

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E  
RECURSOS NATURAIS – PPGBTRN

Waleska Gravena

Isolamento e Caracterização de Marcadores  
Microssatélites para análise de Parentesco no  
Boto-vermelho (*Inia geoffrensis*)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas com área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, 2007

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E  
RECURSOS NATURAIS – PPGBTRN

Waleska Gravena

Isolamento e Caracterização de Marcadores  
Microssatélites para análise de Parentesco no  
Boto-vermelho (*Inia geoffrensis*)

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Izeni Pires Farias  
Co-Orientadora: Dr<sup>ª</sup> Vera M. F. da Silva

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas com área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, 2007

Izeni Pires Farias

Orientadora

Vera Maria Ferreira da Silva

Co-orientadora

G775

Gravena, Waleska

Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para análise de parentesco no boto-vermelho (*Inia geoffrensis*).--- Manaus : [s.n.], 2007. xvii, 60 p.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2007

Orientador : Farias, Izeni Pires

Co-Orientador : Silva, Vera Maria Ferreira da

Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Boto-vermelho. 2. Marcadores microssatélites. 3. Parentesco.  
I. Título.

CDD 19. ed. 599.53

## SINOPSE

Foi realizado isolamento de marcadores microssatélites específicos para o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) e caracterizados marcadores desenvolvidos para outras espécies de Cetáceos. Foram analisados dados de relação de parentesco de duas agregações do boto-vermelho do baixo Rio Negro – AM, que se mostraram não relacionadas.

Palavras-chave: Boto-vermelho, marcadores microssatélites, parentesco.

*Aos meus pais que são minha estrela guia.  
Se não fosse por eles, esse trabalho não teria o mesmo valor.  
E eu não seria a pessoa que sou hoje.*

*“Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, que mesmo longe me deram todo o apoio do mundo, nas horas mais difíceis me dando conselhos e me mantendo calma (o que é muito difícil...). Amo vocês!

À minha “erma”, que também estava longe, mas pelo messenger ou por telefone conseguia me alegrar nas horas difíceis. E inclusive me atrapalhava durante as análises, mas por bons motivos!

À minha super orientadora, Dr<sup>a</sup> Izeni Pires Farias (Cris), que me ajudou, me apoiou, e cuidou de mim como mãe! Apesar de todas as dificuldades desse trabalho sempre estive ao meu lado, sempre encontrando ânimo e alegria a cada nova descoberta. Deu todo o valor possível a esse trabalho e não me deixou desistir. Muito obrigada mesmo!

Ao Dr Tomas Hrbek, que me deu todo o apoio durante todo o trabalho. Me ajudou a decifrar erros e novas descobertas na parte prática e estatística.

E à Dr<sup>a</sup> Vera pela colaboração, co-orientação, e por me permitir realizar este trabalho. Muito obrigada!

Ao meu amor e ao meu amigo, Daniel Dutra, que mais do que ninguém me ajudou a ser o que sou agora. Me deu apoio, escutou cada “stress”, me aconselhou e sofreu comigo, me ajudou a desenvolver várias partes desse projeto, tanto teórico quanto prático e me alegrou muito durante essa difícil caminhada. Ele merece todos os agradecimentos que eu poderia dar. Te amo!

Aos meus amigos, Claudia, Carlos, Leandra e Igor que também me ajudaram durante as piores fases, se preocuparam comigo, mataram um pouco da saudade do Paraná, e que hoje já entendem muito sobre o boto.

Ao Pedro e a Lulú!!!! Que mesmo não morando mais comigo ainda são considerados minha “família” aqui!

Aos meus colegas do LEGAL, que dividiram comigo tudo que aprenderam. Em especial ao Ed, e ao Mário, que além de dividirem comigo, também me deixaram ensinar muitas coisas, e me alegraram demais! Mais especial ainda à Manu que me ensinou tanta coisa que se eu fosse descrever seriam folhas e folhas dessa dissertação!!! Vou sentir sua falta amiguinha!!!

Aos colegas do LMA (e agregados) que me ajudaram muito no início. Em especial ao Dr Fernando Rosas, Anselmo, Gália, Yara, Carla Barezani, Dani boto, Nildon e Bernadete Fragoso (pelas coletas!). E mais especial ainda, ao André e a Dani tucuxi (Fettuccia), pela grande amizade e ajuda.

Aos colegas de turma do GCBEV.

A Dina, ao Jonso e ao Dani Dutra que me ensinaram tudo sobre clonagem, e à Jaque (Fofa) e a Kiara que me ajudaram muito com as seqüências e genotipagens!

À “Fundação Hrbek-Farias” pelo grande financiamento nas técnicas de laboratório. Aos “PAIS-trocínio” quando necessário.

À Prof Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Dias por me iniciar na pesquisa e sempre acreditar em mim!

Ao Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA em Convênio com a UFAM, representado pelo curso de Genética,



Conservação e Biologia Evolutiva, por todos os meus ganhos, tanto intelectualmente como financeiramente.

À Universidade Federal do Amazonas, pelo apoio logístico através do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL).

À FAPEAM pelo financiamento das bolsas de estudo.

Ao Laboratório de Tecnologia do DNA (Bloco G) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular pela grande ajuda e por nos permitir realizar parte do trabalho.

À Dona Marilda, Marisa e Munick, que me ajudaram durante as coletas, e me ensinaram a reconhecer cada um dos animais. Ao Ariaú Amazon Towers, representado por Alejandro Salinas que possibilitou as coletas, e a família do flutuante que nos ajudou a reconhecer os animais e nos tratou muito bem!

À Juliana Marigo, pela sua simpatia, e ao Projeto Biopesca, que gentilmente cederam as amostras de franciscana usadas neste trabalho.

E por último, mas não menos importante, aos botos, que me permitiram “arrancar” um pedacinho deles, e ainda voltavam para buscar o peixe que eu esquecia de dar!!!

**Muito obrigada!!!!**

## RESUMO

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos: no capítulo I foi realizado tanto o isolamento e caracterização de marcadores microsatélites específicos para o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*), como caracterização de marcadores desenvolvidos para outras espécies de cetáceos. Estes marcadores também foram caracterizados para a franciscana (*Pontoporia blainvillei*) e para o boto-cinza (*Sotalia guianensis*). No capítulo II foram feitas análises para determinação de relacionamentos dentro e entre duas agregações de boto-vermelho do baixo Rio Negro – AM. Foi possível observar que todas as agregações dos botos de Novo Airão e do Furo do Ariaú são formadas exclusivamente de machos. Este resultado pode ser explicado pela preferência por diferentes habitats, sendo que os botos machos são encontrados principalmente nas calhas dos grandes rios, enquanto que as fêmeas são mais isoladas e preferem a várzea e a floresta alagada. Também foi possível observar que dentro de cada uma das agregações, em Novo Airão e no Furo do Ariaú, o nível de parentesco entre os botos apresenta-se muito baixo, significando que os animais formam este tipo de agregação exclusivamente para alimentação artificial. Esse tipo de estudo fornece informações que não podem apenas ser observadas no campo, e são importantes para que se possa entender a biologia das populações analisadas.

## ABSTRACT

The present work was divided into two chapters. Chapter I presents the isolation and characterization of microsatellite markers specifically developed for the Amazon River dolphin (*Inia geoffrensis*), as well as the characterization of these markers for other cetacean species. These markers were characterized in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) and the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*). Chapter II presents an analysis of relatedness within and between two aggregations of the Amazon River dolphin from the lower Rio Negro – AM. It was observed that the aggregations at Novo Airão and Furo do Ariaú were comprised exclusively of male dolphins. This result could be explained by the differential habitat preference since males are principally found in the main streams of large rivers while females are more isolated and prefer *várzea* and flooded forests. It was also observed that the level of relatedness observed in the Novo Airão and Furo do Ariaú groups was very low, which means that these aggregations are the formed exclusively for hand-feeding. This study provides information which could not be obtained from field observations only, and is important for the understanding of the biology of the analyzed populations.

## SUMÁRIO

<b>FICHA CATALOGRÁFICA.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<i>Inia geoffrensis</i> .....	1
Estudos genéticos realizados na Família Iniidae.....	3
Marcadores (ou locos) microssatélites.....	6
Microssatélites em Cetáceos.....	7
Marcadores para Determinação de sexo.....	10
<b>CAPÍTULO I - Isolamento e Caracterização de Marcadores microssatélites para o boto-vermelho <i>Inia geoffrensis</i>.....</b>	<b>11</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	11
1.2 MATERIAL E METODOS.....	13
1.2.1 <i>Obtenção das amostras e preparo do material</i> .....	13
1.2.2 <i>Extração de DNA</i> .....	13
1.2.3 <i>Isolamento de regiões de microssatélites</i> .....	14
1.2.4 <i>Hibridização dos microssatélites</i> .....	15
1.2.5 <i>Ligação dos fragmentos selecionados ao plasmídeo vetor e clonagem</i> ....	16

1.2.6 Sequenciamento dos clones.....	17
1.2.7 Caracterização dos locos microssatélites.....	19
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
<b>CAPÍTULO II - Níveis de parentesco em duas agregações do boto-vermelho (<i>Inia geoffrensis</i>) do baixo Rio Negro, Amazonas – AM.....</b>	<b>27</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.2.1 Área de Estudo.....	30
2.2.2 Obtenção das amostras e preparo do material.....	31
2.2.3 Extração de DNA.....	32
2.2.4 Amplificação do DNA.....	32
2.2.5 Determinação de sexo.....	33
2.2.6 Análises genéticas.....	33
2.3 RESULTADOS.....	38
2.3.1 Determinação do sexo dos indivíduos.....	38
2.3.2 Variabilidade Genética.....	39
2.3.3 Parentesco.....	42
2.4 DISCUSSÃO.....	46
2.4.1 Diversidade Genética.....	46
2.4.2 Relacionamento.....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Caracterização dos locos microssatélites tanto desenvolvidos para o boto-vermelho (*I. geoffrensis*), como os desenvolvidos para outras espécies de cetáceos e testados no boto-vermelho: tipo de repetição, temperatura de anelamento, tamanho dos *loci*, número de indivíduos analisados (n), número de alelos (A) e Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), Índice de exclusão de parentesco (Q) e Índice de identidade genética (I).....20

**Tabela 2** – Comparação da variabilidade genética de marcadores microssatélites desenvolvidos para outras espécies de cetáceos e testados no boto-vermelho (*Inia geoffrensis*): número de indivíduos analisados (n), número de alelos (A) e Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para cada primer. ....24

**Tabela 3** – Teste de transferibilidade realizado com os *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Inia geoffrensis*.....26

**Tabela 4** – Fórmulas utilizadas para o cálculo da verossimilhança entre os pares de indivíduos analisados, onde X e Y são os indivíduos testados que podem ter alelos de origem materna (Xm e Ym) ou paterna (Xp e Yp), os valores de Pxm, Pym, Pxp e Pyp são as freqüências alélicas da população, e R indica a hipótese de relacionamento onde o compartilhamento de alelos pode ser proveniente tanto da linhagem materna (Rm) quanto

paterna (Rp).....36

**Tabela 5** – Número de alelos, Heterozigosidade Observada (Ho), Heterozigosidade Esperada (He) e valores de P estimados para os botos-vermelho do Ariaú e de Novo Airão separadamente e para as duas agregações juntas.....41

**Tabela 6** – Valores de R estimados para cada par de indivíduos dentro e entre as agregações, sendo que os indivíduos em azul são pertencentes a Novo Airão, os indivíduos em rosa são pertencentes ao Ariaú, e os valores em azul claro pertencem a indivíduos considerados irmãos verdadeiros, os valores verdes são indivíduos considerados meio irmãos, e os valores em lilás são indivíduos considerados primos.....44

**Tabela 7** – Matriz de relacionamento gerado pelo programa ML-RELATE, mostrando a relação de parentesco entre os pares de indivíduos, sendo que para alguns a segunda hipótese não pode ser descartada. Observa-se que U (Unrelated) são indivíduos não relacionados, HS (Half-Sibs) indivíduos meio-irmãos, FS (Full-Sibs) irmãos verdadeiros e PO (Parent/Offspring) pais e filhotes, entre os indivíduos de Novo Airão, em azul, e Ariaú em vermelho.....45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Eletroferograma mostrando polimorfismo para um dos *loci* desenvolvidos para *Tursiops truncatus*, (Ttr11) e utilizados para *Inia geoffrensis*, utilizando o programa *Fragment Profiler*.....23
- Figura 2** – Coleta de tecido do boto no Furo do Ariaú (Foto: Izeni P. Farias).....30
- Figura 3** – Dedal de costura modificado para coleta (a) e material coletado (b) (Foto: Waleska Gravena).....31
- Figura 4** – Coleta de tecido do boto em Novo Airão com a ajuda do dedal modificado (Foto: Vera M. F. Da Silva).....31
- Figura 5** – Foto do gel de determinação do sexo dos indivíduos de Novo Airão (Curumin, Fefa, Doidinha, Vi, Eidi, Dani, Rafinha, Cauã, Lawrence e Ricardo), de uma fêmea padrão e dos indivíduos do Ariaú (Julia, Panqueca, Rosa, Curió, Sonso, Stress, e Sem nome), realizados com marcadores moleculares de genes dos cromossomos X e Y.....39
- Figura 6** – Gráfico das frequências dos valores de relacionamento (R) dentro das agregações de Novo Airão e do Ariaú separadamente, e entre estas agregações.....43



## INTRODUÇÃO

### *Inia geoffrensis*

O boto da Amazônia (*Inia geoffrensis*), comumente chamado de boto-vermelho, boto-rosa ou simplesmente boto, pertence à ordem Cetacea, subordem Odontoceti, superfamília Platanistoidea, família Iniidae, gênero *Inia*. Ainda existem controvérsias com relação à sistemática do boto-vermelho. A classificação mais utilizada para o gênero *Inia* separou-o, por análises morfológicas, em três subespécies: *Inia geoffrensis geoffrensis*, *Inia geoffrensis boliviensis* e *Inia geoffrensis humboldtiana* (Best & da Silva, 1989; Rice, 1998). No entanto, alguns autores, de acordo com análises morfológicas e moleculares, o dividem em duas espécies: *Inia boliviensis* e *Inia geoffrensis*, sendo que esta última ainda está dividida em duas subespécies: *Inia geoffrensis geoffrensis* e *Inia geoffrensis humboldtiana* (Pilleri & Gehr, 1977; da Silva, 1994; Hamilton *et al.*, 2001), sendo esta a classificação utilizada no presente trabalho.

