9,14 | 0,741 | 0,747 | 8 | 7,92 | 0 | 0,615 | 0,674 | 13 | 0,681 | 0,723 |
| 464/5 | 5 | 0 | 4,99 | 0,536 | 0,584 | 24 | 1 | 8,82 | 0,722 | 0,819 | 22 | 2 | 10,98 | 0,862 | 0,874 | 11 | 10,88 | 1 | 0,884 | 0,869 | 15 | 0,788 | 0,875 |
| EV5Pm | 5 | 0 | 4,58 | 0,242 | 0,252 | 10 | 0 | 3,68 | 0,614 | 0,668 | 11 | 1 | 5,60 | 0,716 | 0,696 | 6 | 5,85 | 1 | 0,538 | 0,522 | 7 | 0,608* | 0,712 |
| MÉDIA | 3,72 | 0 | 3,123 | 0,369 | 0,459 | 16,36 | 7 | 4,911 | 0,454 | 0,665 | 197 | 15 | 6,04 | 0,710 | 0,725 | 88 | 6,002 | 5 | 0,683 | 0,691 | 11 | 0,629 | 0,740 |

Na análise Bayesiana realizada com o programa STRUCTURE para estimar o número de populações geneticamente diferenciadas no conjunto total de dados, a maior verossimilhança encontrada correspondeu ao valor de $K = 3$ (mean LN P(D) = -7463,18) (Figura 3). De acordo com este resultado, a população do estado do RJ foi associada ao Grupo 1 com valor de associação igual a 0,978. As populações dos estados de SP e PR (com exceção de um indivíduo do Paraná que apresentou alta probabilidade de pertencer ao grupo do Sul) (Figura 4 e 5) foram associadas ao Grupo 2 com valores de 0,979 e 0,903, respectivamente. O Grupo 3 incluiu todas as populações amostradas mais ao sul da distribuição da espécie, incluindo aquelas previamente associadas à FMA3 (RS e URU) e a ARG, associada previamente à FMA4 (valores de associação de cada população = 0,963, 0,978 e 0,963, respectivamente). A única região simultaneamente associada a dois dos grupos reconhecidos pela análise no STRUCTURE foi SC com 0,686 de associação ao Grupo 3 e 0,306 ao Grupo 2, indo de encontro ao agrupamento prévio de SC como um todo à FMA2 (Figura 4). Avaliando-se a proporção de associação individual das amostras obtidas em SC pôde-se verificar a existência de uma divisão geográfica das amostras em cada uma das populações. Todas as amostras obtidas na metade sul do estado de SC foram incluídas no Grupo 3, com valores de associação extremamente altos (todos maiores que 0,95). Do mesmo modo, as amostras provenientes da metade norte do estado foram predominantemente associadas ao Grupo 2 [5/8 (62,5%) com valores acima de 0,95]. Segundo as procedências das amostras do estado de SC, esta divisão parece não ser exata. Os indivíduos que associaram-se predominantemente ao grupo do Norte eram provenientes da localidade de Barra Velha (26°39'7.48"S e 48°41'29.41"O) e o limite norte dos indivíduos que associaram-se ao grupo do Sul foi a localidade de Garopaba (28°2'57.99"S e 48°36'42.21"O). Os resultados obtidos com a análise no programa STRUCTURAMA foram exatamente idênticos aos obtidos com o STRUCTURE, incluindo o mesmo número de populações identificadas e exatamente o mesmo agrupamento de indivíduos.

O mesmo padrão de estruturação genética foi observado com a análise Fatorial de Correspondência (FCA), onde podemos verificar a formação de três agrupamentos ao longo dos três primeiros eixos. O primeiro deles foi formado exclusivamente pelas amostras provenientes da região mais ao norte da distribuição da espécie, no estado do RJ. O segundo grupo foi representado por amostras provenientes da região centro-norte

da distribuição compreendendo os estados de SP e PR e ainda a maior parte das amostras obtidas no norte de SC. E por fim, o terceiro grupo compreendeu as amostras obtidas na região centro-sul e extremo ao sul incluindo aquelas obtidas no sul do estado de SC, no RS, URU e ARG (Figura 5).

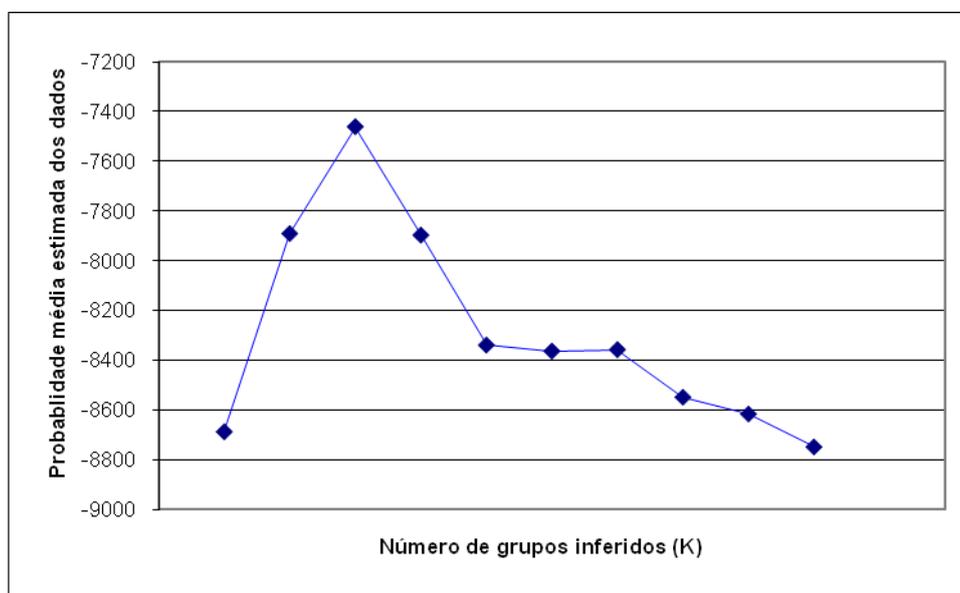


Figura 3 – Resultado do Programa STRUCTURE para o número de populações de *P. blainvillei* geneticamente diferenciadas no conjunto total de dados.

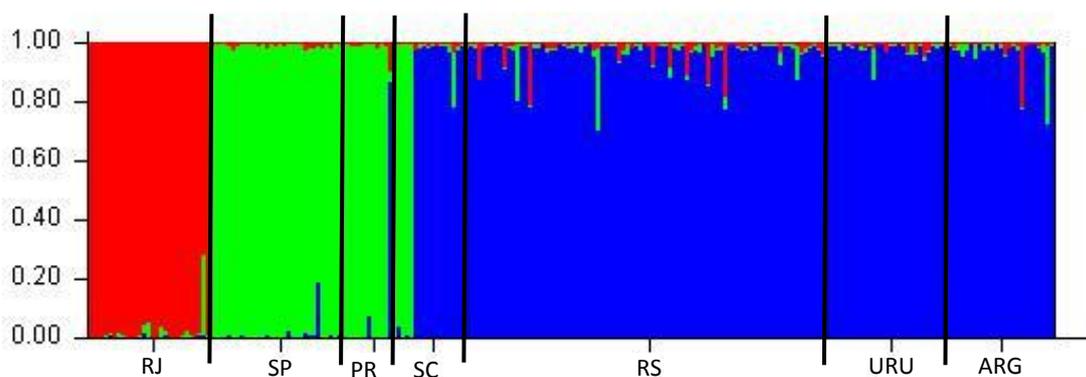


Figura 4 – Gráfico de barras mostrando as populações de *P. blainvillei* geneticamente identificadas pelo programa STRUCTURE. Cada barra indica um indivíduo e as cores indicam os três grupos definidos pelo programa: Grupo 1 – vermelho (RJ/ES); Grupo 2 verde (SP/PR e norte de SC); Grupo 3 – azul (sul de SC, RS, URU e ARG). Nota: Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a probabilidade deste pertencer a determinadas populações simultaneamente.

