



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Instituto de Biologia

Teresa Elisa Clemente dos Santos

Estrutura social do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na Baía de Guanabara (RJ)

Rio de Janeiro

2015

Teresa Elisa Clemente dos Santos

Estrutura social do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na Baía de Guanabara (RJ)

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, modalidade Biodiversidade e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Haydée Andrade Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre de Freitas Azevedo

Rio de Janeiro

2015

Teresa Elisa Clemente dos Santos

Estrutura social do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na Baía de Guanabara (RJ)

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, modalidade Biodiversidade e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aprovada em

Prof^a. Dr^a. Haydée Andrade Cunha
Faculdade de Oceanografia - UERJ

Prof. Dr. Antonio Mateo Solé-Cava
Instituto de Biologia – UFRJ

Prof. Dr. José Lailson Brito Junior
Faculdade de Oceanografia – UERJ

Prof^a. Dr^a. Maja Kajin
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos botos que tão bravamente lutam dia após dia pela sobrevivência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me fortalecido nos momentos mais obscuros, pela inspiração constante, pela sabedoria e pela oportunidade de poder me dedicar e me aprofundar em uma atividade que gosto.

À Haydée, por me guiar e orientar durante todo o percurso de maneira sempre carinhosa e afetuosa.

Ao Alexandre, Zé e Tati pela oportunidade de fazer parte desse projeto, por compartilharem conhecimento e amor aos botos.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e à equipe do Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) pela coleta das amostras. Agradeço ainda ao MAQUA-UERJ pela forma acolhedora que me recebeu, especialmente, à Fernanda, pela parceria e ajuda constante, ao Neto, pelo auxílio com as análises de idade e ao Rafael, pela ajuda na elaboração de mapas e trocas imprescindíveis acerca da Ecologia desses animais e, ainda, aos amigos de bancada, Carol, Dayse, Ana Alice, Luisa e Carlos por momentos inspiradores e divertidos.

Ao Solé, ao Cris e a todos do Laboratório de Biodiversidade Molecular (LBDM), por toda a contribuição científica e logística, visto que parte das genotipagens foram conduzidas no LBDM. Agradeço ainda, em especial, à Ghennie, pelas dicas sempre excelentes, à Nury, pelo apoio frequente, e à Lívia e Elisa, pelo companheirismo e muitas risadas.

Ao Rodolpho Albano e ao Laboratório de Genoma (UERJ), em especial, à Denise pela paciência e dedicação. O Laboratório de Genoma (UERJ) realizou também genotipagens para esse projeto.

À APA Guapimirim pela ajuda na pesquisa e na proteção aos botos da Baía de Guanabara.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro, por meio do Edital Universal MCT/CNPq (processo 14/2010 483110/2010-8).

Aos amigos da UERJ, da UFRJ e da vida, por toda a compreensão, motivação e paciência, em especial, à Ilana, amiga e sócia, por incentivar sempre meu crescimento.

À Lena, madrinha e amiga, que muitas vezes acredita mais em mim do que eu mesma.

À Ana, irmã, amiga, companheira, parceira e tantas outras qualificações, todas cheias de amor, admiração e apoio incondicionais.

À Rita, mãe, amiga e guerreira. Agradeço por ser minha fonte de inspiração, meu alicerce e por sempre comprar meus sonhos como se fossem seus.

“Até que o sol não brilhe, acendamos uma vela na escuridão.”

Confúcio

RESUMO

Dos SANTOS, Teresa Elisa Clemente. **Estrutura social do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na Baía de Guanabara (RJ)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biologia Evolutiva) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, 2015.

A Baía de Guanabara, localizada na costa centro-sul do Rio de Janeiro, abriga uma população residente de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) que se encontra em alarmante declínio populacional. Apesar de ser uma espécie ameaçada, dados acerca da sua diversidade genética em microescala geográfica e no nível populacional ainda são escassos. O objetivo desse estudo foi investigar a estrutura social e analisar a diversidade genética da população de botos-cinza da Baía de Guanabara (BG), comparando com animais de áreas adjacentes (AA) na costa do Rio de Janeiro. Como objetivo específico, testamos a hipótese de filopatria natal de fêmeas em *S. guianensis*. Foram utilizadas 62 amostras provenientes de encalhe (N = 58) e biopsia (N = 4), sendo 50 de indivíduos da Baía de Guanabara e 12 de animais de áreas adjacentes (Rio das Ostras, Restinga da Marambaia, Praia da Reserva, Niterói, Barra da Tijuca, Barra de Guaratiba e Leme). As amostras foram coletadas entre 1994 e 2013. Foram utilizados 12 loci de microssatélites específicos. Onze marcadores e 39 amostras (BG = 30; AA = 9) que tiveram taxa de amplificação superior a 50% compuseram o conjunto final de dados. O tamanho populacional efetivo (N_e) foi estimado em 4 indivíduos (2,2-10,4; IC 95%). O teste específico não detectou sinais de gargalo populacional, mas a janela de detecção deste método é anterior a 1951. Os níveis de diversidade genética foram menores na Baía de Guanabara (BG – heterozigosidade observada (H_o): 0,249; heterozigosidade esperada (H_e): 0,344; AA – H_o : 0,353 e H_e : 0,513). Déficit de heterozigotos foi identificado nas duas localidades, com F_{IS} significativo (BG: 0,336; AA: 0,280, $p < 0,002$), o que sugere endocruzamento relevante na BG e efeito *Wahlund* na AA. A diferenciação genética da população da BG foi indicada a partir de uma análise de agrupamento Bayesiana e do índice de estruturação ($F_{ST} = 0,040$, $p = 0,049$). Os resultados das análises de parentesco revelaram que indivíduos da BG apresentam alto grau de parentesco. Além disso, fêmeas da BG são mais relacionadas geneticamente do que machos. Entre as fêmeas, adultas e juvenis configuram o grupo com maior grau de parentesco, enquanto entre díades de machos-machos os mais aparentados foram filhotes e juvenis. Nas díades formadas por fêmeas e machos, fêmeas adultas e filhotes machos são os mais aparentados. Tais achados apoiam a hipótese de filopatria das fêmeas de *S. guianensis*. Os resultados chamam atenção para a necessidade da criação de medidas que permitam o crescimento populacional na Baía de Guanabara, diminuindo a mortalidade e favorecendo a imigração, tornando tais taxas mais próximas às naturais.

Palavras-chave: Microssatélites; Organização social; Parentesco; Filopatria.

ABSTRACT

Dos SANTOS, Teresa Elisa Clemente. **Social structure of the Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) in the Guanabara Bay (RJ)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biologia Evolutiva) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, 2015.

In Guanabara Bay, located at the south-central coast of Rio de Janeiro state, a resident population of Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) faces an alarming declining rate. Despite being an endangered species, data on the genetic diversity of *S. guianensis* in micro-geographical scale are still scarce. The purpose of this study was to investigate the social structure and analyze the genetic diversity of Guiana dolphins in Guanabara Bay (GB), comparing them with animals from adjacent areas (AA) on the coast of Rio de Janeiro. The specific goal was to test the hypothesis of natal site philopatry in *S. guianensis* females. Sixty-two stranding (N = 58) and biopsy (N = 4) samples were used, of which 50 were from Guanabara Bay individuals and 12 were from adjacent areas (Rio das Ostras, Restinga da Marambaia, Praia da Reserva, Niterói, Barra da Tijuca, Barra de Guaratiba and Leme). Samples were collected between 1994 and 2013. Twelve specific microsatellite loci were genotyped. Eleven markers and 39 samples (BG = 30; AA = 9) which had genotyping rates over 50% composed the final data set. Effective population size (N_e) was estimated as 4 individuals (2.2-10.4; 95% CI). No evidence of bottleneck was found using a specific test, but the detection window for this method ended in 1951. Genetic diversity levels were lower in Guanabara Bay (GB - observed heterozygosity (H_o): 0.249; expected heterozygosity (H_e): 0.344; AA - H_o : 0.353 and H_e : 0.513). Heterozygote deficit was identified in both areas, with significant F_{IS} (BG: 0.336; AA: 0.280, $p < 0.002$), suggesting pronounced inbreeding in GB and possibly a *Wahlund* effect in AA. Genetic differentiation of the GB population was indicated by Bayesian clustering analysis and the fixation index ($F_{ST} = 0.040$, $p = 0.049$). Relatedness analyses revealed that GB individuals have a high degree of kinship. In addition, GB females are genetically more related than males. Among females, adults and juveniles are the group with the highest degree of relatedness, while among male-male dyads the most related were calves and juveniles. In female-male dyads, female adults and male calves were the most related. These findings support the hypothesis of female philopatry in *S. guianensis*. The results highlight the urgency of establishing measures that allow for population growth, by reducing mortality and enabling immigration, bringing those rates closer to natural levels.

Keywords: Guiana dolphin; Microsatellite; Social structure; Kinship, Relatedness; Philopatry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	<i>Sotalia guianensis</i> na Baía de Guanabara.....	17
Figura 2–	Distribuição de <i>S. guianensis</i>	18
Figura 3–	Localização da Baía de Guanabara, área de estudo do presente.....	20
Figura 4–	Locais onde as carcaças de botos-cinza (<i>S. guianensis</i>) foram coletadas na Baía de Guanabara (RJ), entre 1994 e 2013. As amostras estão numeradas seguindo a Tabela 2. Os tamanhos dos círculos verdes são proporcionais ao número de amostras coletadas em cada ponto de coleta.....	36
Figura 5–	Locais onde as carcaças de botos-cinza (<i>S. guianensis</i>) foram coletadas fora da Baía de Guanabara (RJ), entre 1994 e 2013. As amostras estão numeradas seguindo a Tabela 2. Os tamanhos dos círculos vermelhos são proporcionais ao número de amostras coletadas em cada ponto de coleta.....	37
Figura 6–	Painéis com tamanho dos alelos em cada locus de microsatélite, desenvolvidos especificamente para <i>S. guianensis</i> por CUNHA e WATTS (2007), e respectivos fluorocromos (VIC, PET, NED e 6-Fam) que foram utilizados neste trabalho.....	42
Figura 7–	Síntese das etapas metodológicas executadas no presente trabalho para a obtenção dos dados genéticos das 62 amostras de <i>S. guianensis</i> coletadas entre 1994 e 2013 na Baía de Guanabara e nas áreas adjacentes.....	46
Figura 8–	Estado de conservação de carcaças de botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) coletadas na Baía de Guanabara e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013, seguindo os códigos de Geraci e Lounsbury (1993).....	47
Figura 9–	Classes etárias dos botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) da Baía de Guanabara e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013.....	48

Figura 10–	Sexo dos botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) da Baía de Guanabara (a) e áreas adjacentes (b), entre 1994 e 2013.....	49
Figura 11–	Classe etária dos botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) da Baía de Guanabara e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013, utilizados para as análises finais (N = 39).....	51
Figura 12–	Frequências de homozigotos na Baía de Guanabara para os loci de microssatélites específicos para <i>S. guianensis</i> : sgui003; sgui005; sgui011; sgui014 e sgui016. O x indica valor observado para cada alelo, e a barra vermelha a faixa de frequência esperada (Intervalo de confiança de 95%).....	56
Figura 13–	Logaritmo de Probabilidade Posterior (LnP(D) da análise de agrupamento para cada K mostrando o número de populações mais provável (K = 2).....	57
Figura 14–	Valores de Q da análise de atribuição considerando K = 2 e com informação a priori sobre a origem das amostras. Cada cor representa uma população. O gráfico representa uma compilação de dez iterações independentes. A seta indica a amostra da Baía de Guanabara com Q _{vermelho} médio inferior a 50%.....	58
Figura 15–	Índices de parentesco médios calculados entre todos os botos-cinza das áreas adjacentes (AA) e Baía de Guanabara (BG); dentro das áreas adjacentes e dentro da Baía de Guanabara. A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).....	61
Figura 16–	Índices de parentesco médios de botos-cinza da Baía de Guanabara, comparando díades só de machos (MxM), só de fêmeas (FxF) e de fêmea e macho (FxM). A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).....	62
Figura 17–	Índices de parentesco médios calculados apenas com botos-cinza das áreas adjacentes, comparando díades só de machos (MxM), só de fêmeas (FxF) e de fêmea e macho (FxM). A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).....	62

Figura 18–	Análise de parentesco de botos-cinza da Baía de Guanabara e áreas adjacentes: (a) entre os machos; (b) entre as fêmeas e (c) entre fêmeas e machos. A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).....	63
Figura 19–	Valores médios de r gerados para parentesco de botos-cinza (<i>Sotalia Guianensis</i>) nas áreas adjacentes (AA) e dentro da Baía de Guanabara (BG). Em (a), valores individuais em cinza e pontos azuis representando médias (AA = 0,056; BG = 0,189); (b) intervalos de confiança a partir de desvio padrão combinado (0,046) e (c) intervalo de confiança que mostra a média de BG menos a média de AA.....	64
Figura 20–	Análise de parentesco de botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) da Baía de Guanabara por classe etária a partir da comparação de díades de filhotes (fi), adultos (adu) e juvenis (juv) exclusivas e misturadas: (a) entre os machos; (b) entre as fêmeas e (c) entre fêmeas e machos. No gráfico (c), fêmeas (F) e machos (M) foram discriminados nas análises em classes etárias diferentes. A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).....	65
Figura 21–	Valores médios de r gerados para parentesco de botos-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) em grupos organizados por sexo (machos vs. machos; fêmeas vs. Fêmeas e fêmeas vs. machos) para díades definidas por classe etária: filhote vs. filhote (fixfi); filhote vs. juvenis (fixjuv); filhotes vs. adultos (fixadu); adulto vs. adultos (aduxadu); adulto vs. juvenis (aduxjuv) e juvenis vs. juvenis (juvxjuv). Valores individuais em cinza e pontos azuis representando médias (fixjuv = 0,224; aduxadu = 0,251; juvxjuv = 0,192; fixfi = 0,142; aduxjuv = 0,219 e aduxfi = 0,171) e entre parênteses número de díades comparadas dentro de cada categoria.....	66

Figura 22– Valores médios de r gerados para parentesco de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em grupos organizados por sexo (machos vs. machos; fêmeas vs. Fêmeas e fêmeas vs. machos) para díades definidas por classe etária: filhote vs. filhote (fixfi); filhote vs. juvenis (fixjuv); filhotes vs. adultos (fixadu); adulto vs. adultos (aduxadu); adulto vs. juvenis (aduxjuv) e juvenis vs. juvenis (juvxjuv). Em (a), intervalos de confiança a partir de desvio padrão combinado (0,075) e (b) intervalo de confiança que mostra a média de cada díade menos a média de outra díade.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Índices de parentesco (r).....	29
Tabela 2–	Local, ano de coleta, sexo e faixa etária das amostras de <i>S. guianensis</i> na baía de Guanabara (RJ) e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013.....	34
Tabela 3–	Descrição das sequências dos iniciadores que foram utilizados na sexagem molecular das amostras de <i>S. guianensis</i> que não puderam ter o sexo determinado a partir de análise da morfologia externa.....	39
Tabela 4–	Sequências dos 12 loci de microssatélites polimórficos específicos para <i>S. guianensis</i> utilizados no presente estudo e desenvolvidos por Cunha e Watts (2007).....	40
Tabela 5–	Temperatura de anelamento (T_a) ótima verificada para cada um dos 12 locus de microssatélites desenvolvidos especificamente para <i>S. guianensis</i> por CUNHA e WATTS (2007) na primeira (1) e na segunda (2) etapa de otimização executada nesse trabalho.....	41
Tabela 6–	Novas concentrações de $MgCl_2$ ($[MgCl_2]$) e volume final de DNA (V_f DNA) e diluição usados no protocolo novo de ciclagem dos locus de microssatélites desenvolvidos especificamente para <i>S. guianensis</i> por CUNHA e WATTS (2007).....	43
Tabela 7–	Condições otimizadas da terceira amplificação executada nesse trabalho para os locus de microssatélites específicos para <i>S. guianensis</i> que foram desenvolvidos por CUNHA e WATTS (2007).....	44
Tabela 8–	Percentual (%) de loci de microssatélites específicos para <i>S. guianensis</i> (CUNHA e WATTS, 2007) amplificados para amostra total ($N = 62$) e para amostras com taxa de sucesso igual ou superior a 50% ($N = 39$).....	50

Tabela 9–	Riqueza alélica de microssatélites específicos para <i>S. guianensis</i> (CUNHA e WATTS, 2007) por locus (N = 11) e por população (áreas adjacentes e Baía de Guanabara).....	51
Tabela 10–	Frequências alélicas para os 11 loci para áreas adjacentes (AA) e Baía de Guanabara (BG).....	52
Tabela 11–	Heterozigosidades médias observadas (H_o) e esperadas (H_e) na Baía de Guanabara, BG; áreas adjacentes, AA; Baía de Sepetiba, BS; Baía de Ilha Grande, BIG; Pará, PA; Ceará, CE; Rio Grande do Norte, RN; Bahia, BA, Espírito Santo, ES; Rio de Janeiro, RJ, São Paulo, SP; Paraná, PR; Santa Catarina, SC para <i>S. guianensis</i> .	53
Tabela 12–	Valores de Heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o); F_{IS} e de P no teste de Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (EHW) para cada locus de microssatélites e localidades de <i>S. guianensis</i> avaliadas no presente estudo.....	54
Tabela 13–	Teste de Equilíbrio de ligação entre todos os loci de microssatélites específicos para <i>S. guianensis</i> (CUNHA e WATTS, 2007) baseado em 1100 permutações. P ajustado para 5%.....	55
Tabela 14–	Coeficientes Q das populações vermelha e verde para cada indivíduo. Indivíduos codificados como MQ e BG foram coletados na Baía de Guanabara, os demais (AA) nas áreas adjacentes. Os códigos AA também representam amostras MQs....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	<i>Sotalia guianensis</i> (van BÉNÉDEN, 1864).....	17
1.2	Baía de Guanabara (RJ)	20
1.3	A população de botos-cinza da Baía de Guanabara	22
1.4	Estrutura social	25
1.5	Comportamento cooperativo e estrutura social de <i>S. guianensis</i>	27
1.6	Relações de parentesco	28
1.7	Filopatria	29
1.8	Estruturação populacional	30
1.9	Microssatélites	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Geral	33
2.2	Específico	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Origem das amostras	34
3.2	Determinação do estado de conservação, da classe etária e do sexo	38
3.3	Extração de DNA	38
3.4	Sexagem molecular	39
3.5	Microssatélites	40
3.6	Análise dos dados	44
4	RESULTADOS	47
4.1	Características das amostras	47
4.1.2	Conjunto de dados final usado nas análises.....	50
4.2	Análises genéticas	51
4.2.1	Diversidade genética.....	51

4.2.2	Equilíbrios de <i>Hardy-Weinberg</i> (EHW) e de ligação.....	54
4.2.3	Teste de alelos nulos.....	55
4.2.4	Análises de estruturação populacional.....	57
4.2.5	Tamanho populacional efetivo (N_e) e investigação de gargalo populacional.....	60
4.2.6	Análises de parentesco.....	60
5	DISCUSSÃO	68
5.1	Variabilidade genética: baixa riqueza alélica e diversidade	68
5.2	Déficit de heterozigotos: endocruzamento	70
5.3	Diferenciação genética: evidências a partir da análise Bayesiana de agrupamento e atribuição e do F_{ST}	73
5.4	Tamanho populacional efetivo e teste de gargalo populacional	76
5.5	Análises de parentesco	81
5.6	Evidências de filopatria das fêmeas	83
5.7	Relevância para a Conservação	88
6	CONCLUSÃO	89
7	REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

O boto-cinza (*Sotalia guianensis*) é um pequeno cetáceo da família Delphinidae. Em função dos hábitos costeiros e estuarinos, o boto-cinza (FIGURA 1) é encontrado em áreas próximas de centros urbanos, o que o torna vulnerável a diversas ameaças, como perda e degradação de habitat, capturas acidentais em atividades de pesca, colisão com embarcações e poluição química e sonora (Da SILVA e BEST, 1996; CUNHA *et al.*, 2010). Na Baía de Guanabara (RJ), estudos de longo prazo usando a ferramenta de fotoidentificação revelaram uma população local residente (AZEVEDO *et al.*, 2004), que tem sofrido forte decréscimo populacional.