O boto-vermelho está amplamente distribuído nos rios da bacia Amazônica e Orinoco. Tem como principais limites para sua distribuição as grandes corredeiras, cachoeiras e rios muito pequenos (Best & da Silva, 1993). De acordo com a classificação adotada neste trabalho, as espécies possuem distribuições distintas: *Inia boliviensis* é encontrada no Alto rio Madeira e nos rios Ichilo, Mamoré, Iboré, Baré, e Guaporé (Pilleri & Gehr, 1977); *Inia geoffrensis humboldtiana* é encontrada na bacia do rio Orinoco (Pilleri & Gehr, 1977); e *Inia geoffrensis geoffrensis* é encontrada nos rios do sistema Amazônico, ocorrendo desde o delta, perto de Belém, até os principais afluentes dos Rios Solimões, Tocantins, Branco e Negro. *I. g. geoffrensis* também pode ocorrer no rio Tapajós, abaixo

das corredeiras de São Luís do Tapajós e abaixo da cachoeira do Teotônio no rio Madeira (Best & da Silva, 1993).

Durante a estação seca, os botos podem estar restritos aos lagos grandes e profundos e principais canais de rios. Quando os rios aumentam o nível de água, os botos podem vistos nadando entre as árvores em áreas alagadas (Best & da Silva, 1993).

O boto-vermelho é geralmente solitário, sendo raramente visto em grupos de mais de quatro indivíduos. Grupos maiores ou agregações são formados principalmente em áreas de alimentação, descanso, ou em épocas que envolvem a corte e o acasalamento. A maioria dos grupos de dois indivíduos observados corresponde a, mãe e filhote (da Silva, 2002).

Os botos machos e fêmeas apresentam maturidade sexual em diferentes idades. Os machos atingem a maturidade sexual quando o peso dos testículos excede a 0,4% do peso corporal, e o comprimento do corpo acima de 198 cm (Best & da Silva, 1989). Já a fêmea apresenta maturidade sexual quando o comprimento do corpo atinge aproximadamente 180 cm (Best & da Silva, 1989), e pela presença da *corpora lutea* e corpo *albicans* nos ovários (Harrison *et al.*, 1972). A gestação desta espécie é estimada entre 10 e 12 meses, e o filhote nasce com aproximadamente 79 cm de comprimento (Best & da Silva, 1989).

A coloração da pele do boto é bastante variável e está principalmente relacionado com a idade (Martin & da Silva, 2006), transparência e da temperatura da água (Best & da Silva, 1989). Animais jovens são cinza mais escuros e à medida que estes animais se tornam mais velhos, ocorre a perda da pigmentação e a cor rosa (sem pigmentação) fica mais aparente (Martin & da Silva, 2006). Pode-se afirmar que botos que vivem em águas brancas tendem a ficar predominantemente rosa quando adultos, enquanto que animais que

vivem em águas escuras são predominantemente cinza, com a região ventral e abaixo das nadadeiras mais rosadas (Best & da Silva, 1989).

Geralmente o boto-vermelho é protegido pelo homem ribeirinho pelas várias lendas que o associam a poderes sobrenaturais, e conseqüentemente não é diretamente caçado. O que acontece mais freqüentemente é a captura acidental em redes de pesca, ou a morte por arpão, quando “atrapalham” a pescaria. Depois de mortos alguns pescadores retiram os olhos e a genitália para serem vendidos como um “amuleto do amor” (da Silva, 1990). Sabe-se que mais recentemente, os pescadores estão matando o boto para o uso como isca na pesca da piracatinga (*Callophysus macropterus*), um peixe muito apreciado na Colômbia (da Silva, comunicação pessoal). No entanto, o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) está listado como espécie “Vulnerável” no Apêndice II da *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), e se tornou protegido no Brasil quando foi instituída a Portaria nº N-011 de 21 de Fevereiro de 1986, que protege todos os pequenos cetáceos, pinípedes e sirênios das águas nacionais contra perseguição, caça ou captura (IBAMA). Encontra-se listado como espécie VULNERAVEL no Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA, 2001).

### **Estudos genéticos realizados na Família Iniidae**

As relações taxonômicas dos chamados “golfinhos de rio” têm sido questionadas há mais de um século. Estes golfinhos estão separados em quatro gêneros, que em sua maioria são monoespecíficos: *Platanista gangetica* (susu) que ocorre na Bacia do rio Ganges, *Lipotes vexillifer* (baiji) que ocorria na Bacia do Rio Yangtze e está tecnicamente extinto desde novembro de 2006 (Guo, 2006), *Pontoporia blainvillei* (franciscana) única espécie de

“golfinho de rio” que ocorre no mar, e possui distribuição na costa Atlântica do sul da América do Sul, desde Itaúnas, no estado do Espírito Santo até o Golfo San Matias na Argentina (Secchi *et al.*, 2002) e o gênero *Inia* que foi separado em duas espécies: *Inia geoffrensis* que ocorre nos rios da Bacia Amazônica e *Inia boliviensis* que ocorre na bacia do rio Orinoco (da Silva, 1994). Cada um desses gêneros é agrupado em diferentes famílias, Platanistidae, Lipotidae, Pontoporiidae e Iniidae, respectivamente (Rice, 1998). Mas de acordo com algumas similaridades encontradas dentro do grupo, tais como, morfologia e habitat, alguns autores convenientemente classificam todas as espécies de golfinhos de rio na Superfamília Platanistoidea, o que tem sido questionado em alguns trabalhos de filogenia (Nikaido *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2001). Milinkovitch *et al.* (1994) afirmam que a ordem Cetacea e cada uma de suas famílias e superfamílias são monofiléticas, sugerindo que o boto da Amazônia (*Inia geoffrensis*) é espécie irmã da superfamília Delphinoidea, que inclui os golfinhos da família Phocoenidae, a beluga e os golfinhos nariz-de-garrafa, por exemplo. Por outro lado, Cassens *et al.* (2000) utilizaram seqüências de DNA mitocondrial e nuclear, e como resultado, indicaram que estes golfinhos não são monofiléticos e sim polifiléticos. Ou seja, os botos da América do Sul (boto-vermelho e franciscana), formam um grupo considerado irmão da Superfamília Delphinoidea, e o baiji (golfinho do rio Yang-Tsé na China) é a espécie irmã deste clado, sendo o susu (golfinho do Rio Ganges) a espécie mais basal dos golfinhos de rio. Este resultado também sugere que o boto-vermelho e a franciscana são mais relacionados geneticamente do que os outros golfinhos de rio. Já os Platanistidae (que incluem os golfinhos das bacias dos rios Ganges e Brahmaputra) foram considerados grupo irmão dos outros odontocetos utilizados no trabalho (Ziphiidae e Physeteridae). Tais resultados

também foram confirmados por Hamilton *et al.* (2001), que ainda sugeriram uma distinção entre as formas de *Inia* da Bolívia e da Amazônia.

Em um estudo mais recente (May-Collado & Agnarsson, 2006), foram utilizadas seqüências de citocromo b de 66 cetáceos, representando 63 espécies, retiradas do GenBank, para tentar resolver os vários conflitos existentes na filogenia de várias espécies de cetáceos, incluindo os golfinhos de rio. Estes resultados concordaram com a maioria dos estudos tanto moleculares quanto morfológicos, mostrando que os golfinhos de rio são polifiléticos, e como sugerido em outros trabalhos, os golfinhos da família Platanistidae não se agrupam com os outros golfinhos de rio, e são mostrados como a família mais basal da infraordem Delphinida, como já havia sido sugerido por Cassens *et al.* (2000) e Hamilton *et al.* (2001). Este estudo (May-Collado & Agnarsson, 2006) também concorda com a classificação de três famílias proposta anteriormente, sugerindo que Pontoporiidae e Iniidae são mais relacionados e que Lipotidae forma seu grupo irmão.

Com relação a trabalhos filogeográfico e populacional em botos de água-doce da América do Sul, pouco têm sido feito. Banguera-Hinestroza *et al.* (2002) utilizando-se do seqüenciamento de dois genes mitocondriais, observaram uma distinção no genoma mitocondrial dos botos das Bacias dos Rios Beni e Mamoré na Bolívia e da Amazônia central. Foram analisadas amostras de tecido de botos de várias regiões das bacias do rio Orinoco e do Amazonas, coletadas no Brasil, na Colômbia, na Bolívia e na Venezuela, a fim de determinar uma variação genética para as três subespécies sugeridas. A análise da região controle mitocondrial mostrou que não existem haplótipos compartilhados entre os botos das bacias Amazônica e da Bolívia, e também que existe um considerável nível de diversidade genética entre as populações. De acordo com estes resultados, os autores propõem vários eventos de isolamento geográficos que acabaram gerando esta diversidade

de haplótipos, sendo possível observar que as populações de *Inia* estão claramente separadas em duas unidades evolutivas consideradas como *Inia geoffrensis* e, *Inia boliviensis* (Banguera-Hinestroza *et al.*, 2002).

### **Marcadores (ou locos) microssatélites**

Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são regiões encontradas ao longo do DNA que consistem de pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (Ferreira & Grattapaglia, 1995). As seqüências de microssatélites são altamente polimórficas e abundantes, e são geralmente encontradas nas regiões não codificadoras do genoma (sendo considerados marcadores neutros). São marcadores codominantes, herdados de acordo com a herança mendeliana (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A taxa de mutação dos microssatélites é alta, e um grande número de alelos são variações em tamanho de um único loco (Small *et al.*, 1998).

Os microssatélites podem ser classificados em três famílias: seqüências puras, compostas e interrompidas (Weber, 1990). Qualquer tipo de combinação entre essas famílias é possível. De acordo com o número de nucleotídeos encontrados em cada repetição, os microssatélites podem ainda ser classificados como di-, tri- ou tetra-nucleotídeos (Queller *et al.*, 1993). Em mamíferos, as repetições mais comuns são as de dinucleotídeos (CA)<sub>n</sub> (Rohrer *et al.*, 1994).

Os principais mecanismos que dão origem aos microssatélites são os deslizamentos da DNA polimerase e o *crossing over* desigual. Ambos levam a uma constante inserção e deleção de seqüências simples no genoma (Tautz & Renz, 1984). Estes mecanismos e os erros de reparo que podem ocorrer durante a replicação, geram a diversidade de

microssatélites, o que é facilmente detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos às seqüências flanqueadoras. Devido à alta homologia encontrada nas seqüências flanqueadoras, os *primers* desenvolvidos para uma espécie também podem ser amplificados em espécies relacionadas (Moore *et al.*, 1991). Embora não haja necessidade de que essas espécies sejam intimamente relacionadas, a porcentagem dos locos amplificados decresce à medida que o tempo que separa as espécies aumentar (Fitzsimmons *et al.*, 1995).

Essas inúmeras propriedades fazem dos microssatélites os marcadores moleculares mais empregados nos estudos de mapeamento genético, parentesco, fluxo gênico, identificação forense e estrutura genética de populações (Goldstein & Schlötterer, 1999).

### **Microssatélites em Cetáceos**

Com o avanço da tecnologia dos marcadores microssatélites, estes foram amplamente desenvolvidos para algumas espécies de golfinhos e baleias. O primeiro trabalho a isolar e caracterizar marcadores microssatélites para cetáceos foi o de Amos *et al.* (1991) que isolaram quatro marcadores microssatélites para a baleia-piloto (*Globicephala melas*). Os *primers* desenvolvidos para essa espécie se mostraram altamente polimórficos e foram testados por Schlötterer *et al.* (1991) em DNA extraídos de 11 espécies de cetáceos (baleias e golfinhos). Todos os locos testados foram amplificados para as onze espécies, mostrando que as regiões flanqueadoras destes microssatélites em cetáceos são altamente conservadas. No entanto, apenas três dos quatro locos se mostraram polimórficos. Estes resultados evidenciam que, apesar de se ter marcadores microssatélites desenvolvidos para diferentes espécies de cetáceos, estes nem sempre são polimórficos para

uma espécie em questão. Para estudos de estrutura populacional da beluga (*Delphinapterus leucas*) foram isolados 15 marcadores microssatélites, sendo todos polimórficos (Buchanan *et al.*, 1996). Para o cachalote (*Physeter macrocephalus*) foram isolados 10 marcadores microssatélites, no entanto, apenas cinco foram polimórficos, sendo que o número de alelos variou entre cinco e 18 (Richard *et al.*, 1996b).

Shinohara *et al.* (1997) isolaram e caracterizaram cinco marcadores microssatélites altamente polimórficos para o golfinho nariz-de-garrafa *Tursiops truncatus*. Estes marcadores também foram submetidos ao teste de transferibilidade (*cross-species*) para outras quatro espécies de cetáceos, sendo elas *Grampus griseus*, *Stenella attenuata*, *Globicephala macrorhynchus* e *Megaptera novaeangliae*. Todos os marcadores funcionaram para essas quatro espécies, confirmando o alto grau de conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites nessa Ordem, como já foi demonstrado pelo trabalho de Schlötterer *et al.* (1991). No entanto, apenas duas das espécies testadas apresentaram polimorfismo nas seqüências, com o número de alelos variando entre dois e seis (Shinohara *et al.*, 1997).