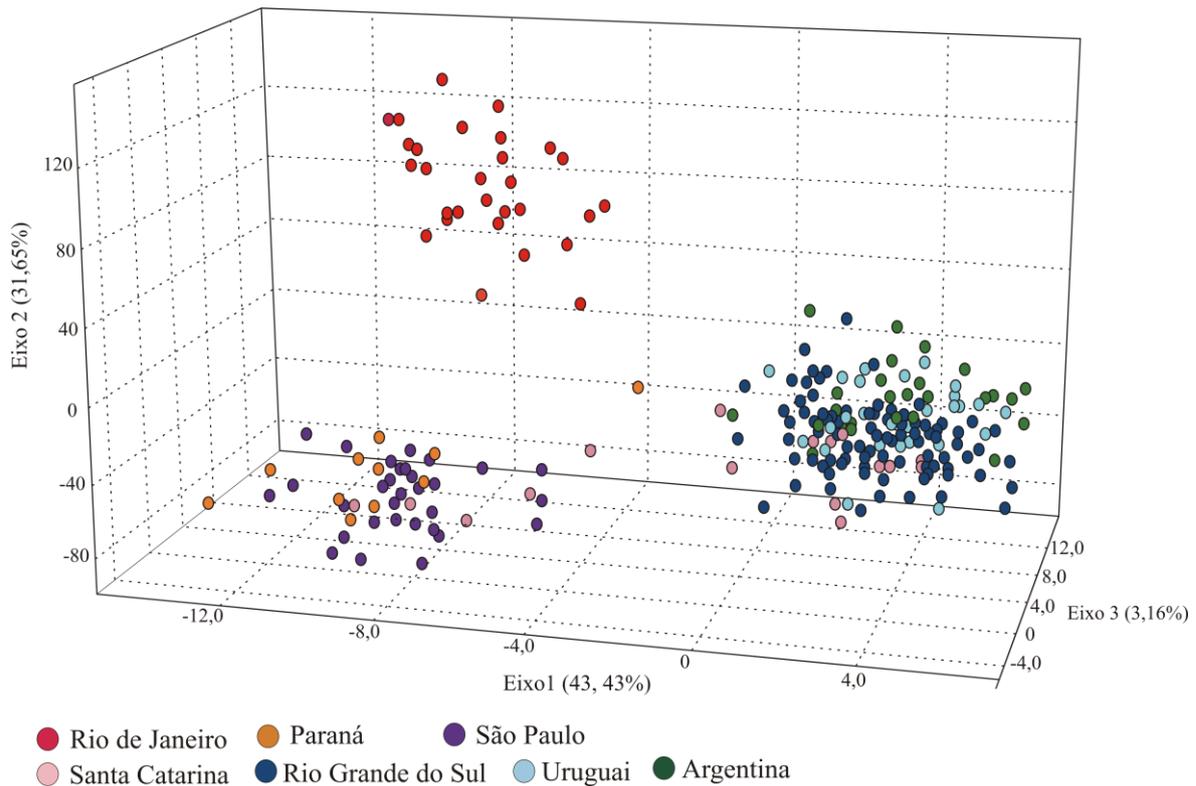


Figura 5 – Gráfico da Análise Fatorial de Correspondência (FCA), mostrando a distribuição das amostras de *P. blainvillei* nos três primeiros eixos fatoriais.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) de acordo com os índices de fixação F_{ST} e R_{ST} , utilizada para o teste de diferenciação genética da espécie mostrou haver uma diferenciação significativa dentro da espécie. Dos três diferentes cenários testados para a espécie, o de maior diferenciação entre os grupos de populações foi o Cenário 3, que compreendeu os três subgrupos definidos pelos programas STRUCTURE e STRUCTURAMA: Grupo 1 (RJ), incluindo RJ e ES, Grupo 2 (Norte), incluindo SP, PR e norte de SC e Grupo 3 (Sul), incluindo sul de SC, RS, URU e ARG ($F_{ST} = 0,179$ e $R_{ST} = 0,241$, $p < 0,01$) (Tabela 2). Os valores de F_{ST} e R_{ST} encontrados entre subgrupos foram extremamente elevados sugerindo um alto nível de diferenciação genética entre estas regiões (Tabela 3). A mesma análise realizada considerando-se a divisão em sete populações, referente ao Cenário 2, mostraram ainda existir uma subestruturação dentro do agrupamento do Sul, entre a população do RS e da ARG (Tabela 4), no entanto uma análise realizada com o programa STRUCTURE para o mesmo agrupamento de forma independente não detectou nenhum tipo de

subestruturação, sendo a maior probabilidade encontrada para $K = 1$. Quanto ao número de migrantes por geração estimado através do programa MIGRATE, os valores encontrados entre as três populações definidas pelo programa STRUCTURE foram extremamente baixos (< 1), sendo valores menores do que aqueles considerados suficientes para homogeneizar geneticamente diferentes subpopulações (Lacy 1987; Mills & Allendorf, 1996) (Tabela 5).

Tabela 2 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada em F_{ST} e R_{ST} para os dados de microssatélite para os diferentes cenários populacionais.

| Cenário | | Porcentagem de variação | | Índice de Fixação |
|-----------------------------|----------|-------------------------|---------------------|-------------------|
| | | Dentro das populações | Entre as populações | |
| 1) Divisão em 4 FMAs | F_{ST} | 86,48 | 13,52 | 0,135 |
| | R_{ST} | 82,90 | 17,10 | 0,170 |
| 2) Divisão nas 7 populações | F_{ST} | 87,24 | 12,76 | 0,127 |
| | R_{ST} | 81,26 | 18,74 | 0,187 |
| 3) Divisão em 3 populações | F_{ST} | 82,06 | 17,94 | 0,179 |
| | R_{ST} | 75,87 | 24,13 | 0,241 |

Tabela 3 - Valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) e de R_{ST} (acima da diagonal) obtidos a partir da análise de Microssatélites para o segundo terceiro cenário populacional testado.

| | RJ | Norte | Sul |
|--------------------------------|--------|--------|--------|
| Rio de Janeiro (RJ) | | 0,114* | 0,218* |
| Norte (SP, PR e norte de SC) | 0,254* | | 0,267* |
| Sul (sul de SC, RS, URU e ARG) | 0,196* | 0,152* | |

*Valores significativos para $p < 0,05$

Tabela 4 - Valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) e de R_{ST} (acima da diagonal) obtidos a partir da análise de Microssatélites para o segundo cenário populacional.

| | RJ | SP | PR | SC | RS | URU | ARG |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Rio de Janeiro (RJ) | | 0,123* | 0,160* | 0,211* | 0,215* | 0,248* | 0,248* |
| São Paulo (SP) | 0,261* | | 0,037 | 0,317* | 0,318* | 0,367* | 0,372* |
| Paraná (PR) | 0,286 | 0,011 | | 0,261* | 0,256* | 0,288* | 0,269* |
| Santa Catarina (SC) | 0,239* | 0,090* | 0,101* | | 0,000 | 0,031* | 0,065* |
| Rio Grande do Sul (RS) | 0,198* | 0,154* | 0,167* | 0,025* | | 0,013 | 0,037* |
| Uruguai (URU) | 0,224* | 0,180* | 0,194* | 0,039* | 0,003 | | 0,006 |
| Argentina (ARG) | 0,247* | 0,186* | 0,197* | 0,052* | 0,022* | 0,009 | |

*Valores significativos para $p < 0,05$

Tabela 5 – Tamanho efetivo (N_e) (diagonal) e número de migrantes por geração entre os três grupos definidos pelos programas STRUCTURE e STRUCTURAMA para os locos de microssatélites analisados. Estimativas obtidas pela análise no programa MIGRATE segundo método Bayesiano.

| | RJ/ES | Norte | Sul |
|-------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| RJ/ES | 20 (0 – 400) | 0,63 (0,00 – 2,64) | 0,98 (0,00 – 26,00) |
| Norte | 0,08 (0,00 – 2,32) | 380 (0 – 880) | 0,98 (0,00 – 22,00) |
| Sul | 0,13 (0,00 – 3,40) | 0,98 (0,00 – 2,73) | 19.620 (15.040 – 19.880) |

A estimativa do tamanho efetivo de cada população pelo LDNE indicou o maior valor para o agrupamento Sul, com uma média de 622,1 indivíduos com um intervalo de confiança de 268,9 a infinito, sendo que a inclusão de “infinito” no intervalo, segundo manual do programa, indica não haver evidência de nenhum desequilíbrio de ligação causado pela deriva genética, devido a um número finito de indivíduos reprodutivos. Em contraste ao alto tamanho efetivo encontrado para o agrupamento Sul, os valores encontrados para os agrupamentos do RJ e Norte foram extremamente baixos incluindo 23,8 indivíduos (10,9 – 94,4) para o primeiro e 56,2 (34,6 – 113,6) para o segundo, sendo condizente com os valores significativos de F_{is} encontrados para estas mesmas populações.