Embora ao longo da distribuição na costa do Brasil a espécie tenha parâmetros de sua biologia e ecologia pouco conhecidos, a vulnerabilidade da espécie foi reconhecida e na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção de 2014, organizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), a espécie foi classificada como “vulnerável”.

O boto-cinza é uma espécie gregária que forma preferencialmente grupos de dois a 50 indivíduos (AZEVEDO *et al.*, 2009a). A estrutura social é um aspecto pouco estudado da espécie e, até o momento, apenas um estudo utilizou dados genéticos para investigar a organização social do boto-cinza. CUNHA (2007) utilizou microsatélites para analisar as relações de parentesco entre 18 indivíduos da Baía de Guanabara. A partir dos resultados dessas e outras análises, a autora levantou a hipótese de que, assim como na maioria dos mamíferos, as fêmeas de *S. guianensis* seriam o sexo filopátrico, enquanto os machos dispersariam (CUNHA, 2007).

Nesse sentido, os botos da Baía de Guanabara representam uma oportunidade única para compreender melhor a estrutura social da espécie e testar a hipótese de filopatria das fêmeas, pois constituem uma população pequena, residente e sistematicamente monitorada nos últimos 20 anos.

A avaliação da diversidade genética dessa população e o estudo de sua estrutura social são importantes para estimar o risco de extinção do boto-cinza na Baía de Guanabara e em outros lugares onde existem populações locais residentes da espécie. Essas informações poderão ser usadas futuramente para a elaboração de planos de conservação que possam ajudar a preservar essas populações locais, garantindo, por exemplo, a integridade do núcleo

de fêmeas da região e avaliando a viabilidade da criação de possíveis corredores que permitam que os machos continuem alcançando as fêmeas.

Os microssatélites foram as ferramentas moleculares utilizadas para execução desta dissertação. Esses marcadores hipervariáveis e de herança biparental permitem a análise individual e familiar, além de possibilitarem análises multilocus, garantindo maior resolução e confiabilidade.



Figura 1: *Sotalia guianensis* na Baía de Guanabara. Fonte: MAQUA-UERJ

1.1 *Sotalia guianensis* (van Bénédén, 1864)

A taxonomia infragenérica de *Sotalia*, odontocetos membros da família Delphinidae, foi alvo de questionamentos por um longo período, mas, na última década, estudos morfológicos (MONTEIRO-FILHO *et al.*, 2002) e genéticos (CUNHA *et al.*, 2005; CABALLERO *et al.*, 2007) foram determinantes para o reconhecimento de duas espécies: *Sotalia fluviatilis* (GERVAIS, 1853) e *Sotalia guianensis* (VAN BÉNÉDEN, 1864). Enquanto, no Brasil, a primeira é endêmica da Bacia Amazônica, a última habita o ambiente marinho.

Sotalia guianensis, vulgarmente conhecido como boto-cinza, ocorre ao longo da costa atlântica das Américas Central e do Sul, sendo encontrado de Honduras até o estado de Santa Catarina, na Região Sul do Brasil (Da SILVA *et al.*, 2010) (FIGURA 2). Ao longo de sua distribuição, o boto-cinza ocorre principalmente em estuários abrigados, baías e desembocaduras de grandes rios (Da SILVA e BEST, 1996).



Figura 2: Distribuição de *S. guianensis*. Fonte: (CUNHA *et al.*, 2010).

Entre as principais características morfológicas de *S. guianensis*, estão a presença de um rostro relativamente longo e estreito, nadadeira dorsal baixa e triangular e nadadeiras peitorais grandes. Os animais dessa espécie possuem dorso cinza escuro e a região ventral em tons cinza claro, branco ou rosado, e uma faixa lateral pouco desenvolvida que se estende do olho à nadadeira peitoral (JEFFERSON *et al.*, 1993).

O tamanho corporal máximo é 206 cm (Da SILVA e BEST, 1996), mas, em média, indivíduos adultos dessa espécie apresentam cerca de 190 cm. Já os filhotes nascem medindo entre 90,2 cm (RAMOS, 1997) e 106 cm (RAMOS *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003), após uma gestação de onze a doze meses (RAMOS, 1997). A lactação, por sua vez, dura cerca de nove meses (RAMOS, 1997; ROSAS e MONTEIRO-FILHO 2002).

O boto-cinza pode viver até 35 anos de idade (RAMOS, 1997; ROSAS, 2000; SANTOS *et al.*, 2003). A maturidade sexual ocorre com pouco mais de seis anos (RAMOS, 1997), e não há dimorfismo sexual aparente.

S. guianensis é uma espécie gregária que forma preferencialmente grupos de dois a 50 indivíduos (AZEVEDO *et al.*, 2009a), embora estudos já tenham revelado agregações com

mais de 150 membros (FLORES, 2002). Atualmente, os padrões de organização social ainda não são conhecidos, mas se observa que os grupos normalmente são compostos por indivíduos de todas as faixas etárias (adultos, jovens e filhotes) (Da SILVA e BEST, 1996; FLORES, 2002).

Tal como outros odontocetos, *S. guianensis* utiliza sons para se comunicar, bem como para funções relacionadas à navegação. Esses sons podem ser divididos em duas categorias: pulsados e tonais (POPPER, 1980; RICHARDSON *et al.*, 1998). Os assobios são caracterizados como sons tonais e são um mecanismo importante de comunicação subaquática (TYACK, 1998). Cada espécie de odontoceto apresenta particularidades nos padrões de comunicação. O boto-cinza apresenta um repertório variado de assobios. Segundo estudo de Azevedo e Van Sluys (2005), esses assobios são simples quanto à forma e aqueles com nenhum ou um ponto de inflexão são os mais abundantes. No mesmo estudo, os autores identificaram alta variabilidade intraespecífica tanto na duração quanto nos pontos de inflexão, o que pode ser resultado de uma modulação que reflita aspectos relacionados tanto ao contexto quanto ao próprio indivíduo (AZEVEDO e VAN SLUYS, 2005).

O fato desses animais permanecerem submersos a maior parte do tempo é uma característica que tem dificultado estudos baseados em observação. No entanto, a partir de 1990, pesquisas nessa área começaram a se tornar cada vez mais frequentes. A fotoidentificação, técnica que possibilita reconhecer indivíduos a partir de marcas naturais (WÜRSIG e JEFFERSON, 1990; DEFRAN *et al.*, 1990 e WELLS e SCOTT, 1990), é uma estratégia que vem sendo usada para o monitoramento de populações de boto-cinza e que tem ajudado a compreender aspectos ecológicos da espécie (PIZZORNO *et al.*, 1995; CUNHA, 1999; CUNHA *et al.*, 1999; FLORES, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; ANAMIAS, 2006; SANTOS e ROSSO, 2007; ROSSI-SANTOS *et al.*, 2007; ZAPPES *et al.*, 2010; MAGNANI, 2011; CAMPOS, 2012; SCHULZE, 2012).

Estudos empregando a fotoidentificação vêm sendo realizados desde 1995 na Baía de Guanabara. As informações obtidas a partir do monitoramento de longo prazo revelaram que essa baía abriga uma população de *S. guianensis* residente (AZEVEDO *et al.*, 2004).

1.2 Baía de Guanabara (RJ)

Localizada na porção centro-sul do Estado do Rio de Janeiro ($22^{\circ}50' S$; $43^{\circ}10' W$), a Baía de Guanabara apresenta superfície total de 381km^2 e um espelho d'água de 328km^2 (Rio de Janeiro, 2001), sendo a segunda maior baía do litoral brasileiro (FIGURA 3) (KJERFVE *et al.*, 1997; SEMADS, 2001).

Com comprimento total norte-sul de 28 km e largura máxima (leste-oeste) de 27 km, apresenta uma extensão de 1,8 km de largura em sua entrada (CARVALHO, 2013). Quanto à profundidade, a média observada é de 5,7 m, mas na região do canal central esse valor passa para 20 m, podendo alcançar um máximo de até 50 m na entrada da baía (COSTA, 1998; SEMADS, 2001).

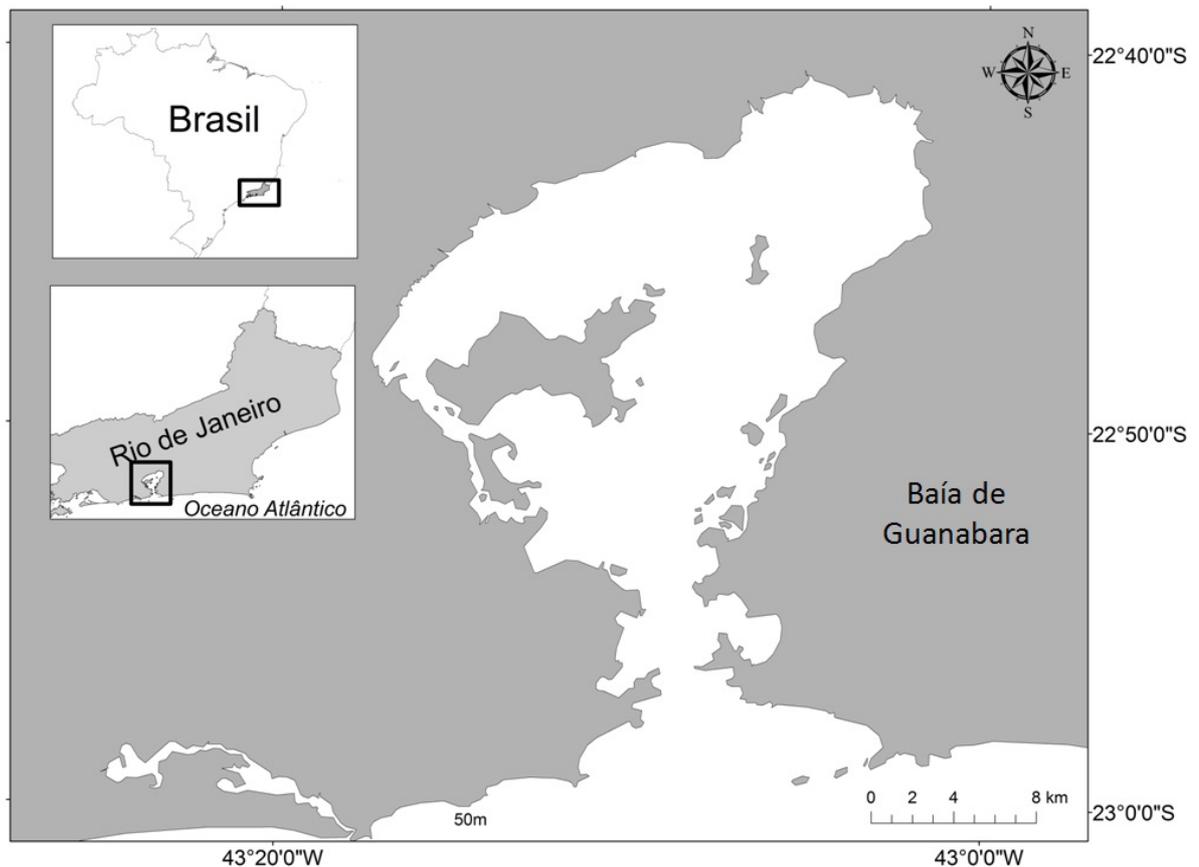


Figura 3: Localização da Baía de Guanabara, área de estudo do presente trabalho.

Trinta e cinco rios contribuem para a composição desse sistema que atinge um volume total de água estimado de 2×10^9 L (MAYR *et al.*, 1989) e possui características de estuário. Sua complexidade merece destaque, em função da grande variabilidade ambiental devido ao gradiente de salinidade, variações da altura da lâmina d'água e pelo padrão de circulação de marés (AMADOR, 1997). Além disso, há a presença de vários ecossistemas periféricos como mangues, lagunas, brejos, pântanos, mata atlântica, costões rochosos, praias arenosas e rios (CARVALHO, 2013).

A região hidrográfica da Baía de Guanabara tem 4081 km^2 e abriga 25 bacias e sub-bacias. Essas, por sua vez, acabam transportando a maior parte da poluição gerada no continente para a baía (SEMADS, 2001). Segundo estudos de Amador (1997) e Valentim e colaboradores (1999), a Baía de Guanabara atualmente é considerada um dos sistemas estuarinos mais degradados da costa brasileira. Boa parte dessa degradação é consequência de estar circundada pela Região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro que engloba 21 municípios. Isso significa que cerca de 11 milhões de habitantes residem no entorno da Baía de Guanabara e que aproximadamente 14 mil indústrias operam nessa região (MENICONI *et al.*, 2012). Estima-se que essa população de cerca de 11 milhões produz esgoto doméstico que gera diariamente uma carga de 470 t de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (FEEMA, 1990, 1998). Quanto às atividades econômicas, estudo de Magrini e Santos (2001) listam a presença de dois portos comerciais, diversos estaleiros, duas refinarias de petróleo, 14 terminais marítimos de carga e descarga de produtos oleosos, mais de 1.000 postos de combustíveis, além da instalação mais recente de um Terminal de Regaseificação de GNL (gás natural líquido), um gasoduto e o Complexo Petroquímico do Rio de Janeiro (COMPERJ). Toda essa atividade antrópica na região resulta no lançamento diário de 10,9 Kg de metais pesados e 343 Kg de óleo dentro da Baía de Guanabara (KJERFVE *et al.*, 1997 e PERIN *et al.*, 1997).

Quanto às atividades pesqueiras, há trabalhos que apontam que haja cerca de cinco mil (BARROSO, 1997) até 18 mil (CIDS, 2000) pescadores atuantes na região da Baía de Guanabara, o que representaria uma produção pesqueira de aproximadamente 13 toneladas por dia. Esse valor parece ainda estar subestimado. Um estudo de Jablonski e colaboradores (2006) aponta que, entre abril de 2001 e março de 2002, a produção de pescado registrada na Baía de Guanabara atingiu mais de 19.000 t, correspondendo a US\$ 4,8 milhões. Sardinha boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) e sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) foram as espécies dominantes entre os pequenos pelágicos, enquanto corvina (família *Sciaenidae*),

tainha (família *Mugilidae*) e bagres (ordem Siluriformes) prevalecem entre os demersais mais pescados. As redes de emalhe, de arrasto, de cerco e tarrafas são as mais utilizadas entre os pescadores artesanais da Baía de Guanabara. Já, entre as linhas, destacam-se as de fundo e superfície, espinhéis, garatéia e zangareio. A captura acidental em redes de emalhe representa um problema para vários táxons marinhos (CHAN *et al.*, 1988; NORMAN, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2003; BAKER e WISE, 2005). Especialmente para os golfinhos, esse tipo de acidente se revela preocupante, pois tem sido registrado ao longo de toda a distribuição de *Sotalia* (FLORES, 2002). Na própria Baía de Guanabara, Azevedo e colaboradores (2009) identificaram partes de rede presas ao corpo de alguns animais.

1.3 A população de botos-cinza da Baía de Guanabara

Em 1875, onze anos após P.J. van Bénédén descrever a espécie costeira de *Sotalia* (*S. guianensis*), seu filho, E. van Bénédén, descreveu *S. brasiliensis* a partir de exemplares da Baía de Guanabara. Posteriormente, *S. brasiliensis* foi sinonimizada com *S. guianensis*. Na época em que avistou os botos-cinza da Baía de Guanabara, E. van Bénédén afirmou que os animais eram muito abundantes na área, inclusive no próprio porto da cidade do Rio de Janeiro, de modo que causava surpresa outros naturalistas que ali desembarcaram não terem notado esses golfinhos que considerava uma nova espécie. Embora a população de botos da Baía de Guanabara já tivesse chamado atenção de pesquisadores no século XIX, os estudos na baía só tiveram início 100 anos depois, a partir da década de 1980 (BOROBIA, 1984; GEISE, 1984).

Os botos da Baía de Guanabara apresentam alta fidelidade à área. Segundo estudo de Azevedo e colaboradores (2004), em média, esses animais têm sido avistados na localidade por 4,5 anos consecutivos e os filhotes permanecem na baía até depois de atingirem a maturidade sexual, utilizando a área para alimentação e reprodução (AZEVEDO *et al.*, 2004). Comportamentos de deslocamento, descanso e socialização também têm sido identificados e estudados nessa população (CARVALHO, 2013). Em análise realizada em três períodos distintos (2002/2004; 2008/2010 e 2010/2012), Carvalho (2013) observou que alimentação e deslocamento foram os comportamentos mais frequentes na área.