Rosel *et al.* (2005) isolaram e caracterizaram 12 marcadores microssatélites também para a espécie *Tursiops truncatus*, que ocorre tanto em áreas costeiras como oceânicas. Estes marcadores foram testados em diferentes indivíduos nas duas áreas de ocorrência e mostraram-se polimórficos para as duas regiões, no entanto em áreas oceânicas o grau de polimorfismo foi bem maior podendo ser encontrados locos com até 25 alelos. Cinco desses *primers* foram testados para duas outras espécies de golfinho, *Stenella frontalis* e *Inia geoffrensis*. A maioria dos *primers* testados se mostraram polimórficos, sendo que um deles foi monomórfico para *I. geoffrensis*.



Para estudos de paternidade e relações de parentesco, foram isolados e caracterizados cinco marcadores microssatélites para uma outra espécie de golfinho nariz-de-garrafa *Tursiops aduncus*. Todos os marcadores isolados foram altamente polimórficos para essa espécie, com o número de alelos variando entre sete e 23 (Krützen *et al.*, 2001). Em estudo testando a transferibilidade desses marcadores para duas outras espécies de golfinho observou-se que para o golfinho listrado (*Stenella coeruleoalba*), três dos cinco microssatélites amplificaram apresentando alto polimorfismo, com o número de alelos variando entre nove e 16. Já na segunda espécie, a franciscana (*Pontoporia blainvillei*), apenas três locos microssatélites amplificaram, sendo que o nível de polimorfismo foi bem menor (cinco alelos/locos no máximo) (Krützen *et al.*, 2001).

Como visto acima, as regiões flanqueadoras das regiões de microssatélites nos cetáceos são muito conservadas, e os marcadores desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados para outras espécies relacionadas (Schlötterer *et al.*, 1991). No entanto, nota-se uma perda de conteúdo informativo, em termos de variabilidade, quando se trabalha com marcadores transferidos de uma espécie para outra. Em estudos populacionais tais como de identificação individual e relações de parentesco, em geral se faz necessário o isolamento de locos microssatélites específicos e que apresentem maior conteúdo informativo, principalmente no que diz respeito ao poder de exclusão desses locos (Krützen *et al.*, 2001).

Como foi dito anteriormente alguns pesquisadores desenvolveram marcadores microssatélites para várias espécies de cetáceos. No entanto, ainda não existem trabalhos sobre o desenvolvimento destes marcadores para nenhuma das espécies de golfinhos de rio, inclusive para o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*).

## Marcadores para determinação de sexo

A determinação do sexo para as espécies de cetáceos é bastante crítica, principalmente em estudos de genética de populações, parentesco e sistemas de reprodução e social, onde na maioria dos casos se faz necessário saber a identidade genética dos indivíduos. Isso se deve a dificuldade que se tem em apenas observar as regiões genitais dos animais no campo, principalmente porque as espécies possuem pouco dimorfismo sexual e genitália interna (Morin *et al.*, 2005).

Em estudos moleculares anteriores, foram desenvolvidas técnicas para determinação do sexo em cetáceos que requeriam além da amplificação via PCR, digestão com enzimas de restrição de um grande fragmento dos genes ZFX/ZFY (Palsbøll *et al.*, 1992). No entanto, foram encontradas algumas dificuldades de amplificação devido ao grande comprimento dos genes e às amostras geralmente estarem um pouco degradadas.

Trabalhos mais recentes (Bérubé & Palsbøll, 1996; Rosel, 2003; Morin *et al.*, 2005) desenvolveram *primers* internos às seqüências dos genes ZFX e ZFY diminuindo o tamanho dos fragmentos e facilitando a amplificação dos mesmos em amostras de DNA degradadas, não sendo necessário o uso das enzimas de restrição ou seqüenciamento dos genes, apenas análise em gel de agarose.

Como os *primers* são desenvolvidos para cetáceos em geral, é necessário que se façam testes de amplificação na espécie que serão usados, pois pode acontecer diferenças nos tamanhos das bandas ou ineficiência na amplificação dos produtos, o que pode levar a determinação incorreta do sexo, especialmente quando a quantidade ou qualidade do DNA for baixa (Rosel, 2003).

## CAPÍTULO I

### **Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para o boto-vermelho *Inia geoffrensis***

#### 1.1 INTRODUÇÃO

O boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) é o maior dos cetáceos de rio existentes no mundo, e está amplamente distribuído nas bacias dos rios Orinoco e Amazonas, tendo como principais limites à sua distribuição, grandes corredeiras, cachoeiras e rios muito pequenos (Best & da Silva, 1993). Tem como uma das suas características comportamentais, ser um animal solitário, não formando grupos estáveis (Martin & da Silva, 2004). Esta espécie tem sido foco de extensa pesquisa para que se possa entender mais de sua biologia e ecologia, no entanto ainda existem muitas dificuldades logísticas (Martin & da Silva, 2004).

Recentemente, alguns estudos vêm mostrando que o uso de marcadores microssatélites tem sido o meio pelo qual vários pesquisadores têm solucionado questões difíceis de serem respondidas apenas com observação em campo, como ecologia, comportamento social, formação de grupos e tipos de sistemas reprodutivos.

As seqüências de DNA microssatélites podem ser muito informativas em estudos de genética populacional e de relacionamento entre indivíduos, podendo determinar a identidade individual e a relação de parentesco dentro e entre populações, e ainda determinar a estrutura genética de populações (Rosel *et al.*, 2005). No entanto, nota-se uma perda de conteúdo informativo, em termos de variabilidade, quando se trabalha com

marcadores transferidos de uma espécie para outra. Em estudos populacionais tais como o de identificação individual e relações de parentesco, em geral, faz-se necessário o isolamento de locos microssatélites específicos e que apresentem maior conteúdo informativo, principalmente no que diz respeito ao poder de exclusão de parentesco desses locos (Krützen *et al.*, 2001).

Apesar de já terem sido desenvolvidos marcadores microssatélites para várias espécies de cetáceos, evidenciando inclusive transferibilidade entre diferentes espécies (Buchanan *et al.*, 1996; Shinohara *et al.*, 1997; Caldwell *et al.*, 2002), ainda não existem trabalhos sobre o desenvolvimento destes marcadores específicos para as espécies de golfinhos de rio, incluindo o boto da Amazônia ou boto-vermelho (*I. geoffrensis*). Para isso, o objetivo do presente trabalho foi construir uma biblioteca genômica, a partir de uma amostra do boto-vermelho, para identificação dos locos microssatélites, posterior caracterização dos mesmos tanto em amostras de boto, como também em outras espécies de golfinhos, como a franciscana (*Pontoporia blainvillei*) e o boto-cinza (*Sotalia guianensis*).

## 1.2 MATERIAL E METODOS

### 1.2.1 *Obtenção das amostras e preparo do material*

Para o isolamento e caracterização dos marcadores microssatélites foi utilizado apenas uma amostra de tecido proveniente de um indivíduo do baixo Rio Madeira. Para a caracterização dos marcadores isolados foram utilizadas amostras de tecido de 31 botos-vermelho (*I. geoffrensis*), sendo que, destas 31 amostras, 14 foram obtidas do banco de tecidos do Laboratório de Mamíferos Aquáticos do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) provenientes de diversos rios da Bacia Amazônica e 17 foram coletadas de animais vivos, em duas localidades do baixo Rio Negro, por coleta de tecido não invasiva.

Para a realização do teste de transferibilidade foram obtidas 10 amostras de boto-cinza (*S. guianensis*) do banco de tecidos do Laboratório de Evolução e Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas, e três amostras de franciscana (*P. blainvillei*), gentilmente cedidas pelo Projeto BioPesca, SP, por meio do Banco de Tecidos de MM-LAPCOM-FMVZ-USP.

### 1.2.2 *Extração de DNA*

Foram utilizados fragmentos (de 2 a 3 mm) de tecido epitelial, muscular, ou ainda do fígado, dependendo da proveniência do tecido. O DNA total foi isolado seguindo o protocolo do kit *Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation* da GE Healthcare, com posterior confirmação da extração em eletroforese de gel de agarose a 1%.

### 1.2.3 Isolamento de regiões de microssatélites

Todo desenvolvimento dos marcadores moleculares de microssatélites seguiu a metodologia modificada de Farias *et al.* (2003).

Aproximadamente 10 µg do DNA genômico de um indivíduo de boto - vermelho foram digeridos com a enzima *Sau3AI* (2 U/µg) numa reação de volume total de 200 µL (100 µL de DNA, 10 µL de tampão da enzima, 2 µL de BSA(100 ng/µL), 2 µL de enzima (2 U/µg), 86 µL de água Milli-Q autoclavada). Esta enzima possui o sítio de restrição 5' ↓GATC 3' e 3' CTAG↑.

Para a construção da biblioteca genômica enriquecida com regiões microssatélites o ideal é obter fragmentos de tamanho variado, entre 400 e 1000 pb. Para tanto, todo o produto da restrição (200 µL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1 % por três horas a 60 V. O corte do gel na região correta foi direcionado pela utilização conjunta de um marcador de peso molecular *Ladder* 1 kb. A banda correspondendo aos fragmentos desejados foi cortada e purificada utilizando-se kit de purificação de gel GFX da GE Healthcare.

Dois oligonucleotídeos adaptadores (Er1Bh1*Blunt* – 5' **CGG AAT TCA GTG GAT CCT GCC** 3'; Er1Bh1*GATCSticky* - 5' **GAT CGG CAG GAT CCA CTG AAT TCC G** 3') foram anelados através de uma reação de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) de 100 µL, passando então a serem chamados de adaptadores ou *linkers*. Depois de anelados, esses oligonucleotídeos formaram um fragmento de DNA dupla fita onde a sequência **GATC** estava livre para se ligar aos fragmentos de DNA provenientes da digestão. A reação de ligação dos adaptadores aos fragmentos de 400 a 1000 pares de bases

foi realizada com os seguintes reagentes: adaptadores (200  $\mu\text{M}$ ), DNA (2-3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), T4 Ligase (2 U/ $\mu\text{L}$ ), Tampão da T4 Ligase (10X). A reação de ligação ocorreu a 16 °C *overnight*.

Como o objetivo foi enriquecer o produto da ligação e evitar a seleção e exclusão casual de alguns fragmentos, o produto da ligação de reação foi então reamplificado em uma reação de PCR usando-se apenas um dos *primers* (*Blunt*). O produto dessa reação foi purificado utilizando um kit de purificação de PCR GFX da GE Healthcare.

#### 1.2.4 Hibridização dos microssatélites

A sonda (CT<sub>10</sub>) foi preparada utilizando-se os seguintes reagentes: sonda-oligo (40  $\mu\text{M}$ ), tampão terminal transferase (5X), Biotina dUTP (1 mM) e terminal transferase (20u/ $\mu\text{L}$ ), formando um complexo biotina-sonda. Após a preparação, este complexo foi ligado à micro esferas magnéticas *Dynabeads® M-280 streptavidin* (Dynal Biotech, Hamburg). Este segundo complexo (sonda-biotina-avidina-dynabeads) foi utilizado na etapa da hibridização, onde foram ligadas às repetições de microssatélites correspondentes no DNA genômico.

A seleção dos fragmentos ricos em repetições, realizada pela ligação dos fragmentos digeridos de DNA ao complexo sonda/biotina/dynabeads, foi feita utilizando-se um protocolo que incluiu: (1) lavagem das esferas magnetizadas que foram misturados aos oligonucleotídeos biotinizados formando um complexo esferas/oligonucleotídeos; (2) hibridização do DNA digerido pré-desnaturado (10 min/95 °C) junto com a solução

esferas/oligonucleotídeos para a hibridização a 55 °C por 4 horas; (3) lavagem do complexo para o isolamento do DNA com as repetições de microssatélites.

Os fragmentos selecionados pelo protocolo descrito acima foram desligados do complexo por lavagem com tampão TE.

#### 1.2.5 *Ligação dos fragmentos selecionados ao plasmídeo vetor e clonagem*

Os produtos da hibridização que continham fragmentos potencialmente ricos em microssatélites foram amplificados, sendo que na última etapa da reação de PCR a *Taq* polimerase adiciona uma adenina na extremidade 3' do fragmento. Os fragmentos são ligados a vetores de clonagem do Kit TOPO TA cloning da Invitrogen®, os quais possuem uma timina extra no final 3', desta forma, este Kit é especialmente desenvolvido para ligar-se a fragmentos de PCR. Depois de ligar os fragmentos ao vetor estes são transformados pela metodologia de eletroporação, utilizando células competentes do próprio Kit.

As células foram inoculadas em 2 mL de meio SOC líquido e incubadas a 37 °C sob agitação por uma hora. Após esse tempo o material foi inoculado em placas de meio SOB sólido com ampicilina. A confirmação de que os plasmídeos extraídos possuíam insertos de diferentes tamanhos foi feita através de PCR usando *primers* universais M13. Após essa confirmação foi realizado o seqüenciamento de duas placas contendo 96 clones para a identificação dos microssatélites.



### 1.2.6 Seqüenciamento dos clones

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando o protocolo de purificação por EXOSAP (Enzimas *Exonuclease* e *Shrimp Phosphatase Alcaline*) conforme protocolo do fabricante.

Para a reação de seqüenciamento, foi utilizado 2 µL dos PCRs de cada colônia já purificados, 2 µL de água e 2 µL do kit de reação *DYEnamic<sup>TM</sup> ET dye terminator kit* (GE Healthcare). A reação é realizada basicamente como uma PCR, no entanto quando os nucleotídeos modificados com fluorescência do *ET dye terminator kit* são inseridos à fita que está sendo construída, esta pára, formando várias cópias da fita molde de vários tamanhos, contendo um nucleotídeo marcado no final. O seqüenciamento dos produtos ocorreu em seqüenciador automático de DNA *MegaBACE<sup>TM</sup> 1000* (GE Healthcare) do Laboratório de Tecnologia de DNA da Universidade Federal do Amazonas, onde as bases marcadas com fluorescência são lidas com um raio laser. Para isso quando as amostras são injetadas nos capilares contendo a matriz de corrida, é realizada uma eletroforese de capilar, onde os fragmentos de tamanho menor correm mais rápidos do que os fragmentos de tamanho maior, e à medida que passam pelo laser a base marcada é lida gerando a seqüência.