4.2. DNA Mitocondrial

Obtivemos neste estudo, 21 novas sequências da região controle do DNAm_t de 538 pares de base (pb). Estas sequências foram agrupadas com aquelas previamente geradas por Ott (2001) (n=137), e com aquelas anteriormente publicadas por Secchi *et al.* (1998) para a costa brasileira (n=20), por Lázaro *et al.* (2001) para a costa uruguaia (n=38) e argentina (n=31) e por Mendez *et al.* (2010) também para a costa argentina (n=265), resultando em um total de 512 sequências provenientes de praticamente toda a distribuição geográfica da espécie

A análise da região consenso (487 pb) das sequências obtidas nestes estudos revelou a existência de 56 sítios polimórficos, resultando em 61 haplótipos distintos (Anexo 1). Não foi detectada nenhuma inserção ou deleção sendo a maioria das substituições compostas por transições (47 transições e 9 transversões). As diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) observadas para a espécie como um todo foram $h=0,8953 \pm 0,0081$ e $\pi=1,13\% \pm 0,60\%$. As mesmas análises de diversidade genética foram também executadas para as 4 FMAs previamente estabelecidas conforme mostra a Tabela 6. O maior nível de diversidade genética foi observado para a FMA3 (RS e URU) e para a FMA 4 (ARG) com valores semelhantes àqueles encontrados para a espécie como um todo.

Tabela 6 - Diversidade genética estimada para a região controladora do DNAm_t (487pb) nas 4 FMAs atualmente reconhecidas para *P. blainvillei*.

| População | N | A | h | π (%) |
|----------------|-----|----|-------------------|---------------|
| FMA1(ES/RJ) | 31 | 8 | 0,635 \pm 0,090 | 0,6 \pm 0,3 |
| FMA2(SP/PR/SC) | 56 | 10 | 0,767 \pm 0,037 | 1 \pm 0,5 |
| FMA3(RS/URU) | 121 | 22 | 0,857 \pm 0,021 | 1,1 \pm 0,5 |
| FMA4(ARG) | 42 | 40 | 0,870 \pm 0,011 | 1,1 \pm 0,5 |

N=número amostral. A=número de haplótipos. h=diversidade haplotípica. π =diversidade nucleotídica

A árvore filogenética e a rede de haplótipos indicaram a presença de uma moderada estruturação genética entre as regiões amostradas (Figuras 6 e 7). Na rede de

haplótipos é possível observar o compartilhamento dos haplótipos mais centrais e frequentes pelas sete populações consideradas (RJ, SP, PR, SC, RS, URU e ARG), juntamente com a existência de haplótipos derivados e exclusivos em todas as populações. Além disso, pode-se observar nesta mesma análise a existências de um padrão sugestivo da ocorrência de um processo de expansão populacional ao longo da história evolutiva da espécie. Na árvore filogenética é possível verificar a existência de quatro grupos monofiléticos principais com altos valores de suporte ($> 0,90$). No primeiro grupo encontram-se exclusivamente os haplótipos provenientes da região mais ao sul da distribuição da espécie (ARG, URU, RS e SC); no segundo há predominantemente indivíduos da mesma região, com a presença de alguns de áreas mais ao norte, como SP, PR e RJ; no terceiro encontram-se, também, exclusivamente indivíduos do sul, enquanto que no quarto há uma clara divisão em dois subgrupos onde o primeiro agrupa indivíduos exclusivamente do RJ e o segundo agrupa indivíduos do RJ e de outras regiões do norte da distribuição da espécie (SP, PR, além de 4 indivíduos do norte de SC).

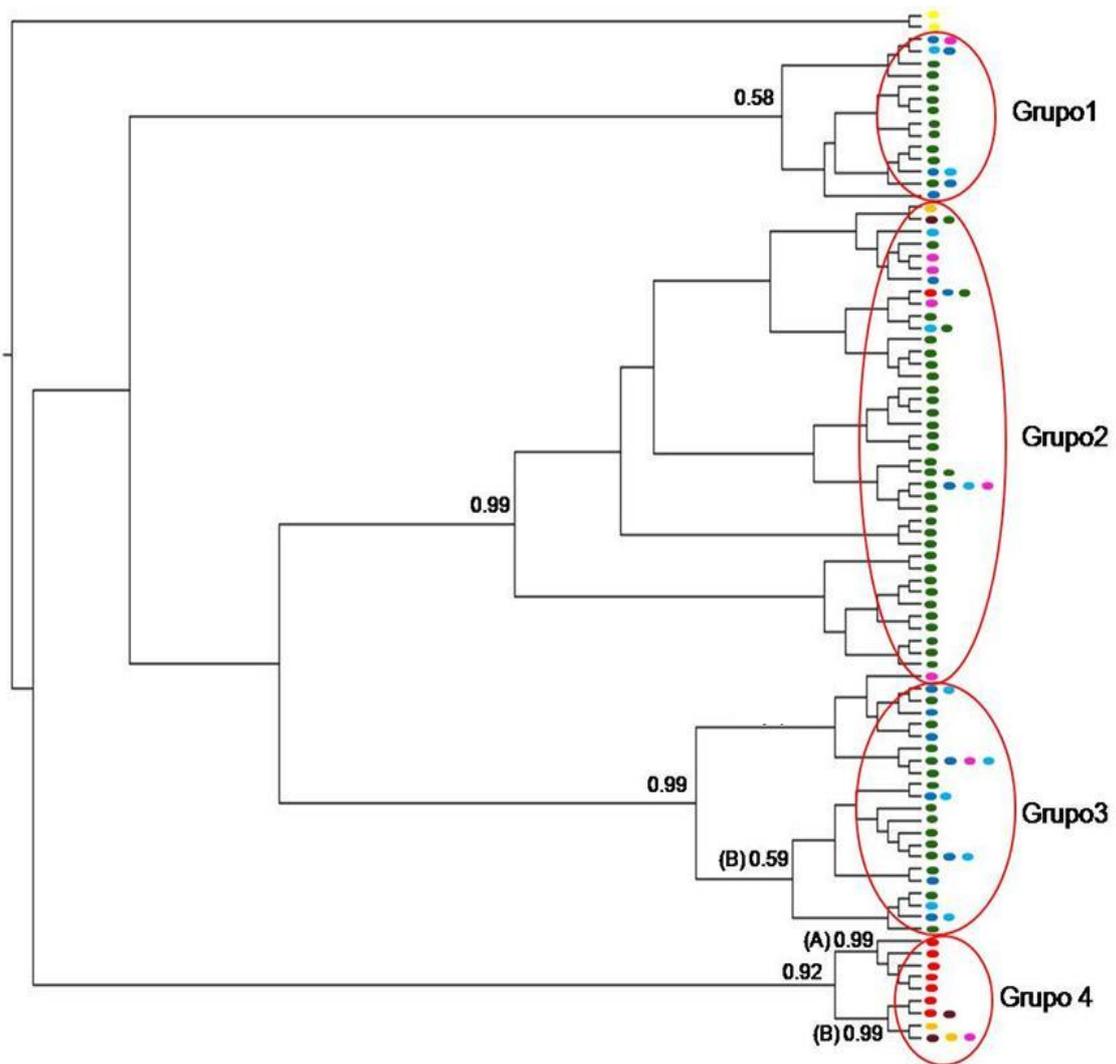


Figura 6- Árvore Filogenética dos haplótipos encontrados para a região controladora do DNAMt em *Pontoporia blainvillei*, reconstruída através do método bayesiano. Valores de Botstrap acima de 50%. Legenda: ● Grupo Externo (*Inia geoffrensis*) ● RJ ● SP ● PR ● SC ● RS ● URU ● ARG