Esses animais ocupam o topo da teia alimentar (BISI *et al.*, 2012). A dieta dos botos-cinza da Baía de Guanabara é composta principalmente de teleósteos, mas eles também se alimentam de cefalópodes e crustáceos. Corvina (*Micropogonias furnieri*), goete (*Cynoscion jamaicensis*) e mamangá-liso (*Porichthys porosissimus*) aparecem entre as espécies com maior importância relativa na dieta dos botos (MELO, 2010).

Nos primeiros estudos realizados na Baía de Guanabara, Borobia (1984) e Geise (1984) já apontavam que os botos apresentavam uma preferência pela área do canal central. Posteriormente, Azevedo e colaboradores (2007) confirmaram esse padrão e notaram que, além do canal central, a região nordeste da Baía, que inclui as proximidades da Ilha de Paquetá e a Área de Proteção Ambiental de Guapimirim, também passou a configurar um local de preferência dos botos, tornando-se uma região ainda mais relevante a partir de 2008 (CARVALHO, 2013). Próximo ao canal central, as áreas utilizadas pelos botos apresentam profundidades de 10 a 20 metros, enquanto aquelas situadas ao nordeste da baía atingem no máximo cinco metros de profundidade (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A distribuição dos animais parece sofrer influência sazonal. Na época seca, os grupos de botos-cinza se concentram a partir da porção central da baía, além das regiões norte e nordeste. No período chuvoso, por sua vez, os grupos se concentram por toda a extensão do canal central e quase não ocorrem na região nordeste da baía (CARVALHO, 2013). O padrão de utilização das áreas de vida também parece sofrer influência dos períodos do dia (manhã/tarde). Carvalho (2013) identificou que os animais utilizam áreas maiores nos turnos da tarde do que nos turnos da manhã.

Nas últimas décadas, no entanto, a área de vida desses animais vem sofrendo uma diminuição constante (AZEVEDO *et al.*, 2005). Segundo Carvalho (2013), essa redução se mostra mais significativa no entorno da Ilha de Paquetá e na área centro-sul do canal central. A área utilizada para alimentação é uma das que mais sofreu redução gradativa nos últimos anos, esse comportamento deixou de ser observado no entorno da Ilha de Paquetá e na boca da baía (CARVALHO, 2013).

Outro parâmetro que vem sendo afetado de forma dramática nos últimos anos é o tamanho populacional. A partir de dados coletados entre 1995 e 2003, utilizando a técnica de fotoidentificação, Azevedo e colaboradores (2004) identificaram 69 animais. Na década seguinte houve um declínio de 50% da população e atualmente a população se resume a 38 indivíduos. Entre 2009 e 2015, houve um declínio de 17,3% e apenas 20 a 40% dos filhotes chegam à idade adulta (AZEVEDO AF, comunicação pessoal). A viabilidade da população se mostra ainda mais crítica quando se nota que cada fêmea dá à luz a um filhote por vez e em

intervalos de três a quatro anos, e que a maturidade sexual tarda seis anos na espécie (RAMOS *et al.*, 2000; ROSAS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003).

Embora em número reduzido, os botos da Baía de Guanabara permanecem mantendo um padrão de organização em grupo, ou seja, estabelecem uma aparente associação e normalmente seguem executando uma mesma atividade, com uma distância máxima entre os membros de até 30 metros (AZEVEDO, 2005). Segundo estudo de Carvalho (2013), na baía esses grupos são formados mais frequentemente por um a cinco indivíduos, embora também tenham sido observados grupos de tamanhos variados, inclusive com até 40 indivíduos. No entanto, grupos com mais de 30 componentes são raros, bem como indivíduos solitários, que foram verificados em 0,9% das observações feitas por Azevedo e colaboradores (2005).

Outro dado observado por Azevedo (2005) diz respeito ao padrão de associação desses animais: a presença de filhotes no grupo parece interferir em sua conformação, implicando em um número maior de adultos. Nesse contexto, Carvalho (2013) identificou que os grupos nos quais 25% ou mais dos componentes são filhotes têm sofrido de forma mais clara redução e mudança na utilização do habitat. A redução no tamanho das áreas utilizadas por esses grupos ultrapassa 60%. Declínio similar também foi observado no tamanho das áreas utilizadas por grupos com mais de dez indivíduos (CARVALHO, 2013).

Efeitos negativos das atividades antrópicas vêm sendo registrados na população de botos da Baía de Guanabara e são responsáveis pelo declínio. Essa é a área mais degradada ao longo da distribuição de *S. guianensis* (LAILSON-BRITO, 2007). Na Baía de Guanabara, além da perda e da degradação do habitat, os botos estão expostos a ameaças como capturas acidentais, poluição química e sonora e trânsito de embarcações (Da SILVA e BEST, 1996; CUNHA *et al.*, 2010). Todos esses fatores estão presentes em níveis elevados, e atuam em sinergia aumentando seu efeito deletério sobre essa população de botos.

Os efeitos do lançamento de esgoto doméstico e industrial, este último contendo metais pesados e outros contaminantes nas águas da baía, se mostram evidentes em várias pesquisas. Ao comparar a acumulação de organoclorados em amostras de gordura de *S. guianensis* das baías da Guanabara, Sepetiba/Ilha Grande (RJ) e Paranaguá (PR), Lailson-Brito e colaboradores (2010) identificaram que os botos da Baía de Guanabara possuem as maiores concentrações de somatório de diclorodifeniltricloroetano (DDT), de bifenilpoliclorado (PCB) e hexaclorobenzeno (HCB). Segundo os autores, as concentrações observadas nesses animais são comparáveis àquelas encontradas em cetáceos que habitam águas de países do Hemisfério Norte com alto nível de industrialização. Análises de mercúrio total (HgT) também indicam que os botos da Baía de Guanabara apresentam concentrações

maiores (920,3 ng/g) desse elemento do que os animais da Baía de Sepetiba (269,2 ng/g) e da Baía de Ilha Grande (688,4 ng/g) (BISI *et al.*, 2012).

Além dos riscos relacionados à perda de habitat e à contaminação, os animais da baía estão sujeitos a lesões causadas por interação direta com o homem. Uma análise de botos fotoidentificados (N= 78) revelou que 9% dos animais vivos apresentavam lesões claramente causadas por atividades humanas (AZEVEDO *et al.*, 2009b). A interação com redes de emalhe também é uma importante causa de mortalidade, embora não exista uma estimativa da sua frequência.

1.4 Estrutura social

Segundo Hinde (1976), a estrutura social pode ser definida como a qualidade, o conteúdo e o padrão dos relacionamentos sociais entre indivíduos. Diferentes estudos de ecologia comportamental, entre eles, os de Chesser (1998) e Dobson (1998), têm revelado que os sistemas sociais exercem influência significativa sobre a estrutura genética, o grau de parentesco e o sucesso reprodutivo das espécies.

Segundo DeWoody (2005), estrutura genética e estrutura social estão, na verdade, indissociavelmente ligadas. Diferentes autores discutem como questões de estruturação social vêm sendo mantidas e perpetuadas nas populações naturais. Para Möller (2012), os sistemas sociais são o resultado da seleção natural e sexual sobre os esforços dos indivíduos para atingir o sucesso reprodutivo máximo. Os sistemas sociais são uma forma de cooperação. Segundo Hamilton (1964), a sociabilidade e o comportamento cooperativo apenas evoluem e permanecem estáveis se os membros da população na qual ocorrem forem beneficiados de forma adaptativa. De acordo com essa teoria, grupos sociais constituídos de indivíduos não relacionados são menos propensos a cooperar devido à seleção de parentesco. Já quando os grupos são compostos por parentes e o grau de parentesco dentro do grupo é maior do que entre grupos, a seleção de parentesco pode promover a cooperação entre os membros do grupo (HAMILTON, 1964a; DUGDALE *et al.* 2008).

A vida em grupo apresenta algumas vantagens. Em populações animais, a organização em grupo e a cooperação podem diminuir a vulnerabilidade frente a predadores (McCULLOUGH, 1969; HAMILTON, 1971), tornar a captura de presas mais eficiente e melhorar a transmissão de informações entre os indivíduos (VAUGHAN, 2011). Alguns autores (NORRIS e DOHL, 1980; NORRIS e SCHILT, 1988) sugerem, na verdade, que a

evolução da organização social em delfínídeos é significativamente dirigida pelo risco de predação.

As análises de subestrutura genética em fina escala dentro de populações animais ajudam a compreender melhor aspectos como demografia e dinâmica populacionais (LAMBIN e YOCCOZ, 1998; MACCOLL *et al.* 2000). Ao mesmo tempo, marcadores moleculares podem responder questões relacionadas ao grau de parentesco, à paternidade e maternidade, ao sistema de acasalamento e a comportamentos como, por exemplo, de dispersão de um dos sexos e de filopatria (HUGHES, 1998; AVISE, 2004).

Em mamíferos, estudos apontam que os machos tendem a dispersar, enquanto as fêmeas seriam filopátricas. Há, portanto, uma tendência dos grupos sociais se formarem a partir de relações matrilineas (GREENWOOD, 1980). Nesse sentido, Coltman e colaboradores (2003) lembram que diferentes estudos com marcadores moleculares têm revelado altos níveis de parentesco entre fêmeas dentro de grupos sociais em representantes da maioria dos grupos de mamíferos que apresentam estrutura social pronunciada.

A filopatria natal parece contribuir para a formação de grupos em algumas populações (SPONG, 2002; VAN HORN *et al.*, 2004). Essa maior familiaridade com o sítio de nascimento pode favorecer a cooperação entre parentes e contribuir para uma taxa de mortalidade menor. Por outro lado, a dispersão possibilita a descoberta de novos territórios, reduzindo a competição entre parentes e ajudando a evitar a endogamia (LAWSON *et al.*, 2007).

Segundo Hepper (1991), delfínídeos são capazes de reconhecer o laço de parentesco entre os membros dos grupos, mas, até o momento, as análises de parentesco ainda são limitadas nesse táxon (MÖLLER, 2012). Entre os trabalhos atualmente disponíveis estão aqueles desenvolvidos com *Tursiops* sp. (KRÜTZEN *et al.*, 2003; FRÈRE *et al.*, 2010; DUFFIELD e WELLS, 1991; OWEN, 2003; MÖLLER *et al.*, 2001, MÖLLER *et al.*, 2006; WISZNIEWSKI *et al.*, 2010, PARSONS *et al.*, 2003 e RÁNDIC *et al.*, 2012), *Stenella coeruleoalba* (GASPARI *et al.*, 2007), *Delphinus delphis* (VIRICEL *et al.*, 2008), *Lagenorhynchus acutus* (MIRIMIN *et al.*, 2011), *Orcinus orca* (PILOT *et al.*, 2010) e *Globicephala melas* (AMOS *et al.*, 1991). Os estudos de Möller e colaboradores (2006) e de Frère e colaboradores (2010) mostram, por exemplo, que fêmeas formam laços sociais moderados com fêmeas que são maternal ou biparentalmente associadas, mas também se associam com aquelas não relacionadas, incluindo as que estão em um estado reprodutivo similar (MÖLLER e HARCOURT, 2008). Alianças entre machos também podem ser formadas, como mostra o trabalho de Möller e colaboradores (2001) com *Tursiops aduncus*

da Austrália. Machos formam alianças não necessariamente com indivíduos aparentados, mas sim com outros de mesmo tamanho, para garantir o acesso às fêmeas e impedir que outros acasalem. Análises de paternidade revelaram que a formação dessas alianças aumenta o sucesso reprodutivo dos machos (MÖLLER *et al.* 2001). Além disso, os estudos com delfínídeos têm revelado o estabelecimento de laços sociais entre as mães e filhotes. Essa associação parece tornar-se ainda mais forte quando irmãos nascem (WELLS, 1991).

1.5 Comportamento cooperativo e estrutura social de *S. guianensis*

Ao se organizar em grupos, o boto-cinza executa algumas atividades em cooperação, como o forrageamento e a alimentação. Estudos com uma população residente da Baía Norte, em Santa Catarina, identificaram seis padrões básicos de comportamento alimentar entre esses indivíduos, sendo cinco deles mediados pela organização em grupo e quatro apresentando cooperação direta entre os membros (ROSSI-SANTOS e FLORES, 2009).

Também já foi observado um alto grau de coesão entre os indivíduos durante repouso, socialização e deslocamento (LUNARDI, 2011). Além disso, algumas alianças peculiares têm sido reportadas para *S. guianensis*. Um registro feito por Nery e colaboradores (2009) identificou um caso de agressão a um filhote na Baía de Sepetiba. Indivíduos adultos separaram o binômio mãe-filhote e enquanto parte do grupo reteve a fêmea, outros indivíduos agrediram o filhote, que não voltou a ser avistado na região. Para os autores, a agressão possivelmente se deu por parte de machos com objetivo de coerção sexual.

Ao analisar a população de botos-cinza da praia da Pipa, no Rio Grande do Norte, Lunardi e Ferreira (2013) identificaram que indivíduos solitários apresentaram menos transições comportamentais do que grupos heterogêneos (formados por animais de diferentes classes etárias). Além disso, mais rotinas foram observadas para grupos heterogêneos do que para aqueles homogêneos (das mesmas classes etárias). Vale lembrar que os autores consideraram “rotina” como a realização de três comportamentos (alimentação; *milling* - deslocamento não-direcional; socialização; deslocamento e descanso) em sequência.

Nesse contexto, a presença de filhotes realmente parece afetar a organização do grupo, visto que Azevedo e colaboradores (2005) identificaram que na Baía de Guanabara, quando filhotes estão presentes, o grupo é cerca de duas vezes maior. Para os autores, esse dado sugere que grupos maiores podem auxiliar no desenvolvimento dos filhotes e na aprendizagem.

Uma análise com animais da Baía de Sepetiba (CAMPOS, 2012) indica que os botos-cinza apresentam redes sociais com características de fissão-fusão, ou seja, os animais se associam em pequenos grupos que mudam quanto à sua composição em intervalos de horas e dias (WELLS *et al.*, 1987; SMOLKER *et al.*, 1992). Além disso, redes sociais foram estabelecidas a partir de níveis de associações diferentes entre os animais. A presença de núcleos de associação sugere que há papéis sociais distintos para alguns indivíduos dessa população de *S. guianensis* e que a centralidade em determinados membros indica que há animais que atuam como conectores dos grupos.

Um dos fatores que pode contribuir para um comportamento diferenciado entre os botos-cinza diz respeito ao padrão de dispersão dos animais. A partir da análise de indivíduos de toda a costa brasileira, Cunha (2007) identificou uma estruturação maior a partir de dados mitocondriais do que nucleares, o que sugere a filopatria das fêmeas em *S. guianensis*.

1.6 Relações de parentesco

As árvores genealógicas são um método frequentemente utilizado para analisar o parentesco entre indivíduos (CANNINGS e THOMPSON, 1981), mas muitas vezes é difícil conduzir essa análise, em função da longevidade das espécies e da complexidade de se inferir o grau de parentesco a partir de estudos observacionais. Elas constituem uma estratégia metodológica baseada na atribuição de pares ou grupos de indivíduos a categorias de relacionamento. Há, no entanto, outro método que pode ser usado para analisar parentesco, que é baseado no cálculo do coeficiente de parentesco (r). Trata-se de uma medida contínua que avalia a identidade por descendência entre os indivíduos (BLOUIN, 2003). Segundo a regra de Hamilton (1964a), o parentesco genético entre dois indivíduos pode ser estimado a partir da probabilidade deles possuírem genes idênticos, herdados de um ancestral comum. Essa correlação genética é denominada coeficiente de parentesco ou consanguinidade, caracterizada pela letra r . O coeficiente r pode ser interpretado, portanto, como a fração esperada de alelos que é idêntica por descendência. A probabilidade de um alelo passar de uma geração a outra (passo genético) em um organismo diploide é de 1/2. Assim, o cálculo do coeficiente de parentesco pode ser resumido pela fórmula $r = \sum (1/2)^N$, onde N é o número de passos genéticos que une dois indivíduos consanguíneos a um ancestral comum. O somatório é necessário quando a relação de descendência envolve dois ancestrais comuns. Dois

indivíduos são considerados aparentados quando possuem um valor de r igual ou superior a 0,125 (BLOUIN, 2003; Tabela 1).

Tabela 1. Índices de parentesco (r)

Categoria de parentesco	r
Gêmeos monozigóticos	1
Pais-filhos	0,5
Irmãos inteiros	0,5
2ª geração (por exemplo, meio irmãos, tios)	0,25
3ª geração (por exemplo, primos de primeiro grau)	0,125
Não relacionados	0

Fonte: Modificado de Blouin (2003)

Atualmente, vários estimadores de r foram propostos, nos quais a precisão e a acurácia dependem das distribuições das frequências alélicas e do parentesco verdadeiro (Van De CASTEELE *et al.*, 2001; LYNCH e RITLAND, 1999; WANG, 2002).

1.7 Filopatria

A filopatria, caracterizada pela fidelidade ao sítio natal, das fêmeas em *S. guianensis* foi sugerida por Cunha (2007) após a autora identificar maior estruturação genética a partir de dados mitocondriais do que nucleares. A fidelidade ao grupo aparece como um comportamento frequente em cetáceos e, quando a espécie possui também o hábito de residência, a fidelidade ao sítio também ocorre. De fato, na maioria dos mamíferos sociais (GREENWOOD, 1980), há uma tendência dos machos dispersarem mais do que as fêmeas.