Fragmentos com regiões ricas em microssatélites foram selecionados e *primers* foram desenhados a partir das seqüências das regiões de flaqueamento das repetições. Para o desenho dos iniciadores (*primers*) das regiões flaqueadoras dos microssatélites foi utilizado o software Primer 3 disponível *online* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Foram observadas características como: tamanho,

quantidade de nucleotídeos C/G e a possibilidade mínima de formação de estruturas secundárias dentro dos iniciadores.

Todos os *primers* foram desenhados de acordo com o método econômico descrito por Schuelke (2000) que utiliza juntamente com o *primer* específico da região microssatélite uma seqüência chamada de cauda M13, onde será anelado na reação de PCR um *primer* universal M13 marcado com fluorescência, para posterior leitura no seqüenciador automático *MegaBACE<sup>TM</sup>* 1000 (GE Healthcare). Para os testes de polimorfismo foi realizada uma PCR com volume final de 10 µL contendo 4,3 µL de H<sub>2</sub>O, 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,8 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 0,5 µL do *primer forward* contendo a cauda M13 (2 µM), 1,0 µL do *primer* reverso, 1,0 µL do *primer* M13 marcado com fluorescência, 0,2 µL de *Taq* DNA *Polymerase* (5 U/µl) e 1 µL do DNA (com a concentração variando entre 50 ng e 100 ng). E as condições do PCR foram as seguintes: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* variando entre 52 a 60°C dependendo do *primer* por 20 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, repetidas por 35 vezes, seguidas por outro ciclo para anelamento dos *primers* M13 com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 53°C por 20 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, repetidas por 20 vezes, com extensão final de 30 minutos a 72°C.

Os testes de polimorfismo dos fragmentos selecionados foram feitos diretamente no seqüenciador *MegaBACE<sup>TM</sup>* 1000 (GE Healthcare), onde foram utilizados apenas doze indivíduos para cada *primer*. A análise das genotipagens realizadas no seqüenciador foram feitas utilizando os Programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler*.

### 1.2.7 Caracterização dos locos microssatélites

Além dos loci de microssatélites desenvolvidos especificamente para *I. geoffrensis* também testamos e caracterizamos outros loci desenvolvidos para outras espécies de cetáceos (teste de transferibilidade).

Todos os locos microssatélites foram avaliados quanto a sua utilização como marcadores polimórficos para o estudo populacional no boto-vermelho, sendo caracterizados para as seguintes medidas de diversidade genética: (A) – número de alelos, ( $H_o$ ) – heterozigosidade observada, ( $H_e$ ) – heterozigosidade esperada. Os parâmetros genéticos foram estimados por loco utilizando-se o programa ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). O desequilíbrio de ligação entre os locos, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado com 10000 permutações também no programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005).

Foi calculada o índice de identidade genética (I), de acordo com Paetkau (1995), que indica a probabilidade de encontrar em uma população dois indivíduos não relacionados com um genótipo idêntico. Também foi calculado o índice de exclusão de paternidade (Q), que indica a probabilidade de se excluir os prováveis pais de um filhote usando um conjunto de marcadores microssatélites, de acordo com Weir (1996). Para as duas medidas mencionadas foram calculados valores para cada loco e para todos os locos utilizados em conjunto.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas quatro placas com 96 *wells* de clones de bactérias selecionadas que continham fragmentos de DNA genômico do boto-vermelho com regiões ricas em microssatélites. No entanto, apenas duas dessas placas foram seqüenciadas uma vez que em mais de 50% das seqüências de cada placa foram observadas seqüências com microssatélites. Apesar de uma alta taxa de clones ricos em microssatélites, nem todos apresentaram boas regiões flanqueadoras para o desenho dos *primers*.

Das 88 seqüências obtidas que continham regiões ricas em microssatélites, foram desenhados 25 pares de *primers*. Destes, 44% flanqueiam microssatélites perfeitos, e o restante (56%) são microssatélites imperfeitos, normalmente compostos por repetições GT ou CT+GA.

Por questões de tempo, apenas sete destes 25 pares de *primers* desenvolvidos foram testados, sendo que todos se mostraram polimórficos para o boto-vermelho, com o número de alelos variando de dois a 12, como é mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Caracterização dos locos microssatélites tanto desenvolvidos para o boto-vermelho (*I. geoffrensis*), como os desenvolvidos para outras espécies de cetáceos e testados no boto-vermelho: tipo de repetição, temperatura de anelamento, tamanho dos *loci*, número de indivíduos analisados (n), número de alelos (A) e Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), Índice de exclusão de parentesco (Q) e Índice de identidade genética (I).

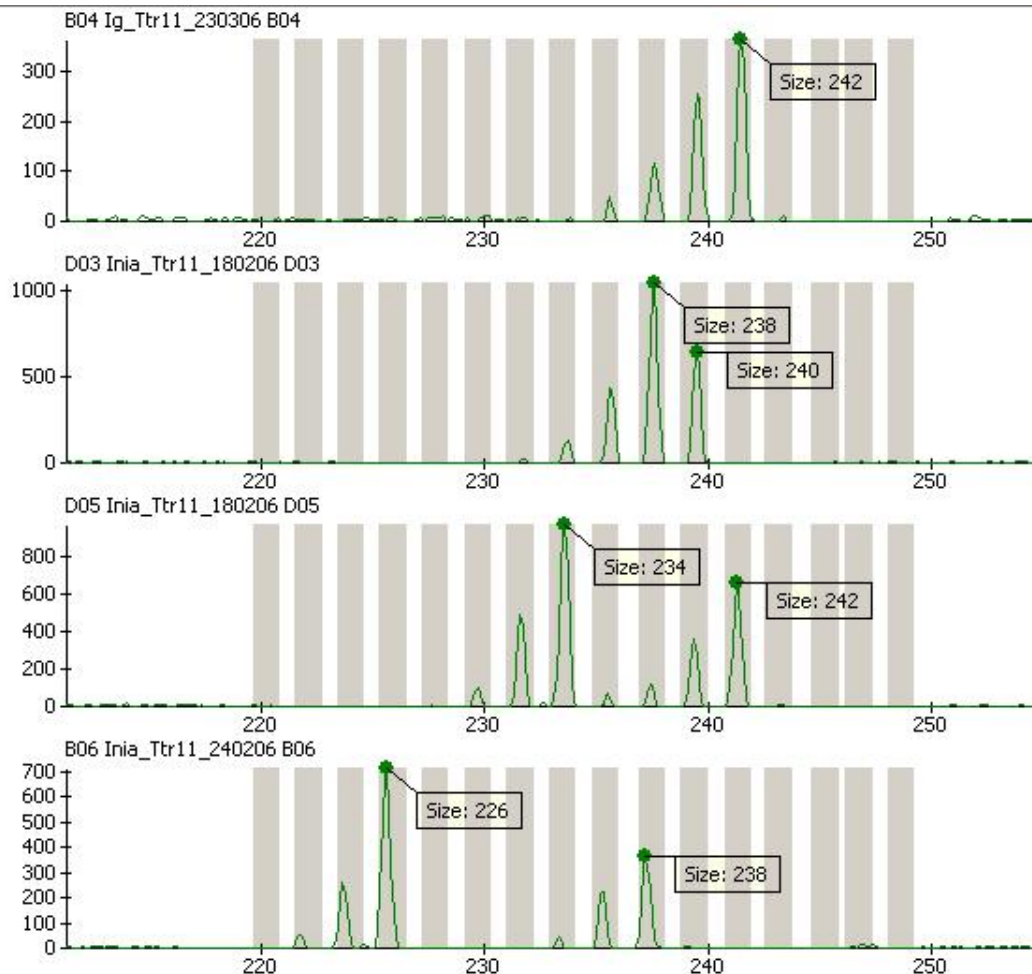
Locos	Seqüência do <i>primer</i>	Repetição	T (°C)	Tamanho (pb)	<i>Inia geoffrensis</i>					
					n	A	Ho	He	Q	I
Ig1B1	Presente trabalho	(GA)10	60	283-285	24	2	0,3	0,68	0,21	0,38
Ig1F1	Presente trabalho	(GT)11 (GA)6 gg (GA)4 aa (GA)24	60	164-178	29	7	0,9	0,79	0,59	0,08

Ig2B1	Presente trabalho	(CT) <sub>17</sub>	60	194-220	31	7	0,5	0,68	0,34	0,24
Ig2G1	Presente trabalho	(GA) <sub>4</sub> ca (GA) <sub>5</sub> ca (GA) <sub>5</sub> ca (GA) <sub>3</sub>	60	167-177	30	2	0,1	0,19	0,10	0,61
Ig3A1	Presente trabalho	(GA) <sub>18</sub>	60	249-255	29	4	0,2	0,58	0,29	0,28
Ig10A1	Presente trabalho	(CT) <sub>11</sub> cc (CT) <sub>12</sub>	60	237-265	20	12	0,1	0,57	0,71	0,03
Ig11B1	Presente trabalho	(CT) <sub>18</sub>	60	327-343	31	8	0,8	0,74	0,53	0,10
MK3	Krützen <i>et al.</i> (2001)	(A) <sub>9</sub> TAC(GT) <sub>15</sub> AT( GT) <sub>7</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
MK5	Krützen <i>et al.</i> (2001)	(TG) <sub>13</sub> CT(TG) <sub>2</sub> CA( TG) <sub>2</sub> (TA) <sub>2</sub> (TG) <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
MK6	Krützen <i>et al.</i> (2001)	(GT) <sub>17</sub>	60	139	9	1	-	-	-	-
MK8	Krützen <i>et al.</i> (2001)	(CA) <sub>23</sub>	60	75-77	27	2	0,3	0,57	0,21	0,37
MK9	Krützen <i>et al.</i> (2001)	(CA) <sub>19</sub>	60	159-175	28	7	0,8	0,66	0,44	0,16
TtruAAT40	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(AAT) <sub>16</sub>	60	143-153	31	5	0,3	0,63	0,47	0,13
TtruAAT44	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(AAT) <sub>12</sub>	60	79	29	1	-	-	-	-
TtruAAT116	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(ATT) <sub>13</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
TtruGT51	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(GT) <sub>16</sub>	60	224	20	1	-	-	-	-
TtruGT142	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(TG) <sub>20</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
TtruGT6	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(CA) <sub>18</sub>	60	181-185	19	3	-	-	-	-
TtruGT39	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(AC) <sub>21</sub>	60	152-158	10	3	-	-	-	-
TtruGT48	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	(CT) <sub>17</sub> N <sub>9</sub> (CA) <sub>18</sub>	60	207-221	9	6	-	-	-	-
Ttr04	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>25</sub>	60	83-85	31	2	0,2	0,27	0,05	0,78
Ttr11	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>21</sub>	60	208-228	30	8	0,8	0,81	0,59	0,08
Ttr19	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>17</sub>	60	-	-	-	-	-	-	-
Ttr34	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>19</sub>	59,3	187-193	25	4	0,2	0,75	0,28	0,30
Ttr48	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>18</sub>	60	130-136	30	3	0,6	0,68	0,29	0,81
Ttr58	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>17</sub>	58	165-169	29	3	0,3	0,56	0,05	0,28
Ttr63	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>34</sub>	60	111-121	31	6	0,4	0,74	0,43	0,17
TtrFF6	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CA) <sub>20</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
TtrRC12	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(TA) <sub>19</sub>	56,9	107-109	30	3	0,7	0,52	0,24	0,34
TtrRH1	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(TA) <sub>21</sub>	60	179	26	1	-	-	-	-

TtrRC11	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(CT) <sub>16</sub>	52,9	-	-	-	-	-	-	-
TtrRA6	Rosel <i>et al.</i> (2005)	(TG) <sub>20</sub>	60	113-117	30	3	0,5	0,6	0,19	0,42

Durante a etapa de caracterização dos microssatélites também foram testados *primers* desenvolvidos para o golfinho nariz-de-garrafa *Tursiops truncatus*, descritos por Caldwell *et al.* (2002) e Rosel *et al.* (2005), e para outra espécie do gênero *Tursiops* desenvolvidos por Krützen *et al.* (2001). Para este teste de transferibilidade foi testado um total de 25 *primers*, sendo que destes apenas 20 funcionaram para o boto-vermelho, e 14 se mostraram polimórficos, com o número de alelos variando de dois a oito, de acordo com a Tabela 1. Esse tipo de resultado confere com o que foi dito por Krützen (2001), que marcadores transferidos de uma espécie para outra perdem variabilidade. Um exemplo da análise de um dos *loci* polimórficos pode ser observado na Figura 1.

Os *loci* Ttr19 e TtrRC11 (Rosel *et al.*, 2005) foram retirados da análise por não ter sido possível detectar o tamanho do alelo, sendo necessária uma melhor otimização da PCR. Três dos *loci* desenhados por Caldwell *et al.* (2002) (TtruGT6, TtruGT39 e TtruGT48) também foram retirados das análises por não ter sido possível genotipar todos os indivíduos, no entanto estes *loci* se mostraram polimórficos para os poucos indivíduos genotipados.



**Figura 1** – Eletroferograma mostrando polimorfismo para um dos *loci* desenvolvidos para *Tursiops truncatus*, (Ttr11) e utilizados para *Inia geoffrensis*, utilizando o programa *Fragment Profiler*.

Dos 12 *primers* desenvolvidos por Rosel *et al.* (2005), seis já haviam sido testados para o boto-vermelho. Destes, um havia sido descrito como monomórfico (Ttr04), por ter apresentado apenas um alelo para um grupo de sete indivíduos. No presente trabalho este *primer* se mostrou polimórfico com dois alelos, isso se deve a um maior número de indivíduos genotipados (31) em relação ao trabalho descrito.