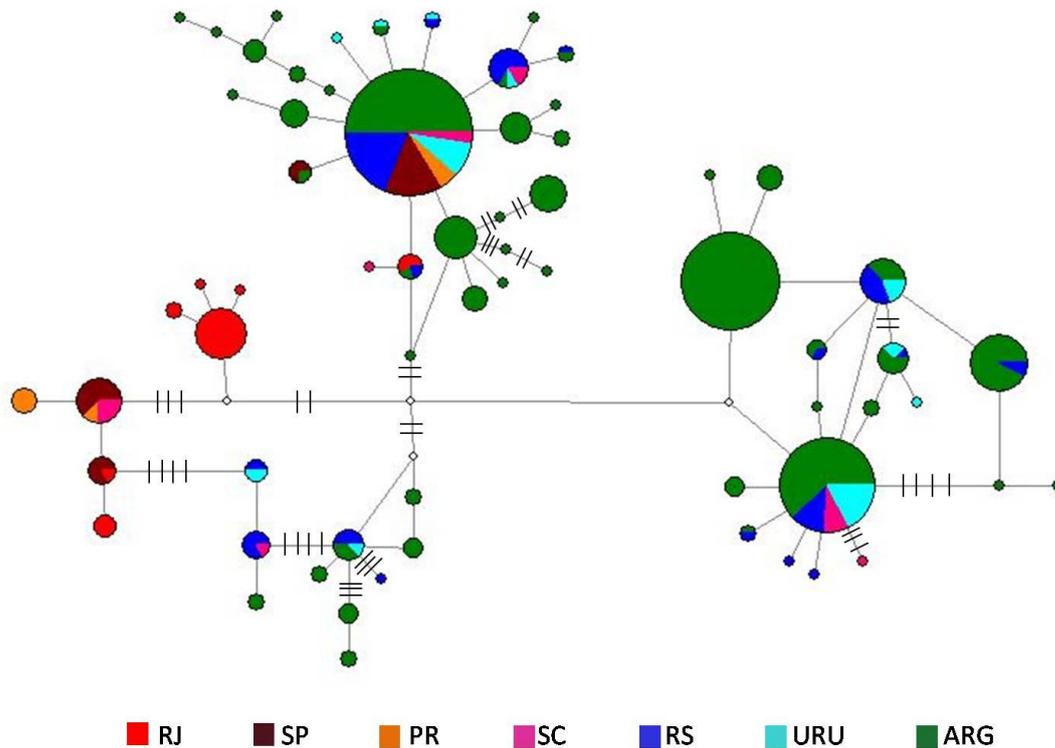


Figura 7 - Rede de haplótipos construída com base na região controladora do DNA mitocondrial de *P. blainvillei*. Cada haplótipo está representado por um círculo proporcional em tamanho à sua frequência, as cores indicam a frequência de cada haplótipo à cada uma das sete regiões amostradas. As barras nos ramos de conexão entre os haplótipos indicam o número de substituições entre estes (demonstradas apenas nos casos com mais de uma substituição).

Com relação às estimativas de fluxo gênico específicas, o maior valor de Φ_{ST} na análise de variância molecular (AMOVA) foi obtido para o Cenário 3 com a divisão da amostra nas três populações identificadas nas análises com os microssatélites (Tabela 7). Os índices de diferenciação par a par, observados para o DNAm_t entre estas populações, foram bastante altos, assim como aqueles encontrados para os dados de microssatélites, indicando uma profunda diferenciação genética entre estes grupos (Tabela 8). Através da análise dos Φ_{ST} par a par, ainda pode-se observar a existência de uma subestruturação dentro dos agrupamentos maiores como, por exemplo, entre RS e URU ($\Phi_{ST} = 0,072$, $p < 0,001$) e entre RS e ARG ($\Phi_{ST} = 0,050$, $p < 0,001$) dentro do agrupamento Sul (Tabela 9). O número de migrantes por geração estimado a partir do

índice Φ_{ST} entre as três populações consideradas no Cenário 3 foi extremamente baixo, em acordo com as estimativas obtidas pelo programa MIGRATE para os dados de microsatélite. O mesmo resultado foi corroborado pela análise bayesiana realizada no programa LAMARC, onde um baixo fluxo gênico foi detectado entre estas populações, sendo o maior valor encontrado entre a população do Norte em direção a população do Sul [1,173 (0,138 – 4,373)] (Tabela 10). Ainda com relação aos valores de Φ_{ST} e número de migrantes obtidos, pôde-se verificar a existência de um forte isolamento da população do RJ com relação a todas as demais, com valores de Φ_{ST} variando de 0,319 a 0,437 e número de migrantes de 0,642 a 1,067. Com relação à SC, considerada como pertencente à FMA2, juntamente com o estado de SP, os valores obtidos de Φ_{ST} foram extremamente altos com esta última população, assim como com o PR (0,168 e 0,156 respectivamente; $p < 0,001$), principalmente se compararmos com os baixos valores encontrados entre SC e as populações amostradas mais ao sul como RS, URU e ARG. Considerando-se as quatro subpopulações pertencentes ao grupo do Sul (SC, RS, URU e ARG), apesar de alguns valores de Φ_{ST} terem se apresentado significantes, o elevado número estimado de migrantes por geração indica a ausência de uma forte estruturação dentro do grupo (Tabela 9).

Tabela 7 - Análise de Variância Molecular (AMOVA), realizada a partir dos dados de DNA mitocondrial considerando o índice de fixação Φ_{ST} para os diferentes cenários populacionais considerados neste estudo.

| AMOVA | Porcentagem de variação | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|
| | Dentro das Populações | Entre as Populações | Índice de Fixação |
| Cenário 1 - 4 FMAs | 82,24 | 17,76 | 0,177* |
| Cenário 2 - 7 Populações† | 80,74 | 19,26 | 0,192* |
| Cenário 3 – 3 Populações†† | 69,16 | 30,84 | 0,308* |

† 7 Populações: Rio de Janeiro, São paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina.

†† 3 Populações: Rio de Janeiro, Norte (São Paulo, Paraná e Norte de Santa Catarina) e Sul (Sul de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina).

* $p < 0,01$

Tabela 8 - Valores de Φ_{ST} (abaixo da diagonal) e de Nm (acima da diagonal) obtidos a partir da análise de DNA mitocondrial para o terceiro cenário populacional testado para *Pontoporia blainvillei*. (N= número amostral).

| População | RJ | NORTE | SUL |
|---|--------|--------|-------|
| Rio de Janeiro e Espírito Santo (RJ) | --- | 0,511 | 0,619 |
| São Paulo, Paraná e norte de Santa Catarina (Norte) | 0,338* | --- | 0,338 |
| Sul de Santa Catarina, Uruguai, Rio Grande do sul e Argentina (Sul) | 0,382* | 0,252* | --- |

* valores significantes para $p < 0,001$

Tabela 9 - Valores de Φ_{ST} (abaixo da diagonal) e de Nm (acima da diagonal) obtidos a partir da análise de DNA mitocondrial para o segundo cenário populacional. (N= número amostral).