Além da comparação de dados genéticos mitocondriais e nucleares, uma possível filopatria pode ser revelada por análises de parentesco. Em uma população com fêmeas filopátricas, esperar-se-ia, por exemplo, que o coeficiente de parentesco (r) entre fêmeas adultas fosse superior a 0,125, indicando, portanto, relação de parentesco, e, ainda, deveria ser um valor maior do que os índices obtidos para a população geral e para os machos, visto que, por permanecerem no sítio de nascimento, as fêmeas forneceriam uma contribuição genética não aleatória para as gerações seguintes e seriam as principais responsáveis pela diferenciação genética de populações distintas (STORZ *et al.*, 1999). Também haveria uma tendência de

encontrar valores elevados entre fêmeas adultas e filhotes, bem como entre machos adultos e filhotes. Mas a análise apenas com o núcleo de machos adultos não deveria revelar um coeficiente indicativo de parentesco, ou seja, deveria obter um valor inferior a 0,125, pois se eles dispersam ao atingir a maturidade sexual, adultos machos identificados em uma população residente não seriam geneticamente relacionados. Já análises considerando apenas os filhotes resultariam, por sua vez, em coeficientes de parentesco elevados (superiores a 0,125), visto que, independente do sexo, esperar-se-ia encontrar nesse grupo irmãos inteiros, meio irmãos e primos.

Investigar a possível filopatria das fêmeas no boto-cinza tem relevância para a conservação da espécie, pois, além de ampliar o conhecimento acerca dos hábitos desse animal e contribuir para entender melhor a dinâmica e a estruturação genética e social das populações residentes, um comportamento desse tipo pode ter especial importância em populações ameaçadas. Isso porque a confirmação de que o núcleo de fêmeas realmente permanece no sítio de nascimento indica, por exemplo, que, em caso de extinção de uma população, a recolonização da área seria improvável.

1.8 Estruturação populacional

Definir população não é algo simples (WAPLES e GAGGIOTTI, 2006), porém, segundo Solé-Cava e Cunha (2012), no contexto da conservação, os conceitos mais usados são os de unidades evolutivamente significativas ("Evolutionarily Significant Unit", ESU, RYDER, 1986) e unidades de manejo ("Management Unit", MU; MORITZ, 1994). Diferenças quantitativas, por exemplo, frequências alélicas, podem ser usadas para delimitar uma MU (MORITZ, 1994), por isso, a definição de população a partir desse conceito se mostra menos restritiva (MORITZ, 1994; PALSROLL *et al.*, 2007) do que aquela baseada em ESU, visto que essa última requer o monofiletismo recíproco das linhagens. No presente trabalho, usamos o conceito de MU.

A panmixia não é uma condição frequente em populações naturais, o que indica que os indivíduos não se reproduzem ao acaso ao longo de sua distribuição. Entre os fatores que podem limitar a panmixia, aqueles que mais se aplicam a vertebrados são a seleção de habitat com fidelidade natal (filopatria), o deslocamento restrito de adultos e cruzamentos com populações em subpopulações, pois os indivíduos passam a acumular mutações dentro dos

subgrupos que não são compartilhadas entre os grupos. Além disso, o endocruzamento dentro das subpopulações diminui a variabilidade genética e forças evolutivas como a deriva e a seleção natural podem contribuir para a divergência genética entre as populações (SLATKIN, 1985; SOLÉ-CAVA, 2000; AVISE, 1994). Em contrapartida, a migração entre as populações é um fator que promove fluxo gênico e, dessa forma, frequentemente contrabalança a ação das forças que causam a diferenciação, contribuindo para a homogeneização das populações (RIDLEY, 2006; FRANKHAM, 2008). Mas barreiras geográficas (naturais ou antrópicas) ou padrões comportamentais são fundamentais para determinar a intensidade da migração entre as populações (AVISE, 2004; LOWE e ALLENDORF, 2010). Nesse contexto, o tamanho populacional e as diferenças ambientais ao longo da distribuição da espécie acabam determinando a importância relativa de cada um desses fatores (AVISE, 2004; SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012).

Informações acerca da estrutura populacional auxiliam em decisões de conservação e manejo (O'BRIEN, 1994). Com isso, cada vez mais estudos têm se dedicado a investigar a questão. A partir da análise com marcadores mitocondriais e nucleares, Cunha (2007) propôs seis MU para *S. guianensis* ao longo da costa brasileira, sendo elas: (1) Pará; (2) Ceará; (3) Rio Grande do Norte; (4) Bahia; (5) Espírito Santo e (6) Sudeste/Sul (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina). Mas a autora considera que a ausência de diferenciação verificada nessa última região (Sudeste/Sul) pode estar refletindo a origem recente dessas populações, portanto, sugere que a população não seja tratada como um estoque único para fins de manejo (CUNHA; da SILVA; SOLÉ-CAVA, 2010). Estudos com marcadores moleculares também têm revelado diferenciação populacional em microescala geográfica em *S. guianensis*, por exemplo, entre as populações da Baía de Paraty e da Baía de Sepetiba (HOLLATZ *et al.*, 2011) e entre os animais das baías de Guanabara, Sepetiba e Ilha Grande (SANTOS, 2015).

1.9 Microssatélites

Como pesquisas observacionais normalmente demandam grande esforço de campo e tempo, o que, dada a complexidade das relações intrapopulacionais, pode inviabilizar o estudo, os marcadores moleculares têm se tornado cada vez mais importantes no campo de investigação da estrutura social (HAYNIE *et al.*, 2003). Os microssatélites estão entre as

técnicas mais empregadas atualmente (SCHLÖTTERER, 2004). Esses marcadores também têm sido amplamente utilizados em análises de parentesco e de estruturação populacional.

Microsatélites apresentam altas taxas de mutação e, por isso, se mostram mais adequados para estudos populacionais e familiares (HUGHES, 1998; AVISE, 2004). São marcadores nucleares de herança biparental e que possuem codominância, o que possibilita a identificação de homozigotos e heterozigotos. Consistem em sequências de nucleotídeos que contêm repetições de dois a seis pares de base (QUELLER *et al.*, 1993) e são abundantes no genoma de eucariotos. Eles ocorrem principalmente em regiões não codificadoras, sendo portanto considerados neutros, o que indica que não estão sofrendo influência da seleção natural (De WOODY, 2005). Apresentam grande variação alélica e permitem análises multilocus, bem como análises que não assumem o equilíbrio migração-deriva. Atualmente, vários loci têm sido isolados de diferentes espécies de delfínídeos, mas o uso de iniciadores específicos é recomendável pois iniciadores heterólogos podem produzir alelos nulos em função de mutação na sequência de flanqueamento (CUNHA e WATTS, 2007). Cunha e Watts (2007) desenvolveram 12 marcadores dinucleotídeos polimórficos específicos para *S. guianensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a estrutura social e analisar a diversidade genética da população de botos-cinza residente na Baía de Guanabara, comparando com animais de áreas adjacentes na costa do Rio de Janeiro.

2.2 Específico

Como objetivo específico, o presente trabalho pretende testar a hipótese de filopatria natal das fêmeas em *Sotalia guianensis*, usando análises de parentesco conduzidas a partir de marcadores de microssatélites.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das amostras

As amostras utilizadas no estudo são provenientes de necropsias de animais que encalharam ou que foram capturados acidentalmente e amostras de biópsia remota coletadas pela equipe do Laboratório de Mamíferos Aquáticos da UERJ entre os anos de 1994 e 2013 (Tabela 2).

Ao todo, foram analisadas 50 amostras de *S. guianensis* provenientes da Baía de Guanabara. Amostras de botos-cinza (N = 12) de regiões próximas à Baía de Guanabara (Rio das Ostras, Restinga da Marambaia, Praia da Reserva, Niterói, Barra da Tijuca, Barra de Guaratiba e Leme) foram usadas para comparar com os indivíduos da Baía de Guanabara (FIGURA 4).

Tabela 2. Local, ano de coleta, sexo e faixa etária das amostras de *S. guianensis* na baía de Guanabara (RJ) e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013.

	Código	Localidade	Ano	Sexo	Faixa etária
1	BG#01*	Baía de Guanabara	2001	M	adulto
2	BG#02*	Baía de Guanabara	2001	M	adulto
3	BG#03*	Baía de Guanabara	2001	F	juvenil/adulto
4	BG#04*	Baía de Guanabara	2009	F	adulto
5	MQ18	Praia do Leblon, RJ	1994	M	adulto
6	MQ19	Baía de Guanabara - Praia das Gaivotas (RJ)	1994	M	filhote
7	MQ33	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1995	M	adulto
8	MQ45	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1996	M	juvenil/adulto
9	MQ61	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1996	F	adulto
10	MQ62	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1996	F	feto do MQ61
11	MQ63	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	1996	M	filhote
12	MQ69	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1997	F	filhote
13	MQ97	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	1997	F	adulto
14	MQ98	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	1997	F	feto do MQ97
15	MQ107	Baía de Guanabara - Praia da Moreninha	1998	M	filhote
16	MQ111	Barra da Tijuca (Posto 8) – RJ	1999	M	adulto
17	MQ122	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1999	F	adulto
18	MQ127	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1999	M	adulto
19	MQ128	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	1999	F	filhote
20	MQ134	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	2000	M	juvenil/adulto

	Código	Localidade	Ano	Sexo	Faixa etária
21	MQ135	Niterói (Camboinhas) – RJ	2000	F	adulto
22	MQ136	Niterói (Camboinhas) – RJ	2000	F	filhote
23	MQ138	Barra de Guaratiba (RJ)	2000	F	juvenil/adulto
24	MQ140	Rio das Ostras –RJ	2000	F	juvenil/adulto
25	MQ143	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2000	M	adulto
26	MQ157	Baía de Guanabara - Paquetá	2001	F	juvenil/adulto
27	MQ160	Baía de Guanabara - Praia do Flamengo	2002	F	juvenil/adulto
28	MQ180	Baía de Guanabara - Niterói	2003	M	juvenil/adulto
29	MQ181	Baía de Guanabara - Mauá	2003	M	adulto
30	MQ182	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2003	F	adulto
31	MQ183	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2003	M	filhote
32	MQ185	Baía de Guanabara – Ilha de Paquetá	2003	M	juvenil/adulto
33	MQ188	Baía de Guanabara – Ilha de Pancaraíba	2003	-	filhote
34	MQ191	Baía de Guanabara - Cais do Porto (RJ)	2004	M	adulto
35	MQ192	Baía de Guanabara - Cais do Porto (RJ)	2004	M	adulto
36	MQ193	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2004	F	filhote
37	MQ197	Baía de Guanabara	2004	F	filhote
38	MQ205	Barra de Guaratiba (RJ)	2005	-	-
39	MQ207	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2005	M	juvenil/adulto
40	MQ208	Barra da Tijuca (Joatinga) - RJ	2005	M	juvenil/adulto
41	MQ214	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2006	F	adulto
42	MQ215	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2006	F	filhote
43	MQ217	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2006	F	filhote
44	MQ227	Restinga de Marambaia - Rio de Janeiro	2007	-	juvenil/adulto
45	MQ238	Baía de Guanabara	2007	M	juvenil/adulto
46	MQ270	Baía de Guanabara	2008	F	juvenil/adulto
47	MQ272	Niterói (Itaipuaçu) - RJ	2008	F	filhote
48	MQ286	Baía de Guanabara - Magé	2009	M	filhote
49	MQ291	Baía de Guanabara	2009	F	juvenil/adulto
50	MQ292	Baía de Guanabara - São Gonçalo	2009	M	filhote
51	MQ295	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2009	M	filhote
52	MQ303	Leme - Rio de Janeiro	2010	F	filhote
53	MQ332	Baía de Guanabara	2010	F	juvenil/adulto
54	MQ376	Praia da Reserva (Ilha 26) - Rio de Janeiro	2011	M	juvenil/adulto
55	MQ380	Baía de Guanabara - Magé	2011	F	juvenil/adulto
56	MQ383	Baía de Guanabara - Ilha do Governador	2012	M	juvenil/adulto
57	MQ387	Baía de Guanabara	2012	M	juvenil/adulto
58	MQ438	Baía de Guanabara	2013	M	juvenil/adulto
59	MQ443	Baía de Guanabara	2013	F	juvenil/adulto
60	MQ444	Baía de Guanabara - Praia da Bica	2013	F	adulto
61	MQ454	Baía de Guanabara - Praia da Urca	2013	M	juvenil/adulto
62	MQ487	Baía de Guanabara	2009	F	filhote

Amostras em negrito compuseram o conjunto final de dados (N = 39). Ver tópico 4.1.2 na pág. 50; (-) informação não disponível; (*) biopsia.

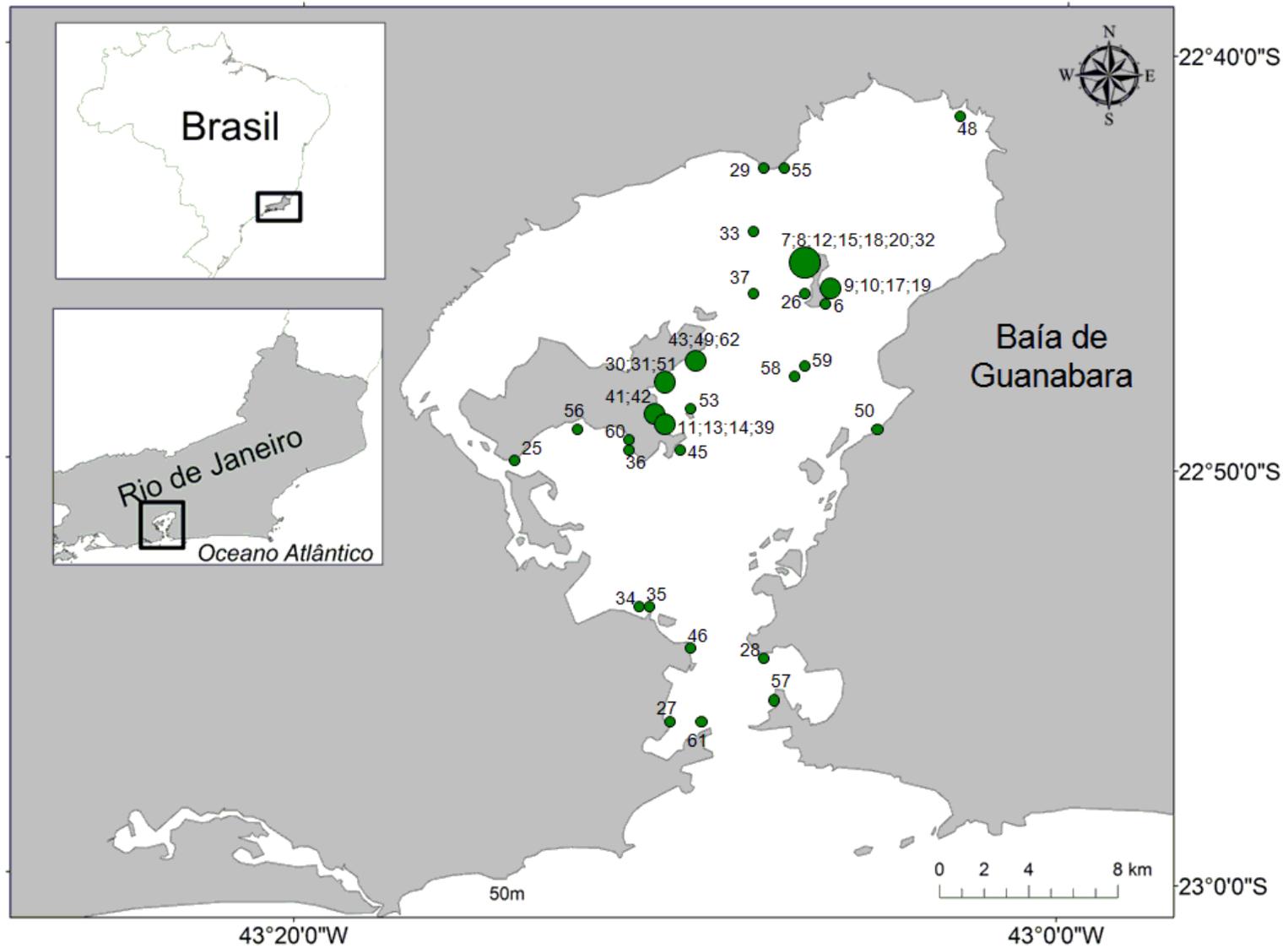


Figura 4: Locais onde as carcaças de botos-cinza (*S. guianensis*) foram coletadas na Baía de Guanabara (RJ), entre 1994 e 2013. As amostras estão numeradas seguindo a Tabela 2. Os tamanhos dos círculos verdes são proporcionais ao número de amostras coletadas em cada ponto de coleta.

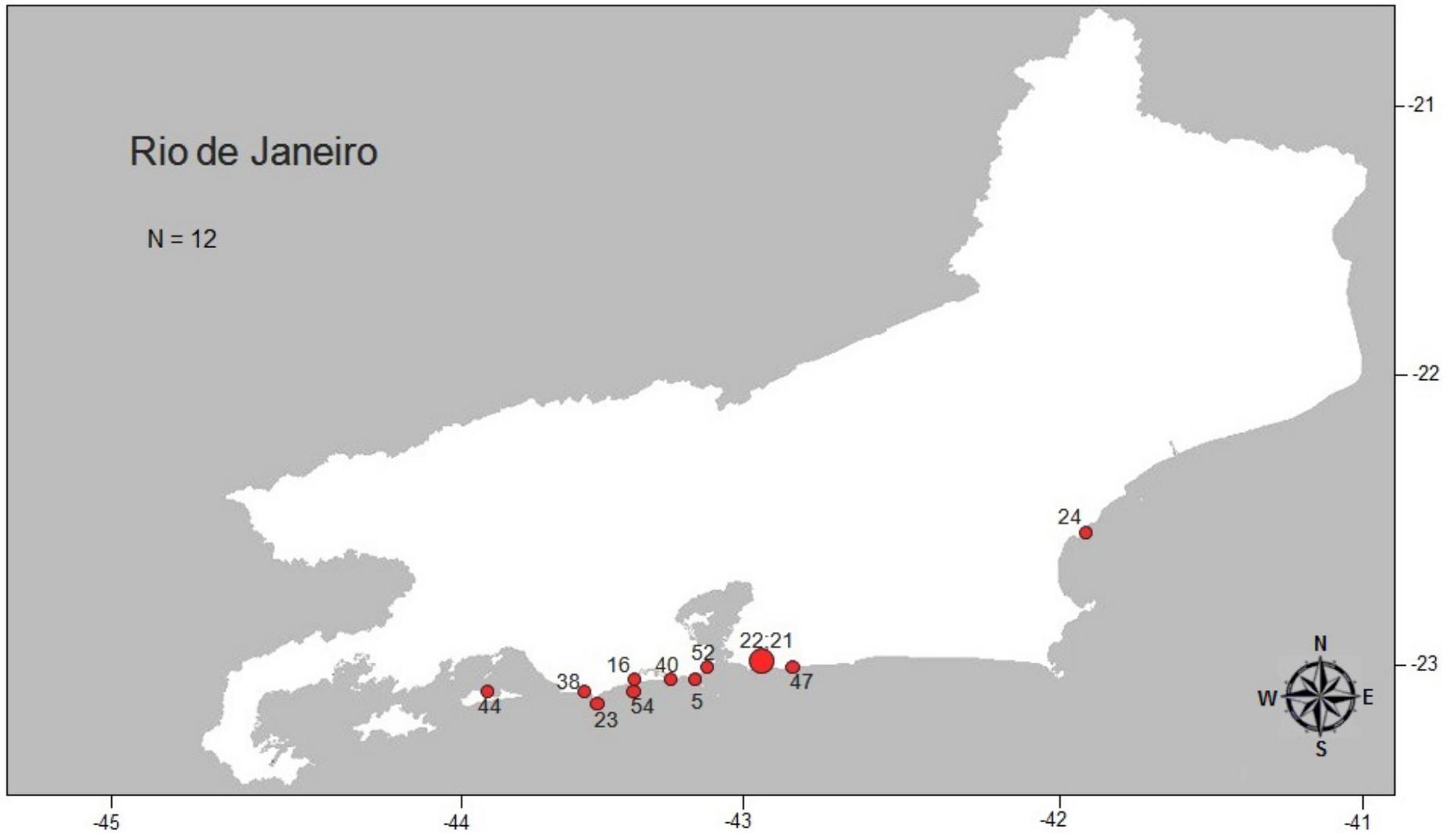


Figura 5: Locais onde as carcaças de botos-cinza (*S. guianensis*) foram coletadas fora da Baía de Guanabara (RJ), entre 1994 e 2013. As amostras estão numeradas seguindo a Tabela 2. Os tamanhos dos círculos vermelhos são proporcionais ao número de amostras coletadas em cada ponto de coleta.