Também foi possível observar uma diminuição de variabilidade para o boto-vermelho em alguns dos *primers* desenvolvidos para outras espécies. O *primer* Ttr63

(Rosel *et al.*, 2005) apresentou para uma das populações da espécie descrita, também analisadas por Rosel *et al.* (2005), 25 alelos e, para o boto-vermelho só foram encontrados seis alelos. Esta perda de variabilidade pode ser melhor observada na Tabela 2.

**Tabela 2** – Comparação da variabilidade genética de marcadores microssatélites desenvolvidos para outras espécies de cetáceos e testados no boto-vermelho (*Inia geoffrensis*): número de indivíduos analisados (n), número de alelos (A) e Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para cada *primer*.

<i>Locus</i>	Seqüência do primer	Espécie descrita				<i>Inia geoffrensis</i>			
		n	A	Ho	He	n	A	Ho	He
MK6	Krützen <i>et al.</i> (2001)	714	23	0,87	0,89	9	1	-	-
MK8	Krützen <i>et al.</i> (2001)	692	11	0,76	0,71	27	2	0,3	0,57
MK9	Krützen <i>et al.</i> (2001)	456	7	0,71	0,75	28	7	0,8	0,66
TtruAAT40	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	103	13	0,75	0,62	31	5	0,3	0,63
TtruAAT44	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	103	6	0,36	0,41	29	1	-	-
TtruGT51	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	103	10	0,67	0,58	20	1	-	-
TtruGT6	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	103	10	0,08	0,12	19	3	-	-
TtruGT39	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	103	7	0,50	0,65	10	3	-	-
TtruGT48	Caldwell <i>et al.</i> (2002)	103	11	0,42	0,45	9	6	-	-
Ttr04	Rosel <i>et al.</i> (2005)	92	9	0,674	0,64	31	2	0,2	0,27
Ttr11	Rosel <i>et al.</i> (2005)	94	8	0,713	0,647	30	8	0,8	0,81
Ttr34	Rosel <i>et al.</i> (2005)	95	6	0,421	0,446	25	4	0,2	0,75
Ttr48	Rosel <i>et al.</i> (2005)	95	7	0,484	0,514	30	3	0,6	0,68
Ttr58	Rosel <i>et al.</i> (2005)	96	6	0,547	0,633	29	3	0,3	0,56
Ttr63	Rosel <i>et al.</i> (2005)	95	16	0,833	0,892	31	6	0,4	0,74
TtrRC12	Rosel <i>et al.</i> (2005)	34	9	0,910	0,855	30	3	0,4	0,74
TtrRH1	Rosel <i>et al.</i> (2005)	10	8	1,0	0,864	26	1	-	-
TtrRA6	Rosel <i>et al.</i> (2005)	8	2	0,250	0,533	30	3	0,5	0,6



Não foi observado significativo desequilíbrio de ligação nas comparações entre pares de *loci*. Os *loci* Ig1B1, Ig3A1, Ig10A1, e TtruAAT40 após correção de Bonferroni foram considerados fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo necessário maior atenção na utilização destes *primers*.

Também foram estimados valores de índice de exclusão de parentesco (Q), e índice de identidade genética (I) para cada um dos *loci* separadamente e para todos os *loci* utilizados nesse trabalho, em conjunto (Tabela 1). Os valores de todos os *loci* em conjunto foi de 0,999753 para o índice de exclusão de parentesco, esse valor mostra a probabilidade de excluir um possível pai para um filhote usando esse conjunto de marcadores. O resultado mostra que os *loci* utilizados são bons marcadores para estimativa de relacionamento entre indivíduos. O valor de I foi  $5,55 \times 10^{-12}$ , esse valor mostra a probabilidade de se encontrar em uma amostragem aleatória um genótipo idêntico entre dois indivíduos usando o conjunto de *primers* utilizado neste trabalho. Como o valor de I encontrado foi muito baixo, estes marcadores também podem ser usados para estudos de estrutura populacional.

Além destes *primers* serem testados para o boto-vermelho, também foram testados para a franciscana (*P. blainvillei*), que é a espécie mais relacionada ao boto-vermelho (Hamilton *et al.*, 2001) e para o boto-cinza (*S. guianensis*), uma espécie mais distante filogeneticamente. Todos os *primers* testados amplificaram para as três espécies como é mostrado na Tabela 3, sendo que o número de alelos variou entre os *loci* e entre as espécies.

**Tabela 3** – Teste de transferibilidade realizado com os *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Inia geoffrensis*.

	Ig1B1	Ig1F1	Ig2B1	Ig2G1	Ig3A1	Ig10A1	Ig11B1
<i>Inia geoffrensis</i>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Sotalia guianensis</i>	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+
<i>Pontoporia blainvillei</i>	+/+	+/?	+/+	+/?	+/?	+/?	+/+

Legenda: +/+ Funcionou, e foi polimórfico

+/? Funcionou, mas não foi possível determinar se foi polimórfico ou não

-/+ Funcionou, mas foi monomórfico

Para a franciscana não foi possível determinar se quatro dos *primers* utilizados foram polimórficos ou monomórficos. Isso se deve ao baixo número de amostras usadas desta espécie, que foram apenas três. Já para o boto-cinza apenas um dos *primers* se mostrou monomórfico (Ig3A1), sendo que os outros *loci* variaram o número de alelos entre dois e nove.

As características genéticas destes *loci*, tanto para *Inia geoffrensis*, como para as duas outras espécies de cetáceos testadas (*S. guianensis* e *P. blainvillei*), indicam que estes podem ser importantes marcadores moleculares em estudos de estrutura populacional, e relações de parentesco.

## CAPÍTULO II

### **Níveis de parentesco em duas agregações de boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) do baixo Rio Negro, Amazonas – AM.**

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, diferentes taxas de migração baseadas no sexo dos indivíduos são bastante comuns. Normalmente um dos sexos é filopátrico, enquanto que o outro dispersa mais (Tiedemann *et al.*, 2000). Para grupos de animais sociais, a filopatria de um dos sexos leva a um maior nível de relacionamento entre os membros do sexo filopátrico do que entre os indivíduos do sexo que se dispersa, e isso pode indicar que os indivíduos que se dispersam em grandes grupos não o fazem com seus parentes (Lukas *et al.*, 2005).

Várias espécies de mamíferos formam alianças, estas agregações são formadas tanto por machos quanto por fêmeas, com intuitos diferentes. Os machos formam alianças principalmente para terem acesso ou defender as fêmeas, como acontece com o golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops* sp., (Connor *et al.*, 1996)); ou para competição por território, como acontece com várias espécies de primatas (Pusey & Packer, 1987). Fêmeas formam alianças principalmente para competir por recursos alimentares, por exemplo, e defender os filhotes de predadores (Krützen *et al.*, 2003; Krützen *et al.*, 2004).

Esse tipo de agregação em cetáceos está sendo muito estudado nas espécies de golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus* e *Tursiops aduncus*). Estas espécies, em algumas regiões, apresentam o comportamento de formação de alianças principalmente de

machos, para competir por fêmeas, como pode ser observado nas Bahamas (Parsons *et al.*, 2003) e em Shark Bay na Austrália (Krützen *et al.*, 2004). Para estas espécies de golfinhos, as alianças formadas pelos machos acontecem em algumas regiões, mas não em outras, e mesmo em lugares onde elas ocorrem, os machos continuam a se comportar como solitários (Connor *et al.*, 2000).

O boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) é o maior dos cetáceos de água doce do mundo, e pode ser encontrado nas Bacias dos rios Orinoco e do Amazonas (Best & da Silva, 1993). Apesar da sua ampla distribuição, poucos estudos têm sido realizados a fim de entender o comportamento desses animais. Martin & da Silva (Martin & da Silva, 2004) observaram que machos e fêmeas dessa espécie apresentam diferentes preferências por habitat. Os machos preferem os rios maiores, enquanto que as fêmeas com filhotes permanecem mais isoladas e procuram locais mais calmos e protegidos, podendo ser mais facilmente encontradas em chavascal e dentro das áreas de várzeas,. Embora não possuem comportamento de formação de grupos estáveis, esses animais podem ser observados em agregações de vários tamanhos em locais de alimentação, como bocas de rios e encontro de águas (Martin & da Silva, 2004).

Ultimamente, a ferramenta molecular mais utilizada para responder questões ecológicas tem sido os marcadores de DNA microssatélites. As informações obtidas com este tipo de marcador podem responder questões biológicas, desde a determinação de identidade genética até de relacionamento entre indivíduos, incluindo estrutura genética das populações e relações evolutivas (Rosel *et al.*, 2005).

Os microssatélites são seqüências simples de duas ou três bases, repetidas em tandem. Usualmente são menores do que 100 pb e são encontrados dispersos pelo genoma. Tais características permitem o seu isolamento a partir de PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase) usando *primers* desenhados para as regiões flanqueadoras das repetições. As diferenças alélicas em cada *locus* são devidas a mudanças nos números de repetições das unidades (Tautz, 1989). Os microssatélites são os mais indicados para ajudar a responder questões de genética populacional por duas razões: o número de alelos detectados em cada *locus* de microssatélite é bem maior que o encontrado com isoenzimas ou RFLPs (Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), e as taxas de mutação dos microssatélites normalmente são bem maiores do que as observadas em DNAs não-codificadores (Tautz, 1989).

Utilizando este tipo de marcadores o presente trabalho tem como objetivo determinar se existe algum padrão na formação das agregações de botos observadas em duas localidades do baixo Rio Negro, e determinar qual o grau de relacionamento entre os indivíduos que participam dessas duas agregações.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Área de Estudo

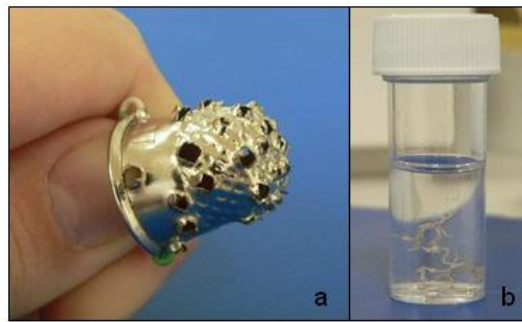
Foram feitas coletas em duas localidades do baixo Rio Negro, Amazonas. Uma delas se deu na cidade de Novo Airão, Amazonas, a 180 km de Manaus, onde, desde 1998, duas irmãs começaram a alimentar alguns botos no, agora chamado, Flutuante Boto-cor-de-rosa, pertencente à Dona Marilda (mãe das meninas). Hoje existem cerca de 14 indivíduos de boto-vermelho que interagem com turistas e moradores da região em busca de alimento. A outra coleta foi realizada no Furo do Ariaú (Hotel Ariaú Amazon Towers) (Figura 2), localizado a duas horas de Manaus subindo o Rio Negro. Nesta localidade, os caseiros do local vêm alimentando cerca de 15 indivíduos de boto-vermelho há dois anos.



**Figura 2** – Coleta de tecido do boto no Furo do Ariaú (Foto: Izeni P. Farias).

### 2.2.2 Obtenção das amostras e preparo do material

A coleta de tecido epitelial dos botos foi realizada com a ajuda de um dedal de costura modificado (furado, para que parecesse um ralador) (Figura 3a). Durante a interação com os botos (Figura 4) esse dedal foi raspado na nadadeira peitoral dos animais tirando fios de tecido muito pequenos (Figura 3b). Os animais não sofreram nenhum tipo de dano, já que o tecido retirado foi muito superficial.



**Figura 3** – Dedal de costura modificado para coleta (a) e material coletado (b) (Foto: Waleska Gravena).



**Figura 4** – Coleta de tecido do boto em Novo Airão com a ajuda do dedal modificado (Foto: Vera M. F. da Silva).

Foram amostrados tecidos de 11 botos da região de Novo Airão, que foram armazenados em álcool 100% e etiquetados com os respectivos nomes atribuídos aos botos pelas duas irmãs. Também foram amostrados tecidos de sete botos do Furo do Ariaú, que também foram armazenadas em álcool 100% e etiquetadas com os nomes dos animais dados pelos caseiros.

### 2.2.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizados fragmentos de aproximadamente 3 mm do tecido epitelial coletado. O DNA total foi isolado seguindo o protocolo do Kit *Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation* da GE Healthcare, e posterior confirmação da extração em eletroforese de gel de agarose a 1%.

### 2.2.4 Amplificação do DNA

Para a análise de parentesco foram utilizados 14 *primers* de microssatélites, destes, 10 foram *primers* desenvolvidos para outras espécies de cetáceos (Ttr04, Ttr11, Ttr34, Ttr48, Ttr58, Ttr63, TtrRA6, TtrRC12 desenvolvidos por (Rosel *et al.*, 2005)Rosel *et al.*, MK8 e MK9 desenvolvidos por (Krützen *et al.*, 2001), que foram informativos para *Inia geoffrensis*, e 4 foram *primers* desenvolvidos durante este estudo (Ig1F1, Ig2B1, Ig2G1, Ig11B1).



Todos os *primers* utilizados, tanto os desenvolvidos para outras espécies como os desenvolvidos para este trabalho, foram marcados de acordo com o método descrito por Schuelke (Schuelke, 2000) que utiliza juntamente com o *primer* específico da região microssatélite uma seqüência chamada de cauda M13, onde será anelado na reação de PCR um *primer* universal M13 marcado com fluorescência, para posterior leitura no seqüenciador automático *MegaBACE<sup>TM</sup>* 1000 (GE Healthcare).

#### 2.2.5 Determinação do sexo

A determinação do sexo dos indivíduos se deu por reação de PCR, com um par de *primers* para o gene ZFX e um par para o gene SRY encontrados nos cromossomos X e Y respectivamente, como descrito por Rosel (Rosel, 2003)

Os fragmentos gerados por PCR dos genes ZFX e SRY possuem uma diferença de apenas 43 pares de bases, por isso são visualizadas em gel de agarose 2,5 a 3%.