| População | RJ (N= 32) | SP (N=35) | PR (N=14) | SC (N=17) | RS (N=70) | URU (N=45) | ARG (N=300) |
|------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| Rio de Janeiro (RJ) | --- | 0,794 | 0,848 | 1,067 | 0,761 | 0,642 | 0,766 |
| São Paulo (SP) | 0,386** | --- | 42,370 | 2,462 | 2,277 | 0,995 | 1,288 |
| Paraná (PR) | 0,370** | 0,011 | --- | 2,689 | 1,722 | 0,946 | 1,107 |
| Santa Catarina (SC) | 0,319** | 0,168** | 0,156* | --- | 11,226 | 10,219 | 8,927 |
| Rio Grande do Sul (RS) | 0,396** | 0,180** | 0,224** | 0,042 | --- | 6,443 | 9,449 |
| Uruguai (URU) | 0,437** | 0,334** | 0,345** | 0,046 | 0,072** | --- | 36,311 |
| Argentina (ARG) | 0,394** | 0,279** | 0,311** | 0,053* | 0,050** | 0,013 | --- |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Tabela 10 – Parâmetros demográficos inferidos para as três populações de *P. blainvillei* inferidas pela análise dos marcadores moleculares utilizados neste estudo (RJ, Norte e Sul). Estimativas obtidas pela análise de coalescência implementada no programa LAMARC. As taxas de migração estão expressas como número de migrantes. O intervalo de 95% de confiança encontra-se dentro dos parêntesis e o tamanho efetivo (Nm) na diagonal.

| | RJ/ES | Norte | Sul |
|-------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| RJ/ES | 16.615,38 (4923,1 – 56000) | 0,4716 (0,0088 – 5,0821) | 0,3675 (0,0072 – 2,0188) |
| Norte | 0,2382 (0,00001 – 3,6914) | 27.077 (10461,5 – 79384,6) | 1,1733 (0,1384 – 4,3731) |
| Sul | 0,0891 (0,00001 – 1,8673) | 0,5727 (0,0005 – 6,1813) | 244.308 (171.076,1– 370.461,5) |

Com relação a história demográfica de *P. blainvillei*, dois testes independentes de neutralidade foram realizados para dois cenários diferentes: 1) considerando a população como um todo, e 2) dividindo a amostra em três populações diferentes conforme os resultados obtidos para os locos de microsatélites. Para a população como um todo, enquanto que o índice de Tajima's D não detectou nenhuma evidência de expansão populacional ($D = -0,92495$; $p = 0,16800$), o índice F_s de F_u ($F_s = -24,39393$; $p = 0,0030$) e a análise de *Mismatch Distribution* detectaram um sinal de expansão da população como demonstra a Figura 8. Entretanto, quando analisados os dados para o cenário 3 (espécie separada conforme resultados dos locos de microsatélites, em 3 populações: RJ, Norte e Sul), obteve-se um valor negativo e significativo de F_s e um sinal de expansão na análise de *Mismatch Distribution* apenas para a população do Sul ($F_s = -20,5559$ ($p = 0,002$)) (Figura 8). A partir da análise bayesiana realizada no programa Beast foi possível estimar um tempo de divergência de todos os haplótipos atuais da espécie a partir de um único ancestral comum há cerca de 300 mil anos atrás (92.000- 1.950.000) (Figura 6). Segundo a análise de *Bayesian Skyline plot*, as populações do RJ e Norte da distribuição da espécie permaneceram com um tamanho populacional relativamente constante ao longo destes anos. A população do Sul por sua vez teria passado por um evento de expansão populacional mais acentuado a partir dos últimos 10.000 anos (Figura 9).

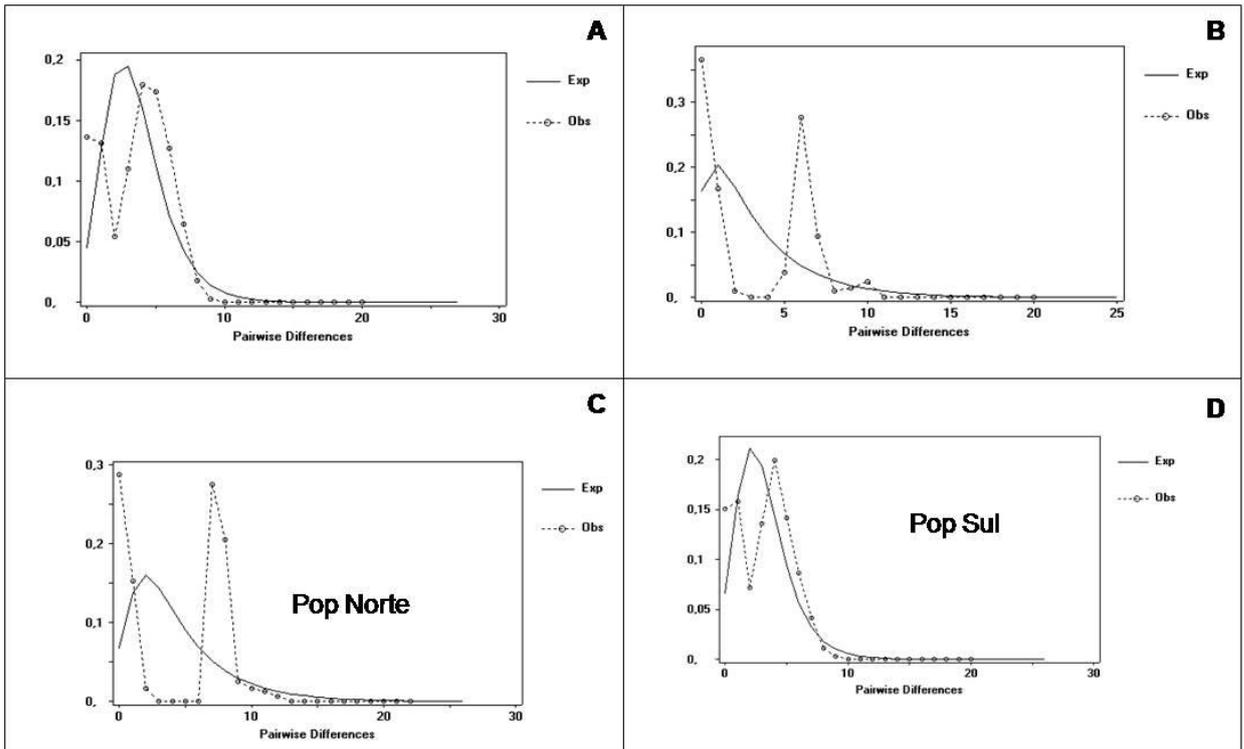


Figura 8 – Análise de *Mismatch Distribution* realizadas para A: Amostra total; B: População do Rio de Janeiro; C: População do Norte (SP, PR e Norte de Santa Catarina) da distribuição de *P. blainvillei*; D: População do Sul (Sul de Santa Catarina, RS, Uruguai e Argentina) da distribuição de *P. blainvillei*.