3.2 Determinação do estado de conservação, da classe etária e do sexo

O estado de conservação foi determinado durante a realização das necropsias, a partir da classificação para mamíferos aquáticos de Geraci e Lounsbury (1993). Nesse sistema, às amostras são atribuídos códigos, sendo: (1) para animais vivos; (2) para carcaça em boas condições (fresca); (3) para carcaça em estado razoável (decomposta, mas com órgãos intactos); (4) para carcaça decomposta (decomposição avançada) e (5) para carcaça mumificada ou resto de esqueleto.

A classe etária foi determinada usando o protocolo de Hohn e colaboradores (1989). Nesse sistema, camadas de crescimento ou GLGs (Growth Layer Groups, PERRIN e MYRRICK, 1980) depositadas na dentina e no cimento do dente são usadas para estimar a idade. Na maioria dos delfínidos, cada GLG observada, tanto na dentina pós-natal como no cimento, representa um ano de idade (HOHN *et al.*, 1989; PINEDO e HOHN, 2000).

Quando a idade não foi determinada a partir da análise do dente, a mesma foi estimada pelo comprimento total [medida tomada desde o entalhe da nadadeira caudal até a extremidade da maxila (NORRIS, 1966)]. Indivíduos com tamanho inferior a 106 cm (RAMOS *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003) foram classificados como filhotes, enquanto os que apresentaram tamanho acima desse valor foram considerados juvenis/adultos, visto que a diferenciação entre adulto e juvenil apenas pelo comprimento nem sempre é precisa (AZEVEDO *et al.*, 2009a).

Quando o estado de decomposição avançado impediu a determinação do sexo pela ausência de órgãos reprodutores, os indivíduos tiveram o sexo determinado usando o protocolo de sexagem molecular otimizado para a espécie (CUNHA e SOLÉ-CAVA, 2007). O mesmo protocolo foi utilizado para determinar o sexo das amostras provenientes de biopsia remota.

A determinação do estado de conservação, a estimativa de idade a partir da análise do dente e a mensuração do comprimento total dos indivíduos foram executadas pela equipe do Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores “Profa. Izabel Gurgel” (MAQUA-UERJ).

3.3 Extração de DNA

As amostras de pele e músculo utilizadas no estudo foram preservadas em etanol ou secas a frio, a partir de liofilização. Durante o processamento, a primeira etapa executada foi a extração de DNA utilizando o protocolo de Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Nesta etapa, amostras maceradas de cerca de 2 mm foram incubadas em tubos de 1,5 mL com proteinase K e tampão de lise de Palsbøll *et al.* (1992) – (1 % SDS; 0,15 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 mg/mL proteinase K; em 10 mM tris-HCl – pH = 8,0) – a 55°C por três horas. Na sequência, volume igual de fenol/clorofórmio foi adicionado e misturado, gerando emulsão. O conjunto foi centrifugado, a fase aquosa foi resgatada e alocada em novo tubo de 1,5 ml. Esse procedimento foi repetido por três vezes, quando então a interface encontrava-se limpa. Volume igual de clorofórmio foi adicionado e centrifugado. O sobrenadante foi resgatado e transportado para novo tubo, no qual foram adicionados NaOAc 3 M e etanol (EtOH) gelado 100 %. O tubo foi incubado no gelo durante a noite e depois centrifugado a frio. O sobrenadante foi então descartado e EtOH 70 % gelado foi adicionado. Novamente o tubo foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Após a secagem do pellet, este foi ressuspensão em água deionizada (50 µL).

3.4 Sexagem molecular

As regiões nucleares ZFX/ZFY foram amplificadas por PCR, conforme protocolo otimizado para a espécie (CUNHA e SOLÉ-CAVA, 2007). Durante essa reação, utilizamos iniciadores para odontocetos ZFXY582, ZFX923 e ZFY767, descritos por Bérubé e Palsboll (1996) em reações separadas (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição das sequências dos iniciadores que foram utilizados na sexagem molecular das amostras de *S. guianensis* que não puderam ter o sexo determinado a partir de análise da morfologia externa.

Iniciador	Sequência	Referência
ZFXY582	ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA	
ZFX923	AGAATATGGCGACTTAGAACG	Bérubé e Palsbøll (1996)
ZFY767	TTTGTGTGAACTGAAATTACA	

As ampliações foram feitas em reações 15 µL, contendo a concentração final de 200 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 10 µg de BSA, 0,5 µM de cada iniciador e 1 U/reação de *Taq* polimerase (Promega).

As condições de ciclagem da PCR foram: desnaturação inicial por 3 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de amplificação (1 min a 93 °C; 1 min de anelamento a 50 °C; e 1 min a 72

°C), e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Controles negativos foram incluídos em todas as ampliações.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese realizada em géis de agarose 2% com tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA), corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). O tempo de corrida foi 55 min em corrente de 90V e 30 mA.

3.5 Microssatélites

Para esse estudo, foram utilizados 12 microssatélites polimórficos específicos (Tabela 4) para *S. guianensis* desenvolvidos por Cunha e Watts (2007).

Tabela 4. Sequências dos 12 loci de microssatélites polimórficos específicos para *S. guianensis* utilizados no presente estudo e desenvolvidos por Cunha e Watts (2007).

Locus	Sequência	Referência
Sgui002	F: GGATGTCACTGAACACAGAGC R: ACCTATCTACATTTCCCAGAGG	Cunha e Watts (2007)
Sgui003	F: TCCAATCTCCAACCAAATCCC R: GTCGCTAAGTTCATCATCTGC	
Sgui004	F: TGAATGGGTCAGAGTTTTGCC R: TCAATGGGAGGCACTGTAGG	
Sgui005	F: AGCACAATCACAACGAAGACC R: TTGCCTCAGTTCAGGAAGCC	
Sgui006	F: CTATGATGGACGGTTGAAGG R: TCTCTTGGTCATTGCCTTCC	
Sgui007	F: CCATTTAGAGGTTGGGGTGC R: GGGATTCCATAGTGACAAGC	
Sgui010	F: ATTAGCCACAGACAAGATCG R: CATGGGATTTCTGGAAGCC	
Sgui011	F: ACAGAGAAGCAAGTGGGAAACC R: TTCCCCGCCACTAAGATTCC	
Sgui014	F: TCCAGTAGGGTTTTCTGTTGC R: GAATGTGGGCACTTCTTCCC	
Sgui016	F: TTCTCTGGGCAAACACTGC R: CATTATTGCCGAAGTATGC	
Sgui017	F: GTGGTGGAGTAGAGGATAGG R: ACATTGGGCTTCAACGCACG	
Sgui018	F: CTGGAAAAAGAGTAGTTGGC R: GTGCAAGACCTCAAAATCC	

Os loci de microssatélites foram amplificados usando a estratégia do iniciador com cauda (SCHUELKE, 2000) em reações de 10 μ L, contendo 200 μ M de dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$, 10 μ g de BSA, 0,2 μ M de iniciador *forward*, 0,8 μ M de iniciador *reverse*, 1 U/reação de Taq polimerase (Promega) e 0,4 μ M de fluorocromo (VIC, NED, PET e 6-fam).

Após a otimização das condições de amplificação, as amostras de DNA foram diluídas para alguns marcadores: o marcador Sgui005 foi diluído dez vezes e o Sgui007 foi diluído seis vezes.

Inicialmente, foi realizada uma primeira otimização para as condições de ciclagem da PCR: 3 min a 95 °C; seguidos por 5 ciclos de 30 seg a 95 °C; 30 seg a 50 °C e 45 seg a 72 °C. Na sequência, são realizados 35 ciclos de 30 seg. a 92 °C, 30 seg a Ta (Tabela 5; Otimização 1) e 55 seg a 72 °C e mais 30 min de extensão a 72 °C. Em todos os experimentos foram usados controles negativos. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% com tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA), corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e tempo de corrida de 55 min (90V e 30 mA) para verificar se houve a formação de produto e, portanto, sucesso nas reações de amplificação.

Tabela 5. Temperatura de anelamento (Ta) ótima verificada para cada um dos 12 loci de microssatélites desenvolvidos especificamente para *S. guianensis* por CUNHA e WATTS (2007) na primeira (1) e na segunda (2) etapa de otimização executada nesse trabalho.

Locus	Temperatura (Ta)	
	Otimização 1	Otimização 2
Sgui016	48 °C	58 °C
Sgui002	50 °C	56 °C
Sgui003	50 °C	60 °C
Sgui004	50 °C	58 °C
Sgui005	50 °C	60 °C
Sgui006	50 °C	60 °C
Sgui007	50 °C	58 °C
Sgui010	50 °C	58 °C
Sgui011	50 °C	60 °C
Sgui017	50 °C	54 °C
Sgui018	52 °C	60 °C
Sgui014	54 °C	58 °C

Os produtos de PCR foram agrupados em dois painéis (FIGURA 6), de acordo com a faixa de tamanho dos alelos e os fluorocromo, e genotipados em sequenciador automático ABI3500. A determinação dos alelos foi feita usando o software Geneious v. 8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2010).

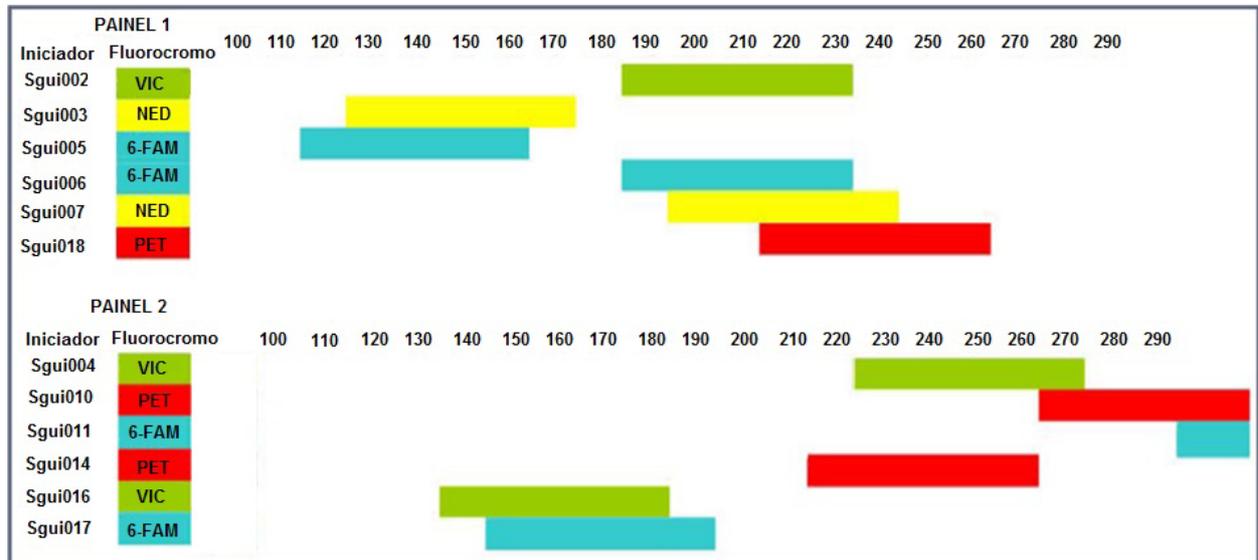


Figura 6: Painéis com tamanho dos alelos em cada locus de microssatélite, desenvolvidos especificamente para *S. guianensis* por CUNHA e WATTS (2007), e respectivos fluorocromos (VIC, PET, NED e 6-Fam) que foram utilizados neste trabalho.

Para aumentar a taxa de sucesso de amplificação das amostras, outras duas genotipagens foram previamente programadas. Com base nos resultados da primeira genotipagem (taxa de sucesso amostras/loci inferior a 50%), optamos por conduzir as outras duas genotipagens seguindo novas condições de ciclagem.

Assim, foi feita uma nova otimização para os 12 loci modificando o programa de ciclagem da PCR. Nesse novo protocolo, os ciclos iniciais visam à amplificação dos microssatélites, e são seguidos de oito ciclos específicos para incorporação do fluorocromo, com anelamento a 53 °C: 4 min a 94 °C; seguidos por 30 ciclos de 45 seg a 92 °C; 45 seg a Ta (Tabela 5; Otimização 2) e 45 seg a 72 °C. Na sequência, são realizados oito ciclos de 45 seg a 92 °C, 45 seg a 53 °C e 45 seg a 72 °C e mais 30 min de extensão a 72 °C. Apenas o marcador *sgui003* permaneceu com o protocolo de amplificação anterior, visto que nos testes de otimização apresentou resultado superior nas condições antigas. A temperatura de anelamento, no entanto, passou de 50°C para 60°C.

Além das temperaturas de anelamento, algumas condições de amplificação foram modificadas no novo protocolo, sendo elas a concentração final de $MgCl_2$ e o volume final de DNA (Tabela 6).

Tabela 6. Novas concentrações de $MgCl_2$ ($[]_f MgCl_2$) e volume final de DNA ($V_f DNA$) e diluição usados no protocolo novo de ciclagem dos locus de microssatélites desenvolvidos especificamente para *S. guianensis* por CUNHA e WATTS (2007).

	$[]_f MgCl_2$ mM	$V_f DNA$ /diluição μL
Sgui002	2,5	1
Sgui003	3	1
Sgui004	3	1
Sgui005	2,5	2
Sgui006	3	2
Sgui007	3	1
Sgui010	3	1
Sgui011	3	2
Sgui014	2,5	1
Sgui016	2,5	1
Sgui017	2,5	1
Sgui018	2,5	1/ 10x

Novamente, o sucesso de amplificação foi verificado a partir de eletroforese em gel de agarose 2% com tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA), corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). O tempo de corrida foi 55 min em corrente de 90V e 30 mA. Na sequência, foi realizada a segunda genotipagem em sequenciador automático ABI3500 e foi feita a determinação dos alelos usando o software Geneious v. 8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2010).

Para a terceira genotipagem, amplificamos apenas amostras que não funcionaram ou cujo resultado gerou dúvida na primeira e segunda genotipagens. Nessa nova etapa, foram feitas previamente reextrações de DNA usando o mesmo protocolo de Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para as amplificações, usamos o novo protocolo, tal como na segunda genotipagem, seguindo as temperaturas de anelamento (T_a) exibidas na Tabela 5 – otimização 2. Quanto às condições de amplificação, usamos 1,5 U/reação de Taq polimerase (Promega), ao invés de 1,0 U/reação, e volumes finais de DNA maiores (Tabela 7).

Tabela 7. Condições otimizadas da terceira amplificação executada nesse trabalho para os locus de microssatélites específicos para *S. guianensis* que foram desenvolvidos por CUNHA e WATTS (2007).

	[] _f MgCl ₂	V _f DNA
Sgui002	2,5	2
Sgui003	3	2
Sgui004	3	2
Sgui005	2,5	2,5
Sgui006	3	2,5
Sgui007	3	2,5
Sgui010	3	2
Sgui011	3	2
Sgui014	2,5	2
Sgui016	2,5	2
Sgui017	2,5	2
Sgui018	3	2

Na sequência, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2% com tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA), corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). O tempo de corrida e os padrões de voltagem e amperagem foram os mesmos utilizados nas etapas anteriores. A genotipagem foi realizada em sequenciador automático ABI3500 e foi feita a determinação dos alelos usando o software Geneious v. 8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2010).

3.6 Análise dos dados

Para verificar a presença de alelos nulos, usamos o programa *Micro-Checker* v. 2.2.3 (OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Frequência e riqueza alélicas, bem como alelos privados foram determinados no *Excel Microsatellite Toolkit* v. 3.1.1 (PARKS, 2001) e nos programas *FSTAT* v. 2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e *GENETIX* v. 4.05 (BELKHIR *et al.*, 2004). As mesmas ferramentas foram utilizadas para testar se os loci estavam em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e em Equilíbrio de Ligação.

Uma análise de agrupamento e atribuição foi realizada no programa *Structure* v. 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000), variando o número de populações prováveis (K) entre um e três. Consideramos esses três valores porque K = 1 representaria a hipótese de panmixia, K = 2 indicaria um cenário com duas populações geneticamente estruturadas (Baía de Guanabara e

áreas adjacentes) e $K = 3$ considerando a possibilidade de estruturação dentro de uma das áreas de coleta (Baía de Guanabara ou áreas adjacentes). Dez cadeias MCMC independentes foram simuladas para cada K , com 1.000.000 de passos e 100.000 de *burn-in*. Foi utilizado o método de Hubisz *et al.* (2009), que utiliza as localidades de origem das amostras como prior para a análise, com o modelo de mistura entre populações e de frequências correlacionadas. O gráfico para escolha do K mais provável foi obtido no *Structure Harvester* (EARL e VONHOLDT, 2012).