#### 2.2.6 Análises genéticas

No total foram analisados 18 indivíduos, 11 pertencentes à região de Novo Airão e sete pertencentes ao Furo do Ariaú, para determinação das relações de parentesco. As genotipagens foram realizadas no seqüenciador automático *MegaBACE<sup>TM</sup>* 1000 (GE Healthcare). As análises dos fragmentos amplificados foram realizadas nos programas do mesmo fabricante, *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler* onde foi possível observar o tamanho dos alelos para cada indivíduo comparado ao padrão ET 400 ROX. Após a genotipagem de cada indivíduo foi montada uma matriz com todos os alelos de cada

indivíduo, esta matriz foi usada como *input file* para o programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 2002) que faz os cálculos da frequência de cada alelo nas populações como um todo.

Uma análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) considerando-se o  $F_{ST}$  de Wright (Wright, 1969) (Goodnight & Queller, 1999), foi utilizada para descrever a quantidade de diferenciação e fluxo gênico entre as duas regiões (Neigel, 2002). A AMOVA é uma análise hierárquica a qual divide a variação total em componentes covariantes devido a diferenças intraindividuais, interindividuais e/ou diferenças interpopulacionais. No presente trabalho, os dados foram analisados usando-se o  $F_{ST}$  de Wright (Wright, 1969) ao invés do  $R_{ST}$  de Slatkin (Slatkin, 1995), considerando-se que a variância do  $R_{ST}$  tende a ser muito maior do que a do  $F_{ST}$  quando menos de 20 *loci* são analisados (Gaggiotti *et al.*, 1999)

A variabilidade genética foi avaliada em termos de número de alelos por loci, heterozigosidade (observada e esperada) e nos níveis de diversidade gênica estimados para as agregações. A diversidade gênica é equivalente a heterozigosidade esperada, e é definida como a probabilidade de que dois alelos amostrados aleatoriamente em uma amostragem, não sejam idênticos por descendência (Nei, 1987).

Outro teste aplicado no presente trabalho foi o de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) o qual assume uma condição genético-populacional ideal caracterizada pela união aleatória de alelos de um locus neutro em uma população infinitamente grande. Para populações que não estão sob o EHW a estrutura populacional total pode ser subestimada, se os alelos que são genotipados estiverem sob seleção, exocruzamento, endocruzamento, alelos nulos (que causa excesso de homozigotos devido a alelos não detectados) e efeito de Wahlund (excesso de homozigotos devido à união de populações geneticamente

subdivididas). Desta forma, variações no tamanho dos *loci* microssatélites foram determinadas pela frequência de heterozigotos (observada e esperada) e testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e divergência na frequência alélica e genotípica entre as populações, análises estas implementadas no programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005).

O coeficiente de relacionamento (R) entre os indivíduos das duas agregações, foi estimado no programa Kinship 1.3 (Goodnight & Queller, 1999). Para essas análises também foram utilizados 14 indivíduos de boto-vermelho provenientes de diversos rios da Bacia Amazônica (também utilizadas na caracterização descrita no Capítulo I), uma vez que para esta análise existe a necessidade da obtenção das frequências alélicas estimadas para a população natural da qual as agregações fazem parte. Para calcular os valores de R, assumi-se que não existe desequilíbrio de ligação, endocruzamento e taxas de mutação. O programa estima dois valores de verossimilhança para cada par de indivíduos dentro da agregação para duas hipóteses, a primeira hipótese considera algum nível de relacionamento, e a hipótese nula considera que não existe nenhum tipo de relacionamento, como é observado na Tabela 4, onde os valores de  $P_{xm}$ ,  $P_{ym}$ ,  $P_{xp}$  e  $P_{yp}$  são as frequências alélicas da população, e X e Y são os indivíduos testados. A partir destes valores, é calculada uma taxa para os pares de indivíduos que resulta em uma matriz simétrica dos valores de relacionamento entre eles. Assume-se que valores de R (coeficiente de relacionamento) em torno de 0,12, 0,25, 0,50 ou maior que 0,50, os indivíduos são considerados primos, meio irmãos, irmãos verdadeiros, ou pais e filhotes, respectivamente.

**Tabela 4** – Fórmulas utilizadas para o cálculo da verossimilhança entre os pares de indivíduos analisados, onde X e Y são os indivíduos testados que podem ter alelos de origem materna ( $X_m$  e  $Y_m$ ) ou paterna ( $X_p$  e  $Y_p$ ), os valores de  $P_{xm}$ ,  $P_{ym}$ ,  $P_{xp}$  e  $P_{yp}$  são as frequências alélicas da população, e R indica a hipótese de relacionamento onde o compartilhamento de alelos pode ser proveniente tanto da linhagem materna ( $R_m$ ) quanto paterna ( $R_p$ ).

	$X_p = Y_p$	$X_p \neq Y_p$
$X_m = Y_m$	$P_{xm}(R_m + (1 - R_m)P_{xm}) \times P_{xp}(R_p + (1 - R_p)P_{xp})$	$P_{xm}(R_m + (1 - R_m)P_{xm}) \times P_{xp}(1 - R_p)P_{yp}$
$X_m \neq Y_m$	$P_{xm}(1 - R_m)P_{ym} \times P_{xp}(R_p + (1 - R_p)P_{xp})$	$P_{xm}(1 - R_m)P_{ym} \times P_{xp}(1 - R_p)P_{yp}$

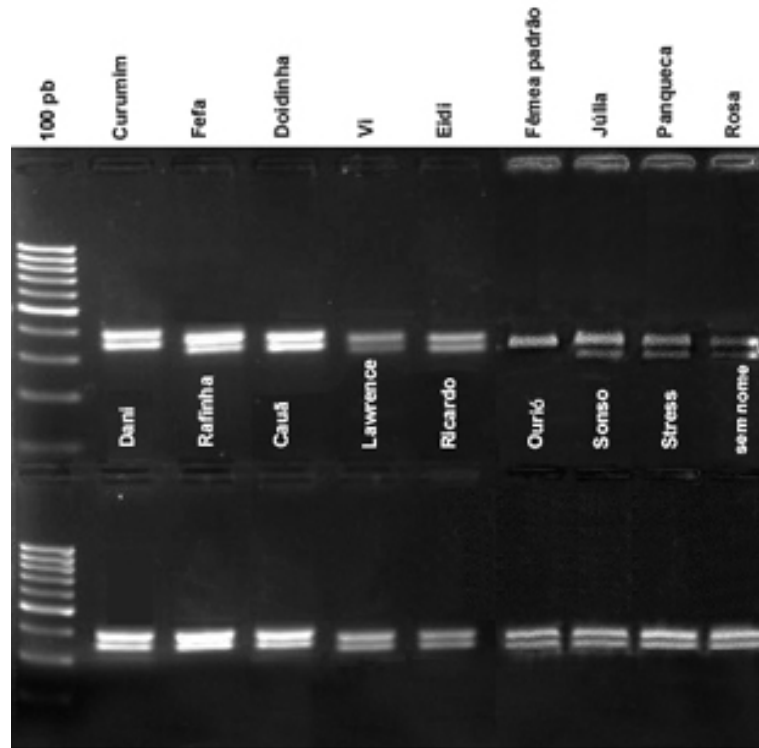
Para sabermos o nível de relacionamento entre os indivíduos também foi utilizado o programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006), que apresenta dois métodos para encontrar o nível de relacionamento entre os pares de indivíduos: análise de máxima verossimilhança para testar as hipóteses de níveis de relacionamento, e um método que faz várias simulações para encontrar relacionamentos consistentes com as análises de máxima verossimilhança. Os genótipos de pares de indivíduos são testados como não relacionados e as probabilidades são calculadas para cada par, assumindo-se que as frequências alélicas na população total sejam iguais às frequências das amostras. Estas hipóteses são simuladas várias vezes, e se o valor de  $P$  encontrado para cada par é menor do que 0,05 a hipótese é rejeitada, se o valor de  $P$  é maior do que 0,05 a hipótese é consistente. Os resultados são mostrados como uma matriz, no entanto não são mostrados valores e sim o tipo de relacionamento entre os indivíduos considerando as hipóteses testadas e os índices de

relacionamentos encontrados. Sendo que U (*Unrelated*) são indivíduos não relacionados, HS (*Half-Sibs*) são meio irmãos, FS (*Full-Sibs*) irmãos verdadeiros e PO (*Parent/Offspring*) são indivíduos considerados pais e filhotes. Em alguns casos além da hipótese mais provável de relacionamento, existe a possibilidade de também não se descartar outras hipóteses alternativas.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 *Determinação do sexo dos indivíduos*

Para o presente trabalho fez-se necessário determinar o sexo dos animais para sabermos qual é a estrutura sexual das agregações. Essa determinação foi feita por meio de marcadores moleculares do gene ZFX no cromossomo X e do gene SRY no cromossomo Y desenvolvidos para cetáceos (Richard *et al.*, 1994; Bérubé & Palsbøll, 1996; Rosel, 2003). O resultado do PCR foi observado em gel de 2,5 a 3%, com marcador molecular de 100 pares de bases. O indivíduo é considerado macho quando se observa no gel duas bandas, uma referente ao gene ZFX e outra referente ao gene SRY, mostrando que todos os indivíduos amostrados nas duas agregações são machos (Figura 5). As fêmeas possuem apenas uma banda visível, que na realidade são duas bandas do mesmo gene (ZFX) sobrepostas pertencentes a dois cromossomos.



**Figura 5** – Foto do gel de determinação do sexo dos indivíduos de Novo Airão (Curumin, Fefa, Doidinha, Vi, Eidi, Dani, Rafinha, Cauã, Lawrence e Ricardo), de uma fêmea padrão e dos indivíduos do Ariaú (Julia, Panqueca, Rosa, Curió, Sonso, Stress, e Sem nome), realizados com marcadores moleculares de genes dos cromossomos X e Y.

### 2.3.2 Variabilidade genética

Foi observada uma considerável variabilidade alélica no número de alelos nos *loci* do boto-vermelho, onde os valores variaram entre dois a oito alelos considerando as duas agregações juntas. Para a agregação de Ariaú um dos *loci* (Ttr58) não se mostrou variável, sendo monomórfico para esta agregação. O *locus* menos variável foi o Ttr04 que mostrou os mesmos alelos para os indivíduos do Ariaú e de Novo Airão.

Não foi observado significativo desequilíbrio de ligação nas comparações entre os pares de *loci* para nenhuma das localidades.

Para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nenhum dos *loci* mostraram-se em desequilíbrio, onde para a agregação do Ariaú a Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,28 a 0,85 (média =  $0,48 \pm 0,21$ ), e a Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,26 a 0,84 (média =  $0,57 \pm 0,19$ ). Para a agregação de Novo Airão a  $H_o$  variou de 0,10 a 0,90 e a  $H_e$  de 0,19 a 0,81, como pode ser observado na Tabela 5.

A diversidade gênica estimada para as duas agregações como um todo foi de 0,56 ( $\pm 0,29$ ). E as diversidades observadas para cada agregação foram de 0,56 ( $\pm 0,30$ ) e 0,53 ( $\pm 0,29$ ), para Novo Airão e Ariaú, respectivamente.



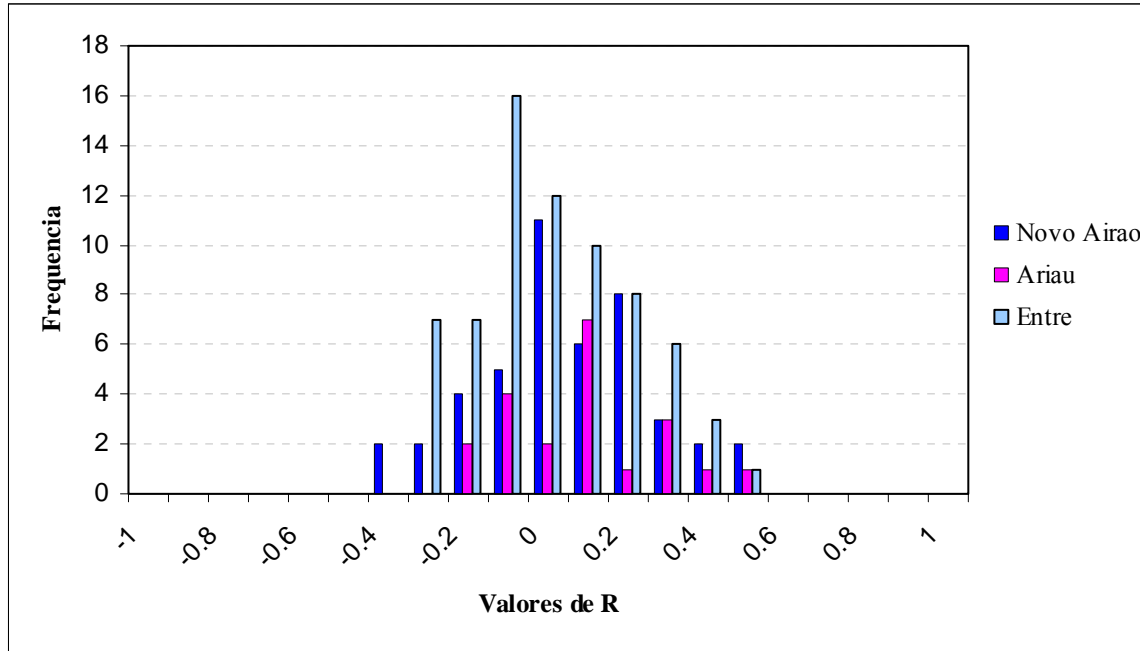
**Tabela 5** – Número de alelos, Heterozigosidade Observada (Ho), Heterozigosidade Esperada (He) e valores de *P* estimados para os botos-vermelho do Ariáú e de Novo Airão separadamente e para as duas agregações juntas.