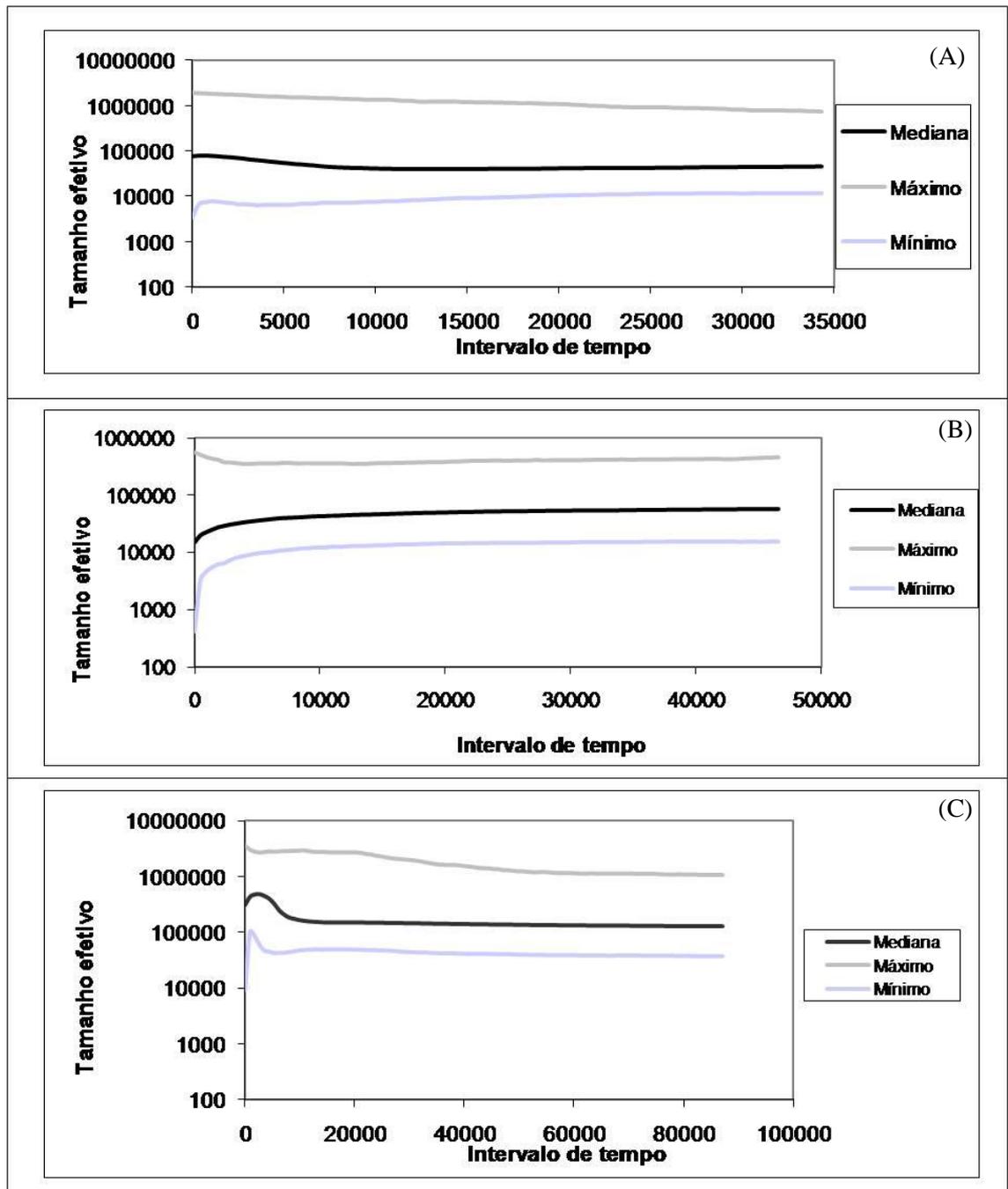


Figura 9 – Resultados das analyses Bayesianas de *Skyline Plot* para as três populações de *P. blainvillei* definidas, mostrando a flutuação do tamanho efetivo nestas ao longo do tempo. (A) RJ (B) Norte e (C) Sul.

5. Discussão

5.1. Diversidade genética

Os resultados deste estudo indicam que *P. blainvillei* é caracterizada por níveis de diversidade genética para o marcador mitocondrial que se assemelham àqueles encontrados em outros cetáceos. A diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) encontradas para a espécie ($h=0.895$, $\pi=1,12$) se assemelham bastante a de outras espécies de Odontocetáceos, como por exemplo o golfinho-do-porto (*Phocoena phocoena*) no Atlântico ($h=0.890$, $\pi=0.81$) e no Pacífico ($h=0.900$, $\pi=1.37$) e para o golfinho-comum-de-bico-longo (*Delphinus capensis*) no Pacífico tropical ($h=0.890$, $\pi=1,20$) (Rosel *et al.* 1995), mas é um pouco mais elevada do que a de outras espécies, p.e., como o golfinho-fliper (*Tursiops truncatus*) na Nova Zelândia ($h=0.79$, $\pi=1,6$) (Tezanos-Pinto *et al.* 2008) e o golfinho-nariz-de-garrafa do Índico (*Tursiops aduncus*) ($h=0,627$, $\pi=0,0039$) (Natoli *et al.* 2008). Já os valores de diversidade genética encontrados para os marcadores nucleares ($H_o=0,629$, $A=9$) se assemelham aos de outras espécies de cetáceos, porém estes não podem ser comparados diretamente quando os locos estudados não são os mesmos.

A variabilidade genética de *P. blainvillei* pode ser considerada razoável em todas as regiões e populações ao longo da distribuição da espécie. Os níveis mais altos de variabilidade genética foram encontrados na região ao sul (RS, URU e ARG) da ocorrência da espécie, enquanto que níveis bem mais baixos foram encontrados na região ao norte (RJ, SP e PR) (Tabela 5). No entanto as diferenças dos tamanhos amostrais podem ter interferido nesses resultados. Considerando-se a espécie dividida em 7 áreas conforme as divisões geo-políticas, a área que apresentou a mais baixa variabilidade genética foi o Rio de Janeiro. As análises de tamanho efetivo da população do Rio de Janeiro também corroboram este resultado, com valores relativos (tabelas 5 e 10) mais baixos que as outras. Porém, encontramos diferenças grandes nas estimativas de tamanhos populacionais absolutos baseados em microsatélites e DNAm, sendo as primeiras sempre muito menores que as segundas. Esta diferença pode, p.ex., ser vista para a estimativa do RJ, que foi de 24 indivíduos para os microsatélites e no mínimo 10.000 para mtDNA (Fig. 9). A população do RJ também apresentou valores significativos de F_{is} , que indicam a existência de endocruzamento, além das estimativas de fluxo gênico apontarem claramente para o isolamento desta população. Alguns

fatores que podem explicar estas diferenças na estimativa entre os marcadores são: imprecisão nas taxas evolutivas, em especial nos microssatélites e um possível fluxo gênico de fêmeas, mesmo pequeno, que aumentaria desproporcionalmente a diversidade do mtDNA em relação à bi-parental. Por outro lado, o resultado da análise de *Bayesian Skyline plot* indica estabilidade populacional nesta região.

5.2. Estruturação Populacional

As análises realizadas tanto com marcadores nucleares quanto com a mitocôndria, mostraram que a toninha possui uma forte estruturação ao longo de toda a sua distribuição. Essa estruturação, no entanto, é mais complexa do que alguns estudos anteriores sugeriam. De fato, Secchi *et al.* 2003 já haviam detectado que a separação da espécie em apenas duas formas geográficas como sugerido por Pinedo (1991) e Secchi *et al.* (1998) não era suficiente para explicar a estruturação da população. Por outro lado, nossos dados sugerem que as quatro áreas de manejo como sugeridas por Secchi *et al.* (2003) e inicialmente corroborada pelos estudos de mtDNA e microssatélites parciais, também não são geneticamente suportadas. Em vez disso, encontramos três áreas bem delimitadas. As principais diferenças em relação aos estudos anteriores são a junção das áreas III e IV e o deslocamento da fronteira entre as áreas II e III para a região central do estado de Santa Catarina. Apesar destes resultados, ainda não é possível determinar um local aproximado desta fronteira, já que permanece uma lacuna na amostragem deste estado. No presente estudo não foram obtidas amostras de regiões entre a localidade de Barra Velha (26°39'7.48"S e 48°41'29.41"O) e a localidade de Garopaba (28° 2'57.99"S e 48°36'42.21"O). No entanto, ficou claro haver uma estruturação mais refinada, que só foi possível detectar, devido a adição de amostras de SC e da análise de marcadores de mtDNA e microssatélite ao longo de toda a distribuição. Estes resultados confirmam o que já havia sido sugerido por Higa *et al.* 2002 através da análise de crânios de exemplares da espécie.

A maior divergência genética parece estar na população do Rio de Janeiro em relação às populações de SP e PR. Dados morfológicos anteriormente publicados já haviam demonstrado diferenças nas taxas de crescimento entre estas populações (Pinedo *et al.*, 2000; Rosas 2000). As áreas da parte sul da distribuição da toninha não apresentaram diferenças significativas entre si. Análises realizadas através do programa

STRUCTURE considerando somente estas áreas, mostraram realmente não haver diferenciação genética suficiente para separar esta grande região, no entanto, há uma certa diferença (embora pequena) entre os indivíduos do RS e do Uruguai e os da Argentina, que segundo Aznar *et al.* (1995), poderia estar refletindo uma possível separação ecológica da espécie. Analisando os conteúdos estomacais de indivíduos do RS e do URU juntamente com os dados da pesquisa de Aznar *et al.* (1995), Andrade e colaboradores em 2002, concluíram que a carga parasitária de indivíduos do Rio Grande do Sul e do Uruguai se assemelha bastante entre si mas difere significativamente dos indivíduos da Argentina, sugerindo haver uma diferenciação ecológica entre os indivíduos destas localidades provavelmente em decorrência de diferenças em suas dietas.