A partir da determinação do K mais provável, utilizamos os programas *CLUster Matching and Permutation* (CLUMPP) v. 1.1.2 (JAKOBSSON e ROSENBERG, 2007), *Distrupt* v. 1.1 (ROSENBERG, 2004) e *Ghostscript* v. 9.16 (Artifex Software) para obter o gráfico de Q (que representa a proporção do genótipo de cada indivíduo correspondente a cada uma das populações) mais representativo.

O tamanho efetivo (N_e) para a população da Baía de Guanabara foi calculado pelo método de desequilíbrio de ligação (HILL, 1981), usando o programa *N_eEstimator v 2.01* (DO *et al.*, 2014). Foram usados valores críticos de 0,05; 0,02 e 0,01 de frequência alélica para descartar alelos raros. A fim de possibilitar uma comparação, também foi estimado N_e da população de *S. guianensis* da Baía de Sepetiba, usando dados de 40 indivíduos genotipados para os mesmos loci, ou seja, *Sgui002*, *Sgui003*, *Sgui004*, *Sgui005*, *Sgui006*, *Sgui007*, *Sgui010*, *Sgui011*, *Sgui014*, *Sgui016*, *Sgui017* e *Sgui018* (SANTOS, 2015).

Para a investigação de possível gargalo populacional, foi usado o programa *Bottleneck* (PIRY *et al.*, 1999). Os três modelos de mutação (Alelos Infinitos, IAM; Modelo de Duas Fases, TPM, e Modelo de Mutação Passo a passo, SMM) foram usados para as simulações de coalescência. O modelo TPM foi configurado para acomodar 95% de mutações passo a passo e variância de 12, conforme recomendado por Piry e colaboradores (1999). A significância dos desvios do equilíbrio mutação-deriva foi avaliada por meio do teste de *Wilcoxon* (LUIKART e CORNUET, 1998). O teste qualitativo de mudança da moda ("mode-shift") de Luikart e colaboradores (1998) também foi usado.

Para a análise da estrutura social, foram obtidos os índices de parentesco par a par (r) usando o *ML-Relate* (KALINOWSKI *et al.*, 2006). Os valores de r variam entre 0 (indivíduos não-relacionados) e 0,5 (relação pai-filho ou irmãos inteiros), e valores acima de 0,125 (relação entre primos ou tio-sobrinho) são considerados como indicadores de parentesco (KALINOWSKI *et al.*, 2006). Os valores de r médios foram comparados dentro e entre os sexos, dentro da população da Baía de Guanabara e também em relação aos indivíduos das áreas costeiras adjacentes. Comparações entre as classes etárias também foram executadas.

Conduzimos ainda uma análise de variância simples (ANOVA) para um fator e um teste de comparação múltipla de *Tukey* no programa *Minitab17* (Minitab Inc.) para determinar se as médias encontradas dentro das áreas adjacentes e dentro da Baía de Guanabara foram estatisticamente diferentes.

Na Figura 7, um fluxograma resume os principais passos descritos acima.

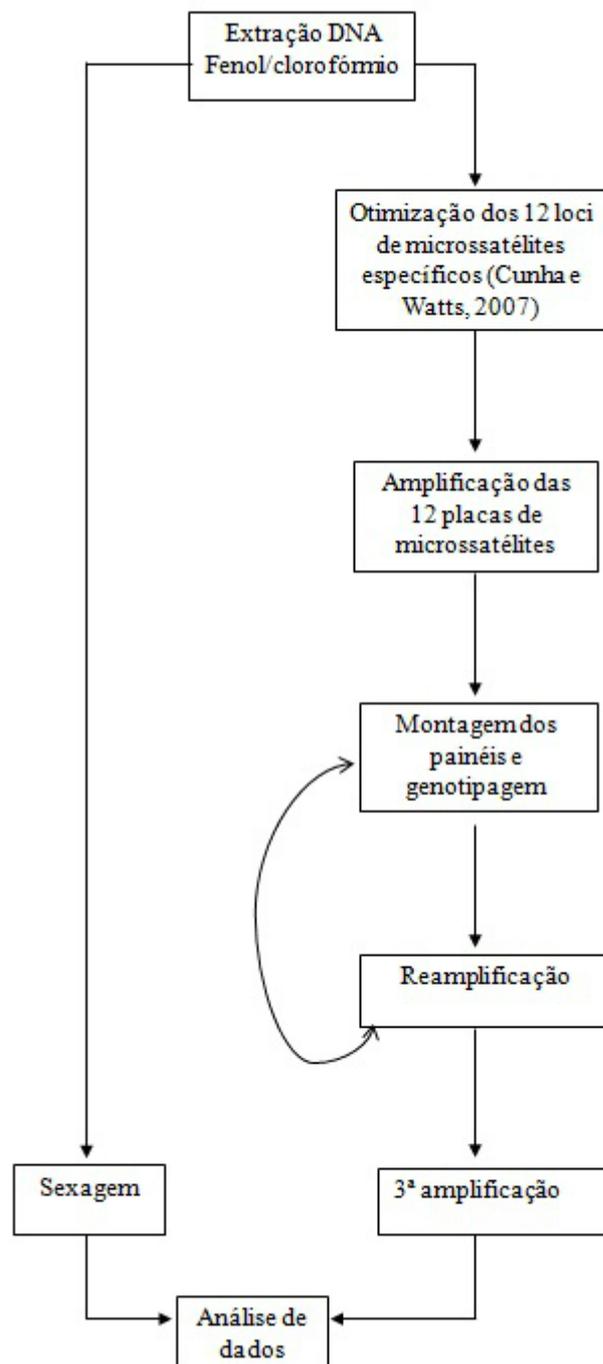
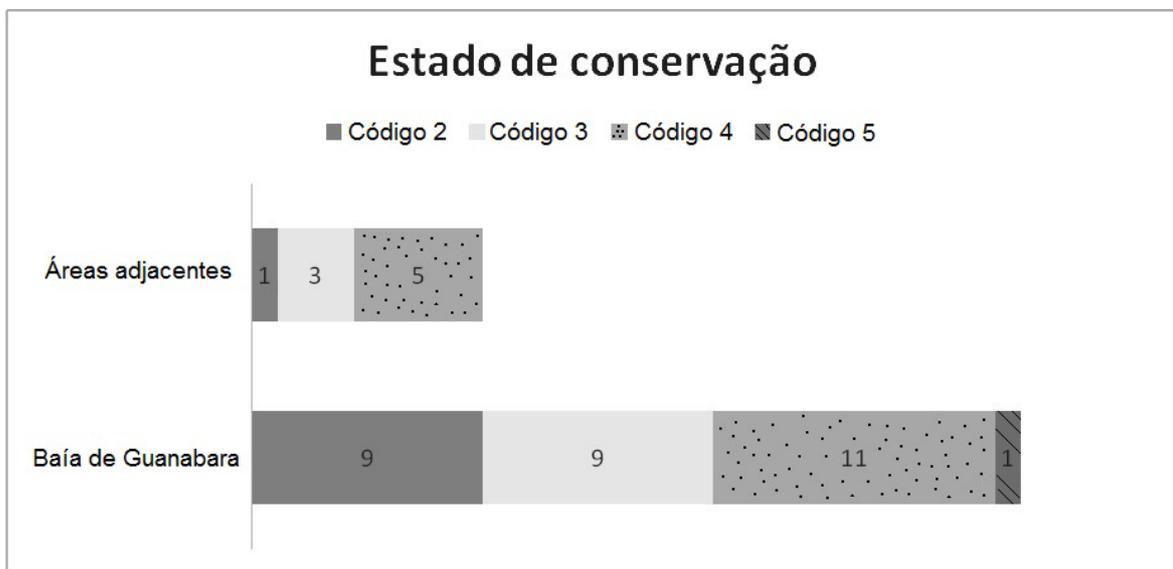


Figura 7: Síntese das etapas metodológicas executadas no presente trabalho para a obtenção dos dados genéticos das 62 amostras de *S. guianenses* coletadas entre 1994 e 2013 na Baía de Guanabara e nas áreas adjacentes.

4. RESULTADOS

4.1 Características das amostras

Das 62 amostras analisadas ($N_{\text{Baía de Guanabara}} = 50$; $N_{\text{áreas adjacentes}} = 12$), quatro foram provenientes de biopsias remotas. Considerando apenas as amostras provenientes de encalhes ($N = 58$), 39 animais tiveram o estado de conservação da carcaça avaliado, segundo Geraci e Lounsbury (1993), e anotado na planilha de necropsia. Este variou de Código 2 – carcaça em boas condições – até Código 5 – carcaça mumificada ou restos do esqueleto. O estado mais prevalente ($N = 16$) foi Código 4, referente a carcaças decompostas (decomposição avançada). Das 39 amostras com estado de conservação avaliado, nove eram de áreas adjacentes (FIGURA 8).



* Dezenove (19) amostras não puderam ter o estado de conservação determinado. Além dessas, as quatro biopsias também não estão representadas no gráfico.

Figura 8: Estado de conservação de carcaças de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) coletadas na Baía de Guanabara e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013, seguindo os códigos de Geraci e Lounsbury (1993).

Quanto à classe etária, das 58 amostras provenientes de encalhe, 32 tiveram a idade estimada a partir da análise dos dentes, usando a técnica de Hohn e colaboradores (1989). Como

a maturidade sexual ocorre por volta dos seis anos de idade (RAMOS, 1997), esse foi o limite usado para classificar os animais como adultos. Entre quatro e cinco anos, esses animais costumam se separar das mães e dispersar (AZEVEDO AF, comunicação pessoal). Assim, essa faixa foi considerada como juvenil/adulto, enquanto indivíduos abaixo desse limite foram agrupados como filhotes. Com isso, dos 32 animais com idade estimada, 16 foram considerados filhotes (até três anos de idade), dois juvenis (quatro e cinco anos de idade) e 14 adultos (a partir de seis anos de idade). Na categoria filhotes, três eram das áreas adjacentes (dois de Niterói e um do Leme), enquanto entre adultos três eram das áreas adjacentes (Praia do Leblon, Barra da Tijuca, Niterói). Já no grupo de juvenis todos pertenciam à Baía de Guanabara.

Outros 24 animais foram agrupados por classe etária em função do comprimento total. Desses, quatro indivíduos apresentaram tamanho inferior a 106 cm, o que, segundo a literatura (RAMOS *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003), indicaria que ainda eram filhotes, sendo todos provenientes da Baía de Guanabara. Considerando os demais indivíduos, nas áreas adjacentes, o tamanho variou de 121,5 (Praia da Reserva) até 198 cm (Rio das Ostras), enquanto na Baía de Guanabara variou de 125 até 195 cm. Dois indivíduos da Baía de Guanabara apresentaram tamanho igual ou superior a 190 cm contra um das áreas adjacentes (Rio das Ostras). No entanto, como a diferenciação entre adulto e juvenil apenas pelo comprimento nem sempre é precisa (AZEVEDO *et al.*, 2009a), optamos por mantê-los classificados como juvenis. Um indivíduo pode ser determinado como adulto, visto que apresentou ovários maduros (ambas da Baía de Guanabara). Quanto às biopsias, três pertenciam a animais adultos e uma a um juvenil. Um indivíduo das áreas adjacentes (Barra de Guaratiba) não teve a classe determinada (FIGURA 9).

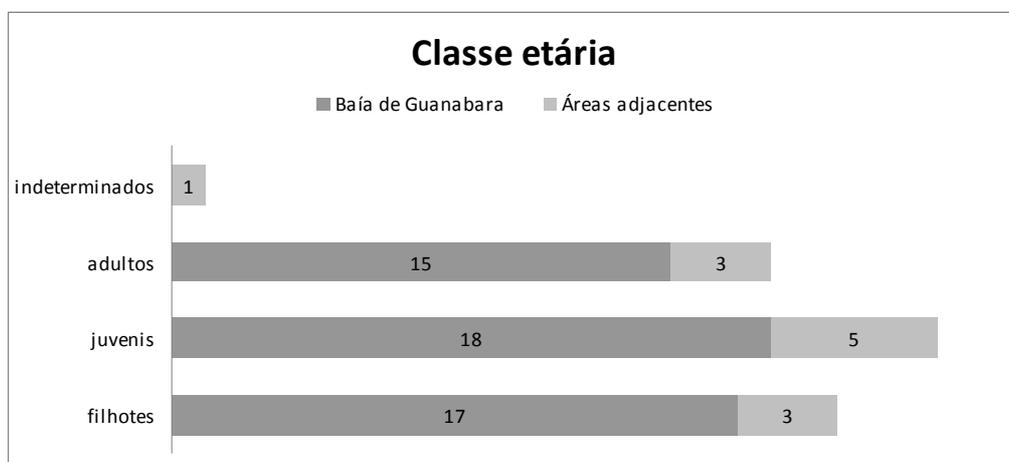


Figura 9: Classes etárias dos botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Baía de Guanabara e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013.

Quanto ao sexo, dos 58 animais avaliados, 51 tiveram o sexo determinado por análise da morfologia externa durante a necropsia. Desses, 27 eram machos, sendo quatro das áreas adjacentes (Praia do Leblon, Barra da Tijuca e Praia da Reserva). Das 24 fêmeas, cinco eram de áreas adjacentes (Niterói, Rio das Ostras e Barra de Guaratiba).

Além das quatro biopsias remotas, outros cinco animais tiveram o sexo determinado por sexagem molecular. Essa análise indicou a presença de dois machos (Baía de Guanabara) e sete fêmeas, das quais seis eram da Baía da Guanabara e uma das áreas adjacentes (Leme).

Reunindo as informações obtidas a partir de necropsia e da sexagem molecular, 60 indivíduos tiveram o sexo determinado, sendo 31 fêmeas ($N_{\text{Baía de Guanabara}} = 25$ e $N_{\text{áreas adjacentes}} = 6$) e 29 machos ($N_{\text{Baía de Guanabara}} = 25$ e $N_{\text{áreas adjacentes}} = 4$) (FIGURAS 10a e 10b).

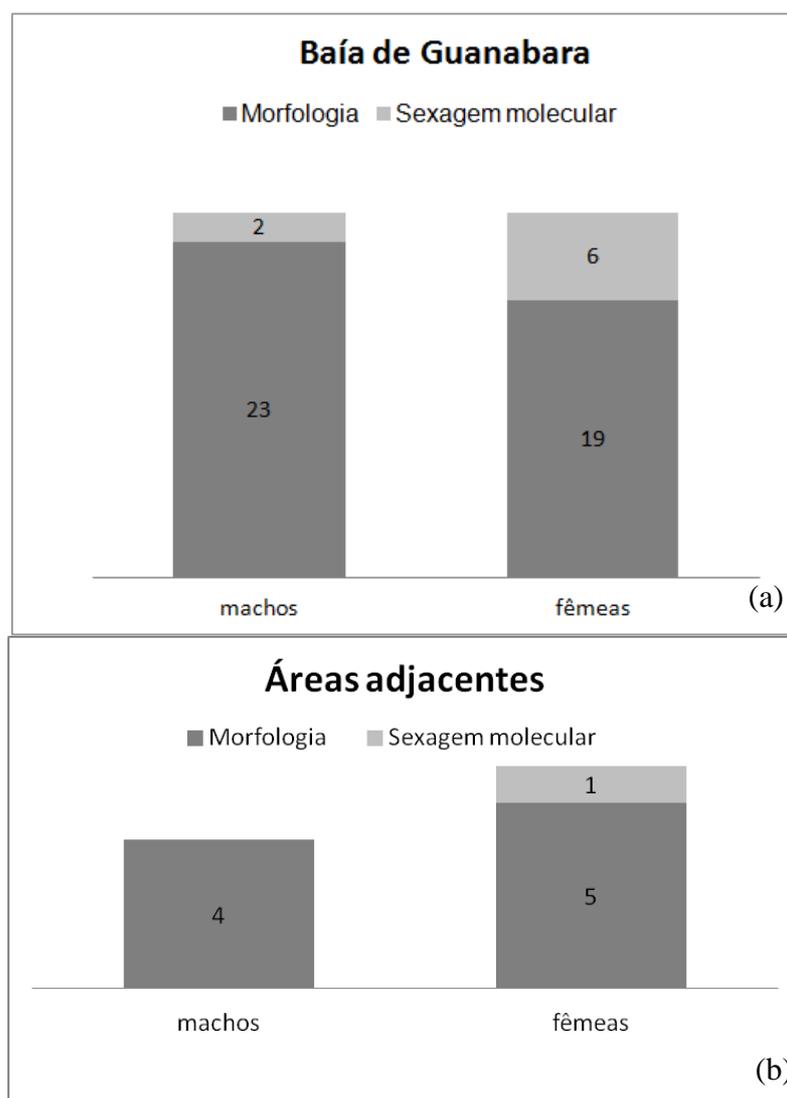


Figura 10: Sexo dos botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Baía de Guanabara (a) e áreas adjacentes (b), entre 1994 e 2013.

4.1.2 Conjunto de dados final usado nas análises

Das 50 amostras provenientes da Baía de Guanabara, 30 funcionaram para 50% ou mais dos marcadores. Quanto às amostras das áreas adjacentes, das 12 previamente incluídas no estudo, nove atingiram taxa de sucesso igual ou superior a 50%. Sobre os marcadores, 11 dos 12 funcionaram para 50% ou mais das amostras (Tabela 8). Com isso, as análises foram conduzidas com 39 amostras e 11 marcadores. O único marcador excluído foi o *sgui018*.

Tabela 8. Percentual (%) de loci de microssatélites específicos para *S. guianensis* (CUNHA e WATTS, 2007) amplificados para amostra total (N = 62) e para amostras com taxa de sucesso igual ou superior a 50% (N = 39).