	Ig1F1	Ig2B1	Ig2G1	Ig11B1	MK8	MK9	Ttr04	Ttr11	Ttr34	Ttr48	Ttr58	Ttr63	TtrRA6	TtrRC12
Ariáú														
Alelos	5	3	2	5	3	4	2	6	3	2	1	4	2	3
Ho	0,85	0,71	0,42	0,85	0,71	0,42	0,28	0,71	0,28	0,57	-	0,71	0,28	0,57
He	0,83	0,62	0,36	0,75	0,74	0,78	0,26	0,84	0,59	0,43	-	0,57	0,38	0,69
<i>P</i>	0,40	1,00	1,00	0,05	0,003	0,01	1,00	0,23	0,17	1,00	-	1,00	1,00	0,16
Novo Airão														
Alelos	5	4	2	4	2	4	2	6	4	3	4	5	3	2
Ho	0,9	0,5	0,1	0,2	0,3	0,8	0,2	0,8	0,2	0,6	0,3	0,4	0,5	0,7
He	0,79	0,68	0,19	0,58	0,57	0,66	0,27	0,81	0,75	0,68	0,56	0,74	0,6	0,52
<i>P</i>	0,41	0,84	1,00	0,007	0,24	0,25	1,00	0,42	0,008	0,75	0,02	0,03	0,07	0,51
Todas														
Alelos	6	5	2	7	3	5	2	8	4	3	4	6	3	3
Ho	0,88	0,58	0,23	0,47	0,47	0,64	0,23	0,76	0,23	0,58	0,17	0,52	0,41	0,64
He	0,79	0,62	0,21	0,67	0,61	0,70	0,21	0,82	0,63	0,58	0,41	0,67	0,47	0,58
<i>P</i>	0,003	1,00	1,00	0,004	0,01	0,01	1,00	0,70	0,00	0,82	0,006	0,13	0,02	0,19

A AMOVA indicou ausência de estrutura populacional após a correção de Bonferroni ( $F_{ST}=0,04224$ ,  $P=0,033$ ), onde a maior variação foi observada dentro das agregações (95,78%) do que entre as agregações (4,22%). O número de migrantes por geração entre as duas agregações foi alto ( $Nm=11,33$ ).

### 2.3.3 Parentesco

A média do nível de parentesco (coeficiente de relacionamento) dentro de cada agregação e entre elas se mostrou baixa, sendo -0,001, 0,04 e -0,03 para Novo Airão, Ariaú e entre as duas localidades respectivamente,, como pode ser observado na Figura 6. No entanto, nas duas agregações são observados alguns indivíduos com alto grau de relacionamento como mostrado na Tabela 7. Como já foi dito, assumimos que os valores de R em torno de 0,12, 0,25, 0,50 ou maior que 0,50, os indivíduos são considerados primos, meio irmãos, irmãos verdadeiros, ou pais e filhotes, respectivamente.



**Figura 6** – Gráfico das freqüências dos valores de relacionamento (R) dentro das agregações de Novo Airão e do Ariaú separadamente, e entre estas agregações.

Na Tabela 6, são mostrados os valores de R calculados para cada par de indivíduos. Os valores em azul claro pertencem a indivíduos considerados irmãos verdadeiros, os valores verdes são indivíduos considerados meio irmãos, e os valores em lilás são indivíduos considerados primos. É possível observar que é encontrado maior relacionamento entre as duas agregações do que dentro delas.

Na Tabela 7, observa-se a matriz de relacionamento gerada pelo programa ML-RELATE, onde para alguns indivíduos podem ser observados dois níveis de relacionamento, pois não foi possível descartar a segunda hipótese.

**Tabela 6** – Valores de R estimados para cada par de indivíduos dentro e entre as agregações, sendo que os indivíduos em azul são pertencentes a Novo Airão, os indivíduos em rosa são pertencentes ao Ariaú, e os valores em azul claro pertencem a indivíduos considerados irmãos verdadeiros, os valores verdes são indivíduos considerados meio irmãos, e os valores em lilás são indivíduos considerados primos.

	Curumin	Fefa	Doidinha	Vi	Dani	Rafinha	Eide	Caua	Lawrence	Ricardo	Julia	Panqueca	Rosa	Curio	Sonso	Stress	Sem nome
	1	2	3	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
1	*																
2	0,49	*															
3	-0,04	0,23	*														
64	-0,06	0,16	0,06	*													
65	-0,01	-0,03	-0,03	-0,05	*												
66	0,18	0,06	0,47	-0,08	-0,09	*											
67	-0,25	0,00	0,03	0,22	0,14	0,18	*										
68	-0,05	0,03	0,14	0,10	-0,27	0,06	-0,19	*									
69	-0,29	-0,05	0,10	-0,40	-0,31	-0,15	-0,15	-0,41	*								
70	0,09	-0,16	0,32	0,14	-0,24	0,39	-0,19	0,24	-0,37	*							
71	-0,01	0,02	0,08	-0,01	-0,06	-0,18	-0,35	-0,39	0,07	-0,34	*						
72	0,41	0,29	0,03	-0,03	-0,02	0,25	-0,17	-0,10	-0,37	-0,03	-0,17	*					
73	0,13	0,25	-0,03	-0,26	-0,11	-0,12	-0,36	-0,28	0,16	-0,16	0,06	-0,10	*				
74	0,23	0,32	0,09	-0,13	-0,12	0,22	-0,12	-0,21	0,15	-0,13	0,39	0,01	0,27	*			
75	0,04	-0,04	-0,28	-0,25	0,06	-0,06	0,02	-0,34	0,02	-0,20	-0,14	-0,02	0,07	0,07	*		
76	0,15	0,19	-0,12	-0,17	-0,09	-0,14	-0,16	-0,25	0,11	-0,14	-0,05	0,46	0,10	0,25	0,08	*	
77	-0,09	0,25	0,31	0,07	-0,13	0,30	0,18	-0,36	0,11	-0,01	0,09	-0,17	-0,28	0,26	-0,21	0,01	*

**Tabela 7** – Matriz de relacionamento gerado pelo programa ML-RELATE, mostrando a relação de parentesco entre os pares de indivíduos, sendo que para alguns a segunda hipótese não pode ser descartada. Observa-se que U (*Unrelated*) são indivíduos não relacionados, HS (*Half-Sibs*) indivíduos meio-irmãos, FS (*Full-Sibs*) irmãos verdadeiros e PO (*Parent/Offspring*) pais e filhotes, entre os indivíduos de Novo Airão, em azul, e Ariaú em vermelho.

	Curumin	Fefa	Doidinha	Vi	Dani	Rafinha	Eide	Caua	Lawrence	Ricardo	Julia	Panqueca	Rosa	Curio	Sonso	Stress	Sem nome
	1	2	3	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
1	*																
2	FS/HS	*															
3	U/HS	U/HS	*														
64	U	U/HS	U/HS	*													
65	U/HS	U	U	U	*												
66	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	*											
67	U	U	U/HS	U/HS	HS/U	HS/U	*										
68	U	U/HS	U/HS	HS/U	U	U/HS	U	*									
69	U	U	U/HS	U	U	U	U/HS	U	*								
70	U/HS	U	HS/U	U/HS	U	HS/U	U	HS/U	U/HS	*							
71	U	U/HS	HS/U	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	HS/U	U/HS	*						
72	U/HS	U/HS	U	U/HS	U	U/HS	U	U/HS	U	U/HS	U/HS	*					
73	U/HS	U/HS	U	U	U	U/HS	U	U/HS	HS/U	U/HS	U/HS	U	*				
74	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	U	U/HS	U	U/HS	U/HS	U/HS	HS/U	U/HS	U/HS	*			
75	U/HS	U	U	U	U/HS	U	U/HS	U	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	*		
76	U/HS	U/HS	U	U	U	U	U	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	FS	U/HS	HS/U	U/HS	*	
77	U	U/HS	HS/U	U/HS	U	PO/FS	U/HS	U	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	U/HS	U	U/HS	*

## 2.4 DISCUSSÃO

Muitas espécies de mamíferos aquáticos têm sido amplamente estudadas com o intuito de avaliar se existe alguma relação de parentesco entre os grupos de migração, alianças ou até mesmo associações de curto período, como já foi visto em baleias Jubarte, *Megaptera novaeangliae* (Valsecchi *et al.*, 2002), em golfinhos nariz de garrafa, *Tursiops truncatus* (Parsons *et al.*, 2003) e em lontras, *Lontra canadensis* (Blundell *et al.*, 2004), entre outros. Esses estudos fornecem informações que não podem apenas ser observadas no campo, e são importantes para que se possa entender a biologia das populações analisadas.

### 2.4.1 Diversidade Genética

Os valores médios de diversidade gênica (0,56),  $H_o$  (0,48) e  $H_e$  (0,57) observados nas agregações de bot-vermelho estudadas, podem ser considerados baixos quando comparados com outros cetáceos, como por exemplo nas populações Jubarte onde foram observados valores maiores de  $H_o$  (0,73) e  $H_e$  (0,73) (Valsecchi *et al.*, 2002). As populações de *Tursiops* da região costeira do Golfo do México foram consideradas com uma baixa heterozigosidade ( $H_o=0,51$  e  $H_e=0,58$ ) (Natoli *et al.*, 2004), valores estes ainda acima dos observados em boto-vermelho. Os resultados observados no presente trabalho podem estar relacionados a um tamanho efetivo de população menor e ser característico da espécie, entretanto uma abordagem em nível macro da região Amazônica é necessária para explicar melhor tal padrão observado.

A análise de variância molecular indicou ausência de estrutura populacional entre as duas agregações. Sabe-se que os valores de  $F_{ST}$  são inversamente proporcionais aos valores de  $Nm$ , ou seja, quanto maior o número de migrantes, os valores de  $F_{ST}$  serão menores indicando intenso fluxo gênico entre populações e ausência de estruturação populacional. Ao passo que, quando observado pequeno número de migrantes conclui-se estar ocorrendo restrito fluxo gênico. O fluxo gênico observado entre as duas agregações é intenso o que sugere que dentro da bacia do Rio Negro podemos estar lidando com uma população panmítica de boto-vermelho. Entretanto, em comparação ao restante dos indivíduos que compõem diferentes localidades da Amazônia alguns de nossos resultados sugerem que os botos do Rio Negro podem possuir um fluxo gênico restrito em relação ao resto da Bacia Amazônica (resultados não mostrados). Tais tendências só poderão ser confirmadas com um número maior de indivíduos de outras localidades da bacia Amazônica.

#### 2.4.2 *Relacionamento*

Durante as coletas havia sido observado nos animais um padrão de marcas de arranhões e dentes ao longo de todo o dorso. Ainda não se sabia qual era o sexo da maioria dos animais, no entanto esses tipos de marcas são característicos de brigas de machos (Martin & da Silva, 2004). Em um trabalho anterior, apenas quatro dos animais de Novo Airão haviam sido sexados pela observação por mergulho, da localização da

abertura genital, constatando que os animais com os nomes de Lawrence, Dani, Curumim e Fefa eram machos (Barezani, 2005).

Martin & da Silva (Martin & da Silva, 2004), descreveram que botos adultos provavelmente não formam nenhum tipo de organização a não ser associações de curto período com outros adultos de ambos os sexos, e mesmo assim continuam com comportamento solitário após a desagregação. Essas associações podem ser observadas em locais de alimentação na natureza por ambos os sexos, o que não ocorre nas agregações artificiais estudadas no presente trabalho, onde só foram observados machos. Apesar de não serem observadas fêmeas nas agregações de Ariaú e Novo Airão, nossos resultados também concordam com a preferência de habitat, observada por Martin & da Silva (Martin & da Silva, 2004), onde os machos são sempre observados em maior número nos canais de grandes rios. Essa diferença se deve ao tipo de agregação formada nas duas localidades, esse tipo de agregação (artificial) se deve ao fato dos animais estarem nestas localidades por estarem recebendo alimento fácil.

Os botos, tanto de Novo Airão quanto do Ariaú, possuem um coeficiente baixo de parentesco dentro das agregações. Isso indica que esses animais não formam grupos unicamente por indivíduos mais aparentados como pode ser observado nas alianças formadas por golfinhos do gênero *Tursiops* (Kriützen *et al.*, 2003; Parsons *et al.*, 2003). A espécie *Tursiops truncatus* é capaz inclusive de reconhecer seus parentes a partir de identificações acústicas específicas (Sayigh *et al.*, 1995).

As agregações de boto-vermelho observadas nas duas localidades amostradas, portanto, não são formadas por indivíduos altamente relacionados como em caso de famílias. Este tipo de resultado confirma a hipótese de que esses animais só se reúnem



neste local, única e exclusivamente para receber alimento fácil, e continuam independentes uns dos outros (solitários no seu estilo de vida). Este tipo de comportamento se iguala as associações de curto-período formadas em locais de alimentação somente para facilitar a captura de peixes como descrito por Martin & da Silva (2004).

Os resultados do presente trabalho indicam que o nível de relacionamento entre os botos que possuem um tipo de agregação mais recente (Ariaú) é um pouco maior do que os botos de uma agregação mais antiga, como é o caso dos botos de Novo Airão que iniciaram este tipo de agregação há oito anos. Neste caso, é possível que o que esteja ocorrendo seja como acontece com algumas espécies de primatas. Estudos com chimpanzés mostraram que as relações de parentesco entre pequenos grupos são bem maiores do que em grupos já estabilizados com maior número de indivíduos (Lukas *et al.*, 2005). Logicamente, os primeiros indivíduos a aparecerem podem ser mais relacionados já que estavam na mesma área, como aconteceu com os indivíduos de Novo Airão, onde os primeiros a aparecerem, Curumin e Fefa (Dona Marilda com. Pessoal), têm um maior nível de relacionamento ( $R=0,49$ ), podendo ser considerados irmãos verdadeiros, como foi confirmado pela análise de seus genótipos.