5.3. Conservação e Manejo

A estimativa por microssatélites do tamanho efetivo da população do Rio de Janeiro, em especial, chama a atenção por apresentarem um valor de ~26. Além desta análise, os valores de *F_{is}* confirmam este cenário de população pequena, endocruzada. Mesmo este valor significando tamanho efetivo e não de censo, e que podem representar estimativas históricas e não atuais, ainda assim são bastante reduzidos. Este resultado é bastante preocupante, pois pode significar uma vulnerabilidade dessa população maior do que atualmente considerada.

Apesar de não ter sido observada uma monofilia recíproca através da reconstrução filogenética dos haplótipos (Figura 6), as três populações principais determinadas neste estudo apresentaram diferenças significativas nas frequências alélicas em locus nucleares. Apesar disto, estas populações não estariam de acordo com os critérios estabelecidos por Moritz (1994) para a criação de Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs). Independente do critério utilizado para definição de Unidades de Manejo, este estudo deixa clara a necessidade de considerarmos estas três populações independentemente para fins de manejo. A situação mais crítica parece ocorrer na população do Rio de Janeiro por apresentar barreiras geográficas e ecológicas que impediriam uma recolonização no caso de uma possível extinção local.

6. Referências Bibliográficas

- Amos, W. & Hoelzel, A.R. 1991. Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. Report of the International Whaling Commission. Special Issue, 13: 99-103.
- Amos, B., Schlotterer, C. & Tautz, D. 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 30:670-672.
- Amos, W. & Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*, 87: 257-265.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York. 511p.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379. AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography – The History and Formation of Species*. Harvard University Press, London, England. 447p
- Aznar, F. J. , Raga, J .A., Corcuera, J. and Monzón, F. 1995. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mammalia* 59(3): 427-435.
- Bandelt H-J, Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
- Baker, C.S. & Palumbi, S.R. 1996. Population structure, molecular systematics, and forensic identification of whales and dolphins. 10-49p. In: Avise, J.C. & Hamrick, J.L (Eds.) *Conservation Genetics – Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York. 512p.
- Bastida, R., Rivero, L. & Rodríguez, D. 2000. Presencia inusual de elementos de origen antrópico em los contenidos estomacales de la franciscana (*Pontoporia blainvillei*). Documento de Trabalho DT26 apresentado no IV Workshop para a Coordenação da Pesquisa e Conservação da Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, no Atlântico Sul Ocidental. 05-09 Novembro, 2000. Porto Alegre, Brasil.
- Belkhir KP, Borsa P, Goudet P, Chikhi L, Bonhomme F. 1996–1998. GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la géne'tique des populations [Internet]. [cited 2007 March 10]. Montpellier (France): Laboratoire du Ge'nome et Populations, CNRS UPR 9060, Universite' de Montpellier II; Available from: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm>.
- Bertozzi, C. & Zerbini, A.N. 2002. Incidental mortality of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, Brazil. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals*, Special Issue on the biology and conservation of Franciscana, 1: 153-160.
- Bowen, B.W. & Avise, J.C. 1996. Conservation genetics of marine turtles. 190- 237p. In: Avise, J.C. & Hamrick, J.L (Eds.) *Conservation Genetics – Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York. 512p.

- Bruford, M.W. & Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion Genetics and Development*, 3: 939- 943.
- Buchanan, F.C., Friesen, M.K.; Littlejohn, R.P. & Clayton, J.W. 1996. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Molecular Ecology*, 5: 571-575.
- Carvalho, C.T. 1963. Sobre um boto comum no litoral do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 23(3): 263- 276.
- Cavalcanti, M.J. 2000. Mantel for Windows, Versão 1.11. Programa disponível gratuitamente na internet <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Crespo, E.A., Harris, G. & González, R. 1998. Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Marine Mammal Science*, 14: 845-849.
- Castello, H.P. & Gianuca, N.M. 1976. Echoauge de faux-orques, *Pseudorca crassidens*, sur les cotes d'état de Rio Grande do Sul, Bresil. *Mammalia*, 40(4): 682-684.
- Cornuet, J.M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A. & Solignac, M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153(4):1989-2000.
- Danilewicz D.S. 2000 *Biologia Reprodutiva e padrões de uso de habitat da toninha, Pontoporia blainvillei* (Mammalia, Cetacea) no litoral do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Tese de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 92p.
- Di Benedetto, A.P.M., Ramos, R.M.A. & Lima, N.R.W. (1998). Fishing activity in northern Rio de Janeiro State (Brazil) and its relation with small cetaceans. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41(3): 296-302.
- Di Benedetto, A.P.M. & Ramos, R.M.A. 2001. *Biologia e conservação de pequenos cetáceos no norte do estado do Rio de Janeiro. Ciências Ambientais: UENF, Campos dos Goytacazes. 152p.*
- Dimmick, W.W.; Ghedotti, M.J.; Grose, M.J.; Maglia, A.M.; Meinhardt, D.J. & Pennock, D.S., 2001. The evolutionary significant unit and adaptive criteria: a response to Young. *Conservation Biology*, 15 (3): 788-790.
- Dizon, A.E. , Lockyer, C., Perrin, W.F., Demaster, D.P., & Seisson, J. 1992. Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. *Conservation Biology*, 6:24-36
- Ellis, M. 1969. *A Baleia no Brasil Colonial. Edições Melhoramentos, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 235p.*
- Eizirik, E. 1996. *Ecologia Molecular, genetic da Conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. Brazilian Journal of Genetics*, 19: suppl: 23-29
- Excoffier 2005. Arlequin (Version 3.0): An integrated software package for population genetic data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1:47-50

- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer 2010 Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8: 175-185.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567- 1587
- Felsenstein, J. 1995. PHYLIP, Phylogenetic Inference Package. Version 3.5. Department of Genetics, Washington University. Seattle. Programa distribuído pelo autor.
- Gianuca, N.M. & Castello, H.P. 1976. First record of the Southern bottlenose whale, *Hyperoodon planifrons* from Brazil. *Scientific Report of Whales Research Institute*, 28:119-126.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. & Feldman, M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463- 471.
- Goudet J 2002 Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3). Available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grativol, A.D.; Ballou, J.D. & Fleischer, R.C. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). *Conservation Genetics*, 2: 1-9.
- Guo, S. & Thompson, E. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Haig, S.M. & Avise, J.C. 1996. Avian conservation genetics. 160-189p. In: Avise, J.C. & Hsmrick, J.L (Eds.) *Conservation Genetics – Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York 512p.
- Harlin, A.D., Markowitz, T., Baker, C.S., Wursig, B., Honeycutt, R.L., 2003. Genetic structure, diversity, and historical demography of the New Zealand's dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*). *Journal of Mammalogy* 84, 702–717.
- Hedrick, P.W. 2005. *Genetics of Populations*, 3rd ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Hershkovitz, P. 1963. Notes on the South American dolphins of the genero *Inia*, *Sotalia* and *Tursiops*. *Journal of Mammalogy*, 44: 98-103.
- Hoelzel, A.R., Hancock, J.M., Dover, G.A., 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution* 8, 475–493.
- Higa, A., Hingst-Zaher, E. & de Vivo, M. 2002. Size and shape variability in the skull of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) from the brazillian coast. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals, Special Issue on the biology and conservation of Franciscana*, 1:145-152