	% de loci amplificados	
	(N = 62)	(N = 39)
Sgui002	0,565	0,846
Sgui003	0,435	0,667
Sgui004	0,645	0,897
Sgui005	0,516	0,692
Sgui006	0,581	0,846
Sgui007	0,645	0,949
Sgui010	0,548	0,744
Sgui011	0,468	0,744
Sgui014	0,419	0,590
Sgui016	0,694	0,923
Sgui017	0,726	0,897
Sgui018	0,242	0,359

*Em negrito, valores com taxa de sucesso inferior a 50%.

Quanto à proporção sexual dos 39 indivíduos incluídos nas análises finais, 37 tinham o sexo conhecido: 16 machos, sendo dois das áreas adjacentes, e 21 fêmeas, das quais seis eram das áreas adjacentes. Apenas dois indivíduos, sendo um da Baía de Guanabara e um das áreas adjacentes (Restinga da Marambaia) não tiveram o sexo determinado.

Com relação à classe etária, das 39 amostras finais, 12 eram filhotes, 17 foram classificados como juvenis e 10 como adultos (FIGURA 11).

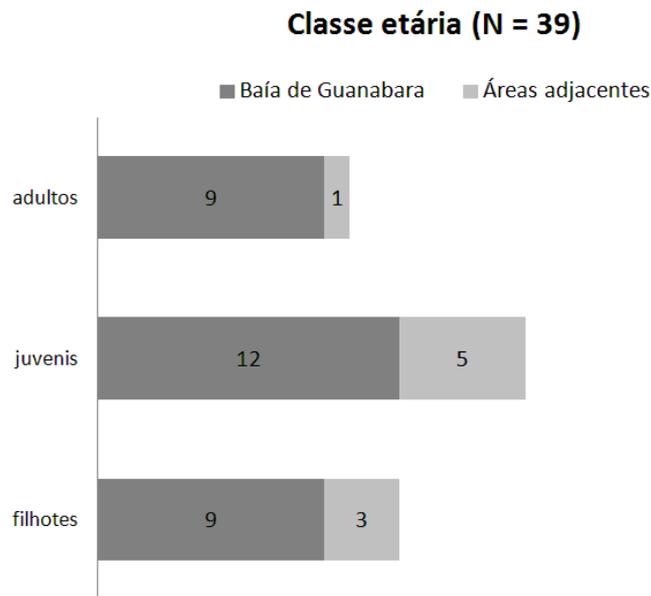


Figura 11: Classe etária dos botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Baía de Guanabara e áreas adjacentes, entre 1994 e 2013, utilizados para as análises finais (N = 39).

4.2 Análises genéticas

4.2.1 Diversidade genética

Nas áreas adjacentes, o menor valor de riqueza alélica foi identificado no locus *sgui003* (1,000), enquanto o marcador *sgui017* apresentou o maior valor (3,441). Para a Baía de Guanabara, o locus com menor riqueza alélica foi o *sgui007* (1,000), enquanto o *sgui011* se mostrou mais diverso (3,518). Excetuando o locus *sgui003*, a riqueza alélica foi maior nas áreas adjacentes, apesar de mais amostras da Baía de Guanabara terem sido analisadas (Tabela 9).

Tabela 9. Riqueza alélica de microssatélites específicos para *S. guianensis* (CUNHA e WATTS, 2007) por locus (N = 11) e por população (áreas adjacentes e Baía de Guanabara).

Locus	Áreas adjacentes	Baía de Guanabara	Total
Sgui005	2,929	2,844	2,948
Sgui006	2,969	2,345	2,432
Sgui002	2,467	1,618	1,729
Sgui003	1,000	1,377	1,335
Sgui007	2,348	1,000	1,490
Sgui017	3,441	2,699	2,946

Locus	Áreas adjacentes	Baía de Guanabara	Total
Sgui011	4,000	3,518	3,755
Sgui016	1,750	1,312	1,411
Sgui004	1,885	1,303	1,546
Sgui014	1,964	1,864	1,897
Sgui010	1,967	1,734	1,769

Vinte e dois alelos foram compartilhados entre os indivíduos das áreas adjacentes e da Baía de Guanabara. Alelos privados também foram observados nas duas localidades em quase todos os loci, com exceção apenas dos marcadores sgui002 e sgui010. Nas áreas adjacentes, ocorreram 10 alelos privados em sete loci (sgui005, sgui006, sgui007, sgui017, sgui011, sgui016 e sgui004). Já na Baía de Guanabara observamos a presença de 13 alelos privados também em sete loci (sgui005, sgui003, sgui017, sgui011, sgui016, sgui004 e sgui014) (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências alélicas para os 11 loci para áreas adjacentes (AA) e Baía de Guanabara (BG).

	Alelos	AA	BG
	151	50,00	50,00
Sgui005	157	0,00	19,57
N loci _{AA} = 4	159	25,00	26,09
N loci _{BG} = 23	161	25,00	0,00
	163	0,00	4,35
	221	8,33	0,00
Sgui006	223	8,33	7,41
N loci _{AA} = 6	225	33,33	42,59
N loci _{BG} = 27	227	50,00	50,00
Sgui002	225	20,00	10,71
N loci _{AA} = 5	227	70,00	87,50
N loci _{BG} = 28	243	10,00	1,79
Sgui003	168	0,00	4,35
N loci _{AA} = 3	170	100,00	93,48
N loci _{BG} = 23	172	0,00	2,17
Sgui007	235	6,25	0,00
N loci _{AA} = 8	243	56,25	100,00
N loci _{BG} = 29	245	37,50	0,00
	168	0,00	3,57
Sgui017	174	14,29	12,50
N loci _{AA} = 7	176	21,43	35,71
N loci _{BG} = 28	182	28,57	0,00
	184	35,71	48,21
	422	0,00	20,83
	426	30,00	41,67
	428	0,00	4,17
Sgui011	430	10,00	16,67
N loci _{AA} = 5	432	20,00	8,33
N loci _{BG} = 24	434	0,00	8,33
	444	30,00	0,00
	452	10,00	0,00

	Alelos	AA	BG
	166	6,25	0,00
Sgui016	176	0,00	3,57
N loci _{AA} = 8	178	6,25	0,00
N loci _{BG} = 28	180	87,50	94,64
	186	0,00	1,79
Sgui004	271	0,00	5,56
N loci _{AA} = 8	273	75,00	94,44
N loci _{BG} = 27	275	25,00	0,00
	252	0,00	5,26
Sgui014	258	25,00	7,89
N loci _{AA} = 4	260	75,00	84,21
N loci _{BG} = 11	266	0,00	2,63
Sgui010	303	30,00	18,75
N loci _{AA} = 5	305	70,00	81,25
N loci _{BG} = 24			

*Em negrito, alelos privados.

Na Tabela 11, comparamos a diversidade genética observada no presente estudo com outros estudos que analisaram microssatélites em *S. guianensis* de outras localidades. Utilizamos dados de Santos (2015), que avaliou populações de botos-cinza do centro-sul do Estado do Rio de Janeiro (Baía de Guanabara, Baía de Sepetiba e Baía de Ilha Grande), e informações de Cunha (2007), que reuniu amostras de toda a costa brasileira (Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina). Ambos os estudos utilizaram os mesmos loci de microssatélites usados no presente estudo, que foram desenvolvidos especificamente para *S. guianensis* (CUNHA e WATTS, 2007).

Tabela 11. Heterozigosidades médias observadas (H_o) e esperadas (H_e) na Baía de Guanabara, BG; áreas adjacentes, AA; Baía de Sepetiba, BS; Baía de Ilha Grande, BIG; Pará, PA; Ceará, CE; Rio Grande do Norte, RN; Bahia, BA, Espírito Santo, ES; Rio de Janeiro, RJ, São Paulo, SP; Paraná, PR; Santa Catarina, SC para *S. guianensis*.

<i>Sotalia guianensis</i>														
a autora (2015)	SANTOS (2015)					CUNHA (2007)								
BG	AA	BG	BS	BIG	PA	CE	RN	BA	ES	RJ	SP	PR	SC	
H_o	0,249	0,353	0,277	0,308	0,227	0,521	0,403	0,342	0,314	0,360	0,289	0,203	0,156	0,375
H_e	0,344	0,513	0,363	0,312	0,297	0,587	0,575	0,630	0,402	0,402	0,441	0,289	0,259	0,370

4.2.2 Equilíbrios de *Hardy-Weinberg* (EHW) e de ligação

Quanto às heterozigosidades esperadas (H_e), obtivemos valores que variaram de zero a 0,844 e de zero a 0,755 nas áreas adjacentes e na Baía de Guanabara, respectivamente. Para as heterozigosidades observadas (H_o), obtivemos valores de zero a 0,833 nas áreas adjacentes e de zero a 0,663 na Baía de Guanabara (Tabela 12). O índice de endocruzamento F_{IS} total para as áreas adjacentes foi 0,336 e para a Baía de Guanabara foi 0,280, ambos significativos (ambos com $P = 0,001$). Após a correção de Bonferroni, (α ajustado = 0,00227) os marcadores *sgui004* e *014* se mostraram em desequilíbrio em ambas as localidades. Já os marcadores *sgui002* e *007* estão em desequilíbrio apenas nas áreas adjacentes, enquanto *sgui003* e *016* estão em desequilíbrio apenas na Baía de Guanabara. Nenhum dos marcadores se mostrou em desequilíbrio de ligação (Tabela 13).

Tabela 12. Valores de Heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o); F_{IS} e de P no teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada locus de microsatélites e localidades de *S. guianensis* avaliadas no presente estudo.

	Áreas adjacentes				Baía de Guanabara			
	H_e	H_o	F_{IS}	P (EHW)	H_e	H_o	F_{IS}	P (EHW)
Sgui005	0,714	0,500	0,333	0,023	0,656	0,435	0,342	0,005
Sgui006	0,682	0,833	-0,250	0,609	0,574	0,481	0,163	0,100
Sgui002	0,511	0,200	0,636	0,001	0,227	0,179	0,215	0,046
Sgui003	0,000	0,000	-	-	0,127	0,043	0,662	0,001
Sgui007	0,575	0,125	0,794	0,001	0,000	0,000	-	-
Sgui017	0,780	0,571	0,284	0,047	0,634	0,643	-0,014	0,487
Sgui011	0,844	0,800	0,059	0,182	0,755	0,542	0,287	0,003
Sgui016	0,242	0,250	-0,037	0,064	0,105	0,036	0,663	0,001
Sgui004	0,400	0,000	1,000	0,001	0,107	0,037	0,658	0,001
Sgui014	0,429	0,000	1,000	0,001	0,289	0,053	0,822	0,001
Sgui010	0,467	0,600	-0,333	0,339	0,311	0,292	0,064	0,128
Total	0,513	0,353	0,336	0,001	0,344	0,249	0,280	0,001

*Em negrito, valores significativos após correção ($\alpha = 0,002$).

Tabela 13. Teste de Equilíbrio de ligação entre todos os loci de microsatélites específicos para *S. guianensis* (CUNHA e WATTS, 2007) baseado em 1100 permutações. P ajustado para 5%.

Locus x locus	P	Locus x locus	P	Locus x locus	P
005 X 006	0,033	002 X 003	0,206	007 X 014	1,000
005 X 002	0,243	002 X 007	0,743	007 X 010	1,000
005 X 003	1,000	002 X 017	0,239	017 X 011	0,054
005 X 007	1,000	002 X 011	0,350	017 X 016	0,058
005 X 017	0,837	002 X 016	0,063	017 X 004	1,000
005 X 011	0,181	002 X 004	0,068	017 X 014	0,117
005 X 016	1,000	002 X 014	0,566	017 X 010	0,223
005 X 004	0,302	002 X 010	0,427	011 X 016	0,258
005 X 014	0,397	003 X 007	NA	011 X 004	0,603
005 X 010	0,672	003 X 017	0,013	011 X 014	0,266
006 X 002	0,141	003 X 011	0,197	011 X 010	0,842
006 X 003	0,555	003 X 016	0,616	016 X 004	0,330
006 X 007	0,466	003 X 004	0,511	016 X 014	0,339
006 X 017	0,017	003 X 014	0,922	016 X 010	NA
006 X 011	0,275	003 X 010	0,985	004 X 014	0,339
006 X 016	0,784	007 X 017	1,000	004 X 010	NA
006 X 004	0,010	007 X 011	1,000	014 X 010	0,370
006 X 014	0,555	007 X 016	1,000		
006 X 010	0,341	007 X 004	1,000		

*Nenhum valor significativo após correção ($\alpha = 0,0009$)

4.2.3 Teste de alelos nulos

A análise no *Micro-Checker* v. 2.2.3 indicou que cinco loci (*sgui003*, *sgui005*, *sgui011*, *sgui014* e *sgui016*) apresentaram excesso de homozigotos na Baía de Guanabara (N = 30), indicando possível presença de alelos nulos. Já nas áreas adjacentes não foi possível conduzir essa análise em função do número reduzido de dados.

Os gráficos da Figura 12 reúnem as análises conduzidas no *Micro-checker* para esses cinco loci que apresentaram evidência de alelos nulos. A frequência de homozigotos esperada e observada é apresentada para cada marcador.

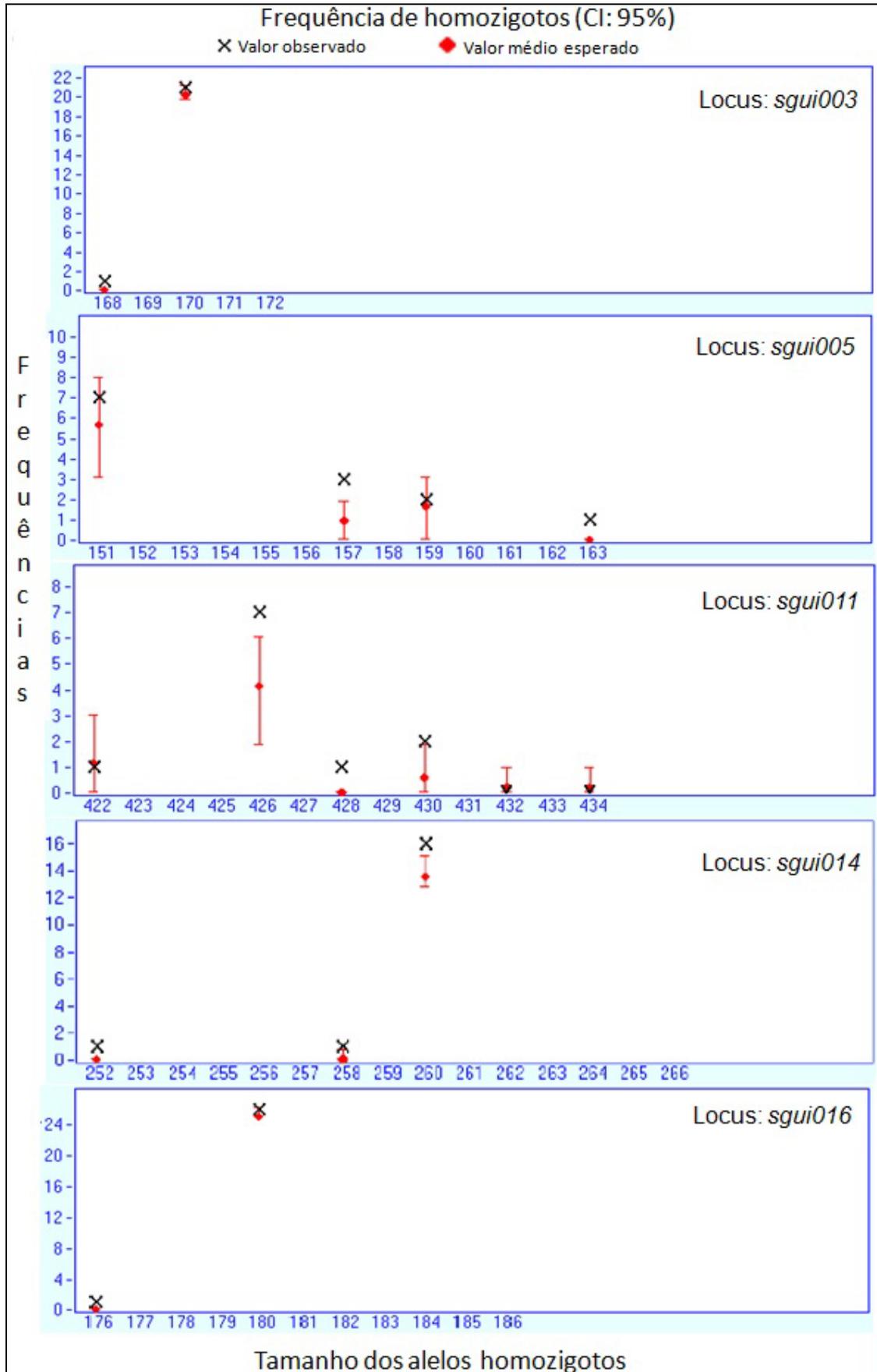


Figura 12: Frequências de homozigotos na Baía de Guanabara para os loci de microssatélites específicos para *S. guianensis*: *sgui003*; *sgui005*; *sgui011*; *sgui014* e *sgui016*. O x indica valor observado para cada alelo, e a barra vermelha a faixa de frequência esperada (Intervalo de confiança de 95%).

4.2.4 Análises de estruturação populacional

Na análise Bayesiana de agrupamento e atribuição, foram testados três cenários distintos, onde o número de populações (K) variou de 1 a 3. O cenário de duas populações foi indicado como o mais provável (FIGURA 13). O índice de fixação também detectou diferenciação populacional entre as duas localidades testadas ($F_{ST} = 0,040$; $P = 0,049$).