Para muitos mamíferos, os níveis de relacionamento entre membros de grupos são considerados altos, principalmente quando a dispersão é limitada (Clutton-Brock, 2002). O boto-vermelho nada devagar comparado a outros golfinhos, e os mesmos indivíduos podem ser observados na mesma área por muitos anos (Best & da Silva, 1989), só possuem dispersão limitada por cachoeiras e grandes corredeiras (Best & da Silva, 1993), o que não acontece entre as duas localidades coletadas, que possuem uma distancia

aproximada de 90 km, e que pode ser confirmado pelo alto número de migrantes por geração entre as duas regiões ( $N_m=11$ ). Também pode ser observado que existem mais relações entre as agregações do que dentro das mesmas, ou seja, existe uma relação de parentesco maior entre alguns indivíduos dos dois diferentes agrupamentos, o que sugere novamente que as agregações são formadas unicamente para alimentação (*hand-feeding*).

Também pode ser observado um par considerado pai e filho entre as duas agregações. Os indivíduos Rafinha de Novo Airão e Sem nome do Ariaú possuem um valor de R alto (0,30), mas que não poderiam ser considerados pai e filho e sim um relacionamento entre meio irmãos a irmãos verdadeiros. No entanto pela análise dos genótipos feita pelo programa ML-RELATE estes foram considerados pai e filho.

Em alguns casos existe uma diferença nos resultados dos dois programas utilizados, isso se deve ao tipo de análise feita pelos programas. O KINSHIP procura relações de parentesco a partir das frequências genotípicas observadas em uma população total, enquanto que o ML-RELATE faz comparação entre os genótipos procurando semelhanças entre eles. De qualquer maneira com os dois programas foi possível observar que estas agregações não são formadas totalmente por indivíduos relacionados como já foi dito.

Ainda não existem explicações claras sobre a segregação sexual nos botos, como pode ser observado em outras espécies de cetáceos, onde as fêmeas de cachalote (*Physeter macrocephalus*) são filopátricas e permanecem em grupos de animais relacionados com seus filhotes, e os machos dispersam e nunca são vistos como parte de associações de longo período (Richard *et al.*, 1996a; Lyrholm *et al.*, 1999). Este tipo de filopatria também pode ser observado em golfinhos da espécie *Tursiops truncatus*, onde

foi confirmada a dispersão dos machos e filopatria das fêmeas (Möller & Beheregaray, 2004).

Desta forma é necessário que sejam realizadas mais coletas durante um maior tempo e em mais localidades, as quais englobem a época de reprodução, para que se possa ter certeza de que as fêmeas não são observadas dentro das agregações, já que alguns indivíduos não foram coletados porque não apareceram durante os dias de coleta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos, B.; Barret, J.; Dover, G. 1991. Breeding system and social structure in the Faroese pilot whale as revealed by DNA fingerprinting. *In: Hoelzel, A.R.; Donovan, G.P., (Eds.), Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. International Whaling Commission, Cambridge. London.
- Banguera-Hinestroza, E.; Cardenas, H.; Ruiz-Garcia, M.; Marmontel, M.; Gaitan, E.; Vazquez, R.; Garcia-Vallejo, F. 2002. Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon River dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *J. Hered.*, 93: 312-322.
- Barezani, C.P. 2005. *Conhecimento local sobre o boto-vermelho, Inia geoffrensis (de Blainville, 1817), no Baixo Rio Negro e um estudo de caso de suas interações com humanos*. Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 76 pp.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N.; Bonhomme, F. 2002. *GENETIX 4.03, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bérubé, M.; Palsbøll, P. 1996. Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol. Ecol.*, 5: 283-287.
- Best, R.C.; da Silva, V.M.F. 1989. Biology, Status and Conservation of *Inia geoffrensis* in the Amazon and Orinoco River Basins. *In: Perrin, W.F.; Brownell Jr, R.L.; Kaiya, Z.; Jionkang, L., (Eds.), Biology and Conservation of the River Dolphins*. pp. 23-34.

- Best, R.C.; da Silva, V.M.F. 1993. *Inia geoffrensis*. *Mammalian Species*: 1 - 8.
- Blundell, G.M.; Ben-David, M.; Groves, P.; Bowyer, R.T.; Geffen, E. 2004. Kinship and sociality in coastal river otters: are they related? *Behav. Ecol.*, 15: 705-714.
- Buchanan, F.C.; Friesen, M.K.; Littlejohn, R.P.; Clayton, J.W. 1996. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Mol. Ecol.*: 571-575.
- Caldwell, M.; Gaines, M.S.; Hughes, C.R. 2002. Eight polymorphic microsatellite loci for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Mol. Ecol. Notes*, 2: 393-395.
- Cassens, I.; Vicario, S.; Waddell, V.G.; Balchowsky, H.; Van Belle, D.; Ding, W.; Fan, C.; Mohan, R.S.L.; Simoes-Lopes, P.C.; Bastida, R.; Meyer, A.; Stanhope, M.J.; Milinkovitch, M.C. 2000. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11343-11347.
- Clutton-Brock, T.H. 2002. Breeding together: kin selection and mutualism in cooperative vertebrates. *Science*, 296: 69.
- Connor, R.C.; Richards, A.F.; Smolker, R.A.; Mann, J. 1996. Patterns of female attractiveness in Indian Ocean bottlenose dolphins. *Behaviour*, 133: 37-69.
- Connor, R.C.; Wells, R.S.; Mann, J.; Read, A.J. 2000. The bottlenose dolphin - social relationships in a fission-fusion society. *In*: Mann, J.; Connor, R.C.; Tyack, P.L.; Whitehead, H., (Eds.), *Cetacean Societies*. Chicago University Press. Chicago. pp. 91-126.
- da Silva, V.M. 1990. Botos, mitológicos hóspedes da Amazônia. *In*: As águas da Amazônia. *Ciência Hoje*, 11: 14-18.

- da Silva, V.M.F. 1994. *Aspects of the biology of the Amazonian dolphins genus Inia and Sotalia fluviatilis*. University of Cambridge, Cambridge, 327 pp.
- da Silva, V.M.F. 2002. Amazon River Dolphin, *Inia geoffrensis*. In: Perrin, W.F.; Wursig, B.; Thewissen, J.G.M., (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. London.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, 1: 47-50.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Mol. Ecol. Notes*, 3: 128-130.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília - DF. 220 pp.
- Fitzsimmons, N.N.; Moritz, C.; Moore, S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 432-440.
- Gaggiotti, O.E.; Lange, O.; Rassmann, K.; Gliddon, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol. Ecol.*, 8: 1513-1520.

- Goldstein, D.B.; Schlötterer, C., editors. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York, NY, 352 pp.
- Goodnight, K.F.; Queller, D.C. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Mol. Ecol.*, 8: 1231-1234.
- Guo, J. 2006. River Dolphins Down for the Count, and Perhaps Out. *Science*, 314: 1860.
- Hamilton, H.; Caballero, S.; Collins, A.G.; Brownell Jr, R.L. 2001. Evolution of river dolphins. *Proc. Roy. Soc. London B.*, 268: 549-556.
- Harrison, R.J.; Brownell Jr, R.L.; Boice, R.C. 1972. Reproduction and gonadal appearances in some odontocetes. In: Harrison, R.J., (Ed.), *Functional anatomy of marine mammals*. Academic Press. London and New York. pp. 361-429.
- Kalinowski, S.T.; Wagner, A.P.; Taper, M.L. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 576-579.
- Krützen, M.; Barré, L.M.; Connor, R.C.; Mann, J.; Sherwin, W.B. 2004. "O father: where art thou?" - Paternity assessment in an open fission-fusion society of wild bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. *Mol. Ecol.*, 13: 1975-1990.
- Krützen, M.; Sherwin, W.B.; Connor, R.C.; Barré, L.M.; Van de Castele, T.; Mann, J.; Brooks, R. 2003. Contrasting relatedness patterns in bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) with different alliance strategies. *Proc. Roy. Soc. London B.*, 270: 497-502.
- Krützen, M.; Valsecchi, E.; Connor, R.C.; Sherwin, W.B. 2001. Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. *Mol. Ecol. Notes*, 1: 170-172.

- Lukas, D.; Reynolds, V.; Boesch, C.; Vigilant, L. 2005. To what extent does living in a group mean living with kin? *Mol. Ecol.*, 14: 2181-2196.
- Lyrholm, T.; Leimar, O.; Johannesson, B.; Gyllensten, U.B. 1999. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *Proc. Roy. Soc. London B.*, 266: 347-354.
- Martin, A.R.; da Silva, V.M.F. 2004. River dolphin and flooded forest: seasonal habitat use and sexual segregation of botos (*Inia geoffrensis*) in an extreme cetacean environment. *J. Zool.*, 263: 295-305.
- Martin, A.R.; da Silva, V.M.F. 2006. Sexual dimorphism and body scarring in the boto (Amazon River Dolphin) *Inia geoffrensis*. *Mar. Mammal Sci.*, 22: 22-33.
- Martin, A.R.; da Silva, V.M.F.; Salmon, D.L. 2004. Riverine habitat preferences of botos (*Inia geoffrensis*) and tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) in the Central Amazon. *Mar. Mammal Sci.*, 20: 189-200.
- May-Collado, L.; Agnarsson, I. 2006. Cytochrome b and Bayesian inference of whale phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 38: 344-354.
- Milinkovitch, M.C.; Meyer, A.; Powell, J.R. 1994. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 939-948.
- Möller, L.M.; Beheregaray, L.B. 2004. Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Mol. Ecol.*, 13: 1607-1612.
- Moore, S.S.; Sargeant, L.L.; King, T.J.; Mattick, J.S.; Georges, M.; Hetzel, G.J. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes



- allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10: 654-660.
- Morin, P.A.; Nestler, A.; Rubio-Cisneros, N.T.; Robertson, K.M.; Mesnick, S.L. 2005. Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetacean and other mammals. *Mol. Ecol.*, 14: 3275-3286.
- Natoli, A.; Peddemors, V.M.; Hoelzel, A.R. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *J. Evol. Biol.*, 17: 363-375.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, NY. 512 pp.
- Neigel, J.E. 2002. Is Fst obsolete? *Conserv. Gen.*, 3: 167-173.
- Nikaido, M.; Rooney, A.P.; Okada, N. 1999. Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10261-10266.
- Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.*, 4: 347-354.
- Palsbøll, P.J.; Vader, A.; Bakke, I.; El-Gewely, M.R. 1992. Determination of gender in cetacean by the polymerase chain reaction. *Can. J. Zool.*, 70: 2166-2170.
- Parsons, K.M.; Durban, J.W.; Claridge, D.E.; Balcomb, K.C.; Noble, L.R.; Thompson, P.M. 2003. Kinship as a basis for alliance formation between male bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the Bahamas. *Anim. Beh.*, 66: 185-194.

- Pilleri, G.; Gahr, M. 1977. Observations on the Bolivian, *Inia boliviensis*, (D'Orbigny, 1834) and the Amazonian bufeo, *Inia geoffrensis* (Blainville, 1817), with a description of a new subspecies (*Inia geoffrensis humboldtiana*). *Invest. Cetacea*, 8: 11-76.
- Pusey, A.E.; Packer, C. 1987. Dispersal and philopatry. *In*: Smuts, B.B.; Cheney, D.L.; Seyfarth, R.M.; Wrangham, R.W.; Struhsaker, T.T., (Eds.), *Primate Societies*. University of Chicago Press. Chicago. pp. 250-266.
- Queller, D.C.; Strassmann, L.E.; Hughes, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.*, 8: 285-288.
- Rice, D.W. 1998. *Marine mammals of the world. Systematics and distribution*. The Society for Marine Mammalogy
- Richard, K.R.; Dillon, M.C.; Whitehead, H.; Wright, J.M. 1996a. Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8792-8795.
- Richard, K.R.; McCarry, S.W.; Wright, J.M. 1994. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Can. J. Zool.*, 72: 873-877.
- Richard, K.R.; Whitehead, H.; Wright, J.M. 1996b. Polymorphic microsatellites from the sperm whale and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin. *Mol. Ecol.*, 5: 313-315.
- Rohrer, G.A.; Alezander, L.J.; Keele, J.W.; Smith, T.P.; Beattie, C.W. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*, 136: 231-245.

- Rosel, P.E. 2003. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conserv. Gen.*, 4: 647-649.
- Rosel, P.E.; Forgetta, V.; Dewar, K. 2005. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mol. Ecol. Notes*, 5: on line.
- Sayigh, L.S.; Tyack, P.L.; Wells, R.S.; Scott, M.D.; Irvine, A.G. 1995. Sex differences in signature whistle production of free-ranging bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 36: 171-177.
- Schlötterer, C.; Amos, W.; Tautz, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354: 63-65.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.*, 18: 233-234.
- Secchi, E.R.; Ott, P.H.; Danilewics, D. 2002. Report of the Fourth Workshop for the Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western South Atlantic. *LAJAM*, 1: 11-17.
- Shinohara, M.; Domingo-Roura, X.; Takenaka, O. 1997. Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *Mol. Ecol.*: 695-696.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Small, M.P.; Beacham, T.D.; Withler, R.E.; Nelson, R.J. 1998. Discrimination coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) population within the Fraser River, British Columbia, using microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.*, 7: 141-155.

- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17: 6463-6471.
- Tautz, D.; Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, 12: 4127-4138.
- Tiedemann, R.; Olivier, H.; Vekemans, X.; Milinkovitch, M.C. 2000. Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. *Mol. Ecol.*, 9: 1159-1163.
- Valsecchi, E.; Hale, P.; Corkeron, P.; Amos, W. 2002. Social structure in migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Mol. Ecol.*, 11: 507-518.
- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dC-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.
- Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates. Sunderland, MA
- Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 2. The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press. Chicago, IL
- Yang, G.; Zhou, K.; Ren, W.; Ji, G.; Liu, S. 2002. Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome-b gene sequences. *Mar. Mammal Sci.*, 18: 20-29.