- Huelsenbeck, J.P. & Andolfatto, P. 2007. Inference of population structure under a Dirichlet process model. *Genetics*. 175: 1787-1802
- Kashi, Y., King, D. & Soller, M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, 13(2): 74-77.
- King, T.L. & Burk, T. Special issue on gene conservation: Identification and management of genetic diversity. *Molecular Ecology*. 8: S1-S3
- Keller, L.F. & Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(5): 230-241.
- Kuhner, M.K., P. Beerli, J. Yamato, J. Felsenstein. 2006. LAMARC version 2.0.2. University of Washington, Seattle WA. Disponível em: <http://www.evolution.gs.washington.edu/lamarc>.
- Lacy, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78 (2):320-335.
- Langella, O. 2000. Populations, Versão 1.2.28. Programa disponível gratuitamente na internet <http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations/>.
- Lázaro, M. (2001). Estructura genética poblacional de la franciscana (*Pontoporiablainvillei*). Tesis de Maestría. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.93p.
- Mendez, M., Rosenbatan, H. C. & Bordino, P. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts and management implications. *Conservation Genetics*. 9:419-435.
- Mendez, M., Rosenbatan, H. C., Subramanian, A., Yackulic, C. & Bordino, P. Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. *Molecular Ecology*. 11:2212-2228
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. 1996. A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics*, 142:1061-1064.
- Moreno, I.B., Ott, P.H., & Danilewicz, D.S. 1997. Análise preliminar do impacto da pesca artesanal costeira sobre *Pontoporia blainvillei* no litoral norte do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. p. 31-41. In: Pinedo, M.C., Barreto, A.S. (ed) Anais do 2º Encontro sobre Coordenação de Pesquisa e Manejo da Franciscana, Ed. da FURG, Rio Grande. 77p.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Tree* 9 (10): 373-5.
- Murray, B.W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent>. [Capturado]. 2 Novembro 2000.
- Nader, W., Werner, D. & Wink, M. 1998. Genetic diversity of scarlet macaws *Aramacoo* in reintroduction studies for threatened populations in Costa Rica. *Biological Conservation*, 87: 269-272.

- Natoli, A., Peddemors, V.M. & Hoelzel, A.R. 2008. Population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) impacted by by-catch along the east coast of South Africa. *Conservation Genetics*. 9:627-636
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283- 291.
- Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R. & Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2): 294-307.
- Oosterhout, C. V., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills & P. 2004. Shipley. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538
- Page, R.D.M. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Paetkau, D., Waits, L. P., Clarkson, P. L., Craighead, L. & Strobeck, C. 1997. An evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*, 147: 1943-1957.
- Paiva, M.P. & Grangeiro, B.F. 1965. Biological investigations on the whaling seasons 1960-1963 of the northeastern coast of Brazil. *Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará* , 5 (1):29-64.
- Palsboll, P.J., Berube, M., Larsen, A.H. & Jorgensen, H. 1997. Primers for the amplification of tri and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Molecular Ecology*, 6: 893-895.
- Pinedo, M.C. 1991. Development and variation of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Ph D. Thesis. University of California, Santa Cruz.406p.
- Pinedo, M.C. & Hohn, A.A. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: Developing a model for precision in age estimation. *Marine Mammal Science*. 16:1-27
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945-959
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test ecumenism. *Journal Heredity*, 86: 248-249.
- Rice, D.W. 1998. Marine mammals of the world: Systematics and Distribution. Special Publication No.4. The society for marine Mammology, Allen Press, Lawrence, Kansas. 231p.
- Robertson, A. & Hill W.G. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions : sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 713-718.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. 1992. Population-Growth makes waves in the distribution of pairwise genetic-differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9:552-569

- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.
- Rosel, P.E., Dizon, A.E. & Haygood, M.G., 1995. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales. *Can J Fish Aquat Sci* 52:1210–1219
- Rosel, P.E., France, S.C., Wang, J.Y. & Kocher, T.D., 1999. Genetic structure of harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, populations in the Northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Mol Ecol* 8:S41–S54
- Rosas, F.C.W. 2000. Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Delphinidae e Pontoporiidae) no litoral sul do Estado de São Paulo e litoral do Estado do Paraná, Brasil. PhD Thesis. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 145p
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C. & Messeguer, X. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19:2496–2497. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, M. C. de O., Vicente, A., Zampiroli, E., Alvarenga, F.S. & Souza, S.P. 2002. Records of Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from the coastal waters of São Paulo State and the coast of Paraná State, Brazil. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals, Special Issue on the biology and conservation of Franciscana*.1: 169- 174p.
- Schlötterer, C. 1998. Microsatellites. p: 237-261 In: Hoelzel (ed.), *A molecular genetics analysis of populations: a practical Approach*. 2nd New York: Oxford University Press Inc.
- Schneider, S., Kueffer, J.M., Roesli, D. & Excoffier, L. 2005. Arlequin ver. 3.11: A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Secchi, E.R., Zerbini, A.N., Bassoi, M., Dalla Rosa, L., Moller, L.M. & Rocha-Campos, C.C. (1997). Mortality of franciscanas, *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillnetting in southern Brazil. *Report of the International Whaling Commission*, 47: 653-658.
- Secchi, E.R., Ott, P.H., Crespo, E.A., Kinas, P.G., Pedraza, S.N. & Bordino, P. (2001). A first estimate of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) abundance off southern Brazil. *Journal of Cetacean Research and Management*, 3: 95-100.
- Secchi, E.R., Danilewicz, D. & Ott, P. 2003. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implications to meet management objectives. *J. Cetacean Res. Mngt.*, v. 5, n. 1, p. 61-68,
- Slatkin, M. 1995. A mesure of population subdivision based on microsatellites frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.

- Shaw, C., Wilson, P. & White, B.N. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy*, 84(1): 123-128.
- Siciliano, S., Moreno, I.B., Silva, E.D., & Alves, V.C. 2006. Baleias, botos e golfinhos na Bacia de Campos. Rio de Janeiro: ENSP/FIOCRUZ. 100 p. il. UNEP/CMS. 2000. Report of the Third Workshop for Coordinated Reserach and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Soutwestern Atlantic. Bonn: UNEP/CMS.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximumlikelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution*, 13(7): 964-969.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. Taylor, B.L. & Dizon, A.E. 1999. First policy then science: why management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*, 8, Suppl.: S11-S16.
- Tezanos-Pinto, G., Baker, C.S., Russel, K., Martien, K., Baird, R.W., Hutt, A., Stone, G., Mignucci-Giannoni, A.A., Caballero, S., Endo, T., Lavery, S., Oremus, M., Olavarría, C. & Garrigue, C. 2008. A Worldwide Perspective on the Population Structure and Genetic Diversity of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in New Zealand. *Journal of Heredity*. 100(1):11–24
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*;25:4876-4882
- Valsecchi, E. & Amos, W. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*, 5: 151-156.
- Wallin, J.M., Cydne, L.H., Lazaruk, K.D., Nguyen, T.H. & Walsh, P.S. 2001. Constructing Universal Multiplex PCR Systems for Comparative Genotyping. *Journal Forensic Science*, 47(1):52-65.
- Waples, R.S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 7, 167–184.
- Waples, R.S., Do, C. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on 60 linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8, 753–756.
- Waser, P.M. & Strobeck, C. 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution*: 43-44.
- Weir, B. & Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.

- Whitaker, J.C., Harbord, R.M., Boxall, N., Mackay I, Dawson, G., Sibly, R.M., 2003. Likelihood-Based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* 164: 781–787.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323- 354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*. London; the university of Chicago Press.
- Zanelatto, R. C. 1997. Captura acidental de toninha, *Pontoporia blainvillei*, (Gervais & D’Orbigni, 1844) (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral do estado do Paraná, Brasil. p.22-29 In: Pinedo, M.C., Barreto, A.S. (ed) *Anais do 2º Encontro sobre Coordenação de Pesquisa e Manejo da Franciscana*, Ed. da FURG, Rio Grande. 77p.
- Zerbini, A.N. Santos, M.C. de O. 1997. First record of the pygmy killer whale, *Feresa attenuata*, Gray, 1874, in Brazil. *Aquatic Mammals* 23(1):105-111.
- Zerbini, A.N. 1999