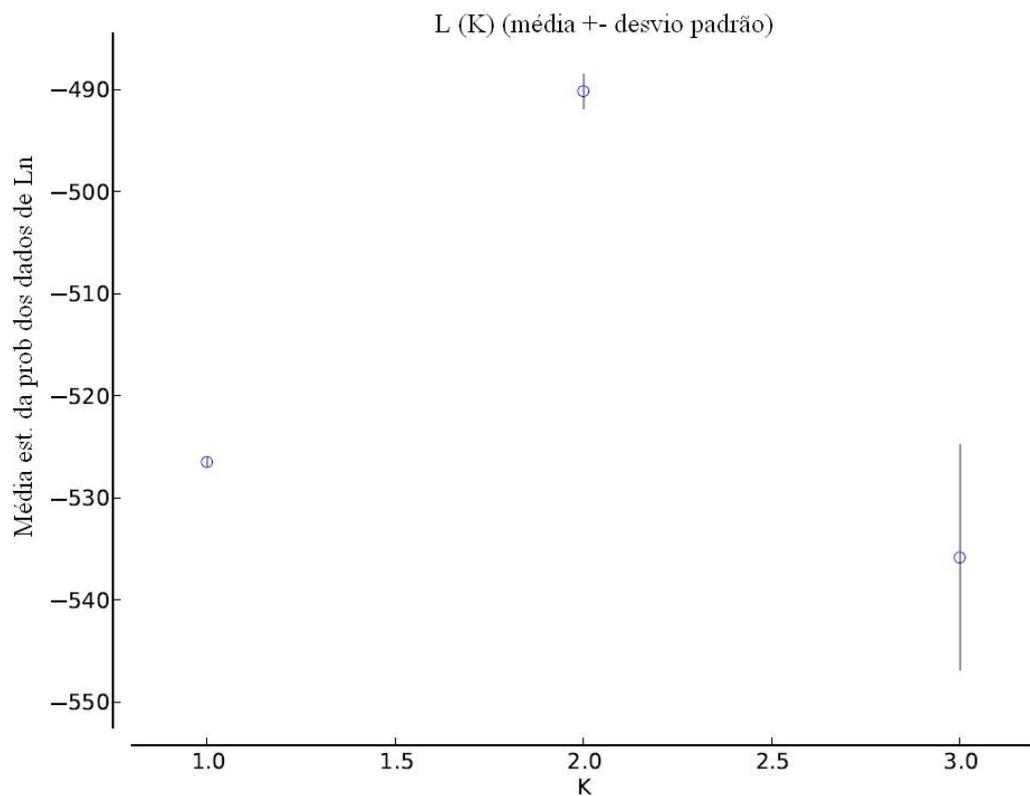


Figura 13: Logaritmo de Probabilidade Posterior ($\ln P(D)$) da análise de agrupamento para cada K mostrando o número de populações mais provável ($K = 2$).

A análise do coeficiente Q , que representa a proporção do genótipo de cada indivíduo que corresponde a cada uma das populações, mostra que indivíduos das áreas adjacentes foram atribuídos à população verde, enquanto os representantes da Baía de Guanabara foram atribuídos à população vermelha com coeficientes Q_{vermelho} médios acima de 0,5 (FIGURA 14).

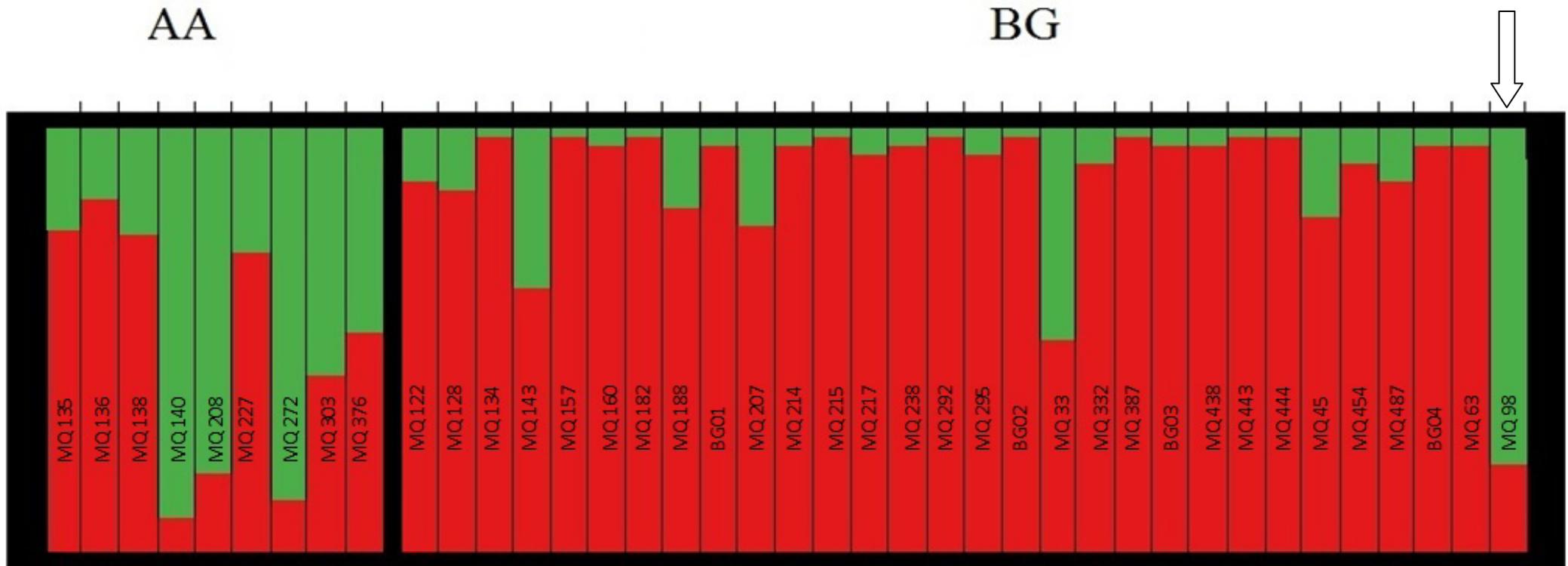


Figura 14: Valores de Q da análise de atribuição considerando $K = 2$ e com informação *a priori* sobre a origem das amostras. Cada cor representa uma população. O gráfico representa uma compilação de dez iterações independentes. A seta indica a amostra da Baía de Guanabara com Q_{vermelho} médio inferior a 50%.

Na população da Baía de Guanabara apenas um indivíduo apresentou genótipo com menos de 50% pertencente à população vermelha (MQ98, feto). Já na população verde, dois indivíduos provenientes de Niterói (MQ135, MQ136; fêmea e seu feto), um de Barra de Guaratiba (MQ138, fêmea), um da Restinga da Marambaia (MQ227) e outro da Praia da Reserva (MQ376, macho) apresentaram genótipos misturados com contribuição importante da população vermelha (Tabela 14).

Tabela 14. Coeficientes Q das populações vermelha e verde para cada indivíduo. Indivíduos codificados como MQ e BG foram coletados na Baía de Guanabara, os demais (AA) nas áreas adjacentes. Os códigos AA também representam amostras MQs.

	Q _{vermelho} (BG)	Q _{verde} (AA)
AA135	0,7749	0,2251
AA136	0,8408	0,1592
AA138	0,7477	0,2523
AA140	0,098	0,902
AA208	0,1957	0,8043
AA227	0,7205	0,2795
AA272	0,1301	0,8699
AA303	0,4297	0,5703
AA376	0,5176	0,4824
MQ122	0,8759	0,1241
MQ128	0,865	0,135
MQ134	0,9785	0,0215
MQ143	0,6274	0,3726
MQ157	0,983	0,017
MQ160	0,9683	0,0317
MQ182	0,9803	0,0197
MQ188	0,8131	0,1869
BG01	0,9545	0,0455
MQ207	0,7845	0,2155
MQ214	0,9714	0,0286
MQ215	0,9811	0,0189
MQ217	0,9398	0,0602
MQ238	0,9748	0,0252
MQ292	0,9821	0,0179
MQ295	0,9508	0,0492
BG02	0,9765	0,0235
MQ33	0,5115	0,4885
MQ332	0,9184	0,0816
MQ387	0,9802	0,0198
BG03	0,9681	0,0319
MQ438	0,9695	0,0305
MQ443	0,9795	0,0205
MQ444	0,9792	0,0208
MQ45	0,7911	0,2089
MQ454	0,9177	0,0823
MQ487	0,8715	0,1285
BG04	0,9644	0,0356
MQ63	0,9728	0,0272
MQ98	0,2172	0,7828

*Em negrito, indivíduos com contribuição genética maior da outra população.

4.2.5. Tamanho populacional efetivo (N_e) e investigação de gargalo populacional

Na análise mais conservadora do *NeEstimator v.201* (usando somente alelos com frequência superior a 0,05), o N_e da Baía de Guanabara foi estimado em 4, com um intervalo de confiança (IC) variando de 2,2 a 10,4. Nas análises menos conservadoras (usando somente alelos com frequência acima de 0,02 e de 0,01), os valores de N_e foram 7,7 (IC de 3,0 a 17,7) e 8,5 (IC de 3,2 a 19,3), respectivamente.

Os resultados gerados para a população de *S. guianensis* da Baía da Sepetiba indicam um N_e de 52,7 (análise com limite de 0,05, com IC de 14,7 a infinito), bem acima do observado para a Baía de Guanabara. A estimativa do tamanho populacional efetivo da Baía de Sepetiba ainda permaneceu superior a da Baía de Guanabara nas análises menos conservadoras: 36,2 (limite de 0,02, com IC de 13,4 a infinito) e 90,7 (limite de 0,01, com IC 24,3 a infinito).

O teste de *Wilcoxon* realizado no programa *Bottleneck v 1.2.02* não foi significativo para nenhum dos três modelos analisados ($\alpha = 0,05$). Para o IAM (Modelo de Alelos Infinitos), o valor de P foi de 0,687, enquanto para os modelos TPM (Modelo de Duas Fases) e SMM (Modelo de Mutação Passo a Passo) os valores de P foram 0,903 e 0,232, respectivamente. O teste de mudança da moda (“mode-shift”) revelou uma distribuição em forma de L, o que sugere que as distribuições das frequências alélicas se ajustam ao cenário esperado quando há equilíbrio mutação-deriva, ou seja, a perda de alelos raros não está ocorrendo de forma mais acelerada do que a perda da heterozigosidade.

4.2.6 Análises de parentesco

As análises de parentesco dos 39 indivíduos usando o *ML-Relate* geraram 784 comparações entre pares de indivíduos (díades). A partir desse conjunto de dados, selecionamos diferentes subconjuntos para análises. No primeiro subconjunto analisado, os indivíduos foram agrupados por região: dentro das áreas adjacentes (72 comparações), dentro da Baía de Guanabara (435 comparações) e entre áreas adjacentes e Baía de Guanabara (270 comparações). Nessa primeira análise, não houve distinção de sexo, de forma que tanto machos quanto fêmeas e os dois indivíduos sem sexo determinado foram incluídos. A análise revelou um parentesco

médio maior ($r = 0,187$) entre os indivíduos da Baía de Guanabara (FIGURA 15) do que entre os botos das áreas adjacentes ($r = 0,094$) e entre Baía de Guanabara e áreas adjacentes ($r = 0,087$). Apenas o índice observado na Baía de Guanabara indicou parentesco, pois foi maior do que 0,125.

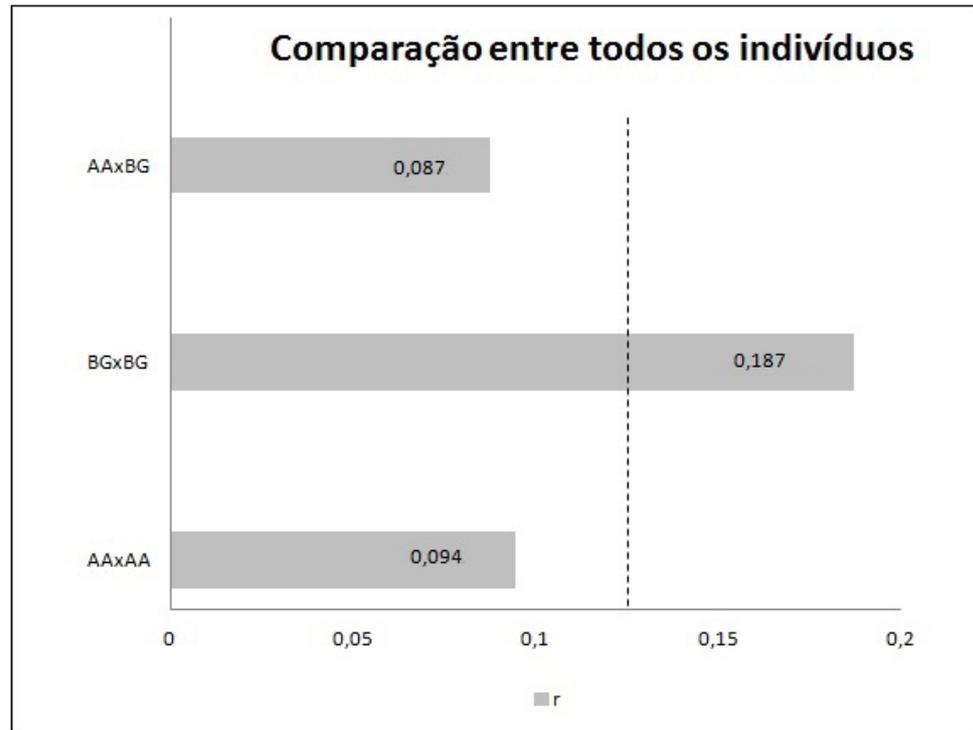


Figura 15: Índices de parentesco médios calculados entre todos os botos-cinza das áreas adjacentes (AA) e Baía de Guanabara (BG); dentro das áreas adjacentes e dentro da Baía de Guanabara. A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).

Na sequência, analisamos subconjuntos dentro de cada tipo de comparação entre díades (dentro da Baía de Guanabara, dentro das áreas adjacentes e entre Baía de Guanabara e áreas adjacentes) em função do sexo dos animais. Na Baía de Guanabara, a análise entre machos e fêmeas (210 comparações) gerou um r médio de 0,197, enquanto a análise entre machos e machos (91 comparações) gerou um r de 0,153 e a análise entre fêmeas e fêmeas (105 comparações) gerou um r de 0,220 (FIGURA 16). Dentro da Baía de Guanabara, em todos os casos houve indicação de parentesco, porém esse se mostrou maior entre fêmeas.

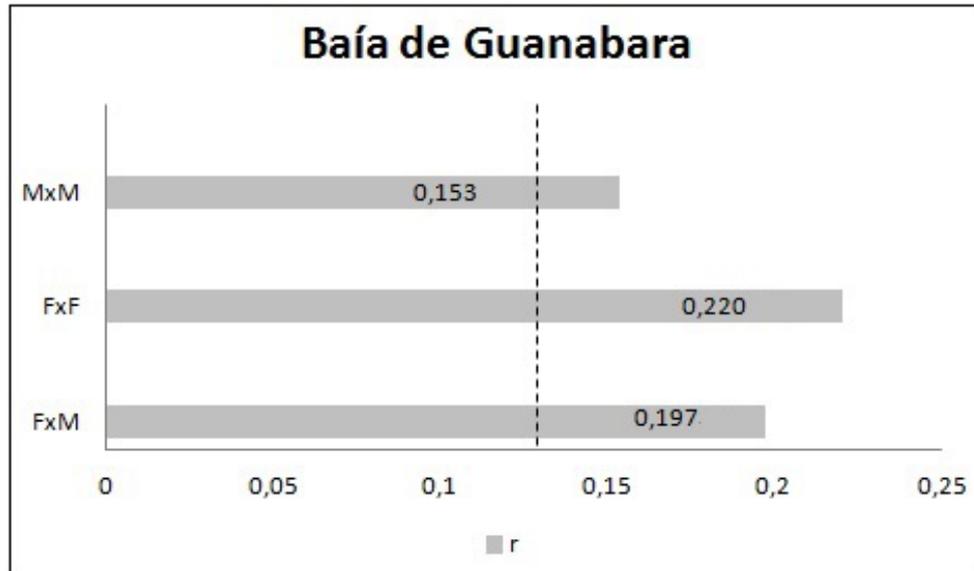


Figura 16: Índices de parentesco médios de botos-cinza da Baía de Guanabara, comparando díades só de machos (MxM), só de fêmeas (FxF) e de fêmea e macho (FxM). A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).

Ao considerarmos o subconjunto das áreas adjacentes em função do sexo, identificamos que machos e fêmeas (24 comparações) tiveram um r de 0,011, machos e machos (duas comparações) um r zero, e fêmeas e fêmeas (30 comparações) um r 0,119. Em nenhuma das situações houve indicação de parentesco (FIGURA 17).

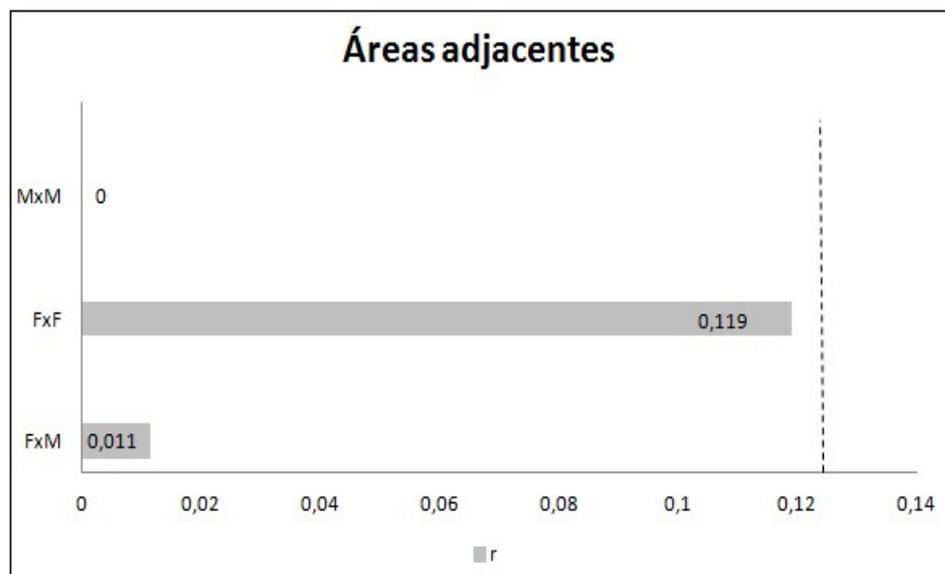


Figura 17: Índices de parentesco médios calculados apenas com botos-cinza das áreas adjacentes, comparando díades só de machos (MxM), só de fêmeas (FxF) e de fêmea e macho (FxM). A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).

As Figuras 18a-c reúnem as informações geradas acima, porém organizadas por sexo, ao invés de por área. Novamente, percebe-se que a Baía de Guanabara apresenta parentesco médio acima de 0,125 nas três comparações por sexo, enquanto os animais das áreas adjacentes não foram aparentados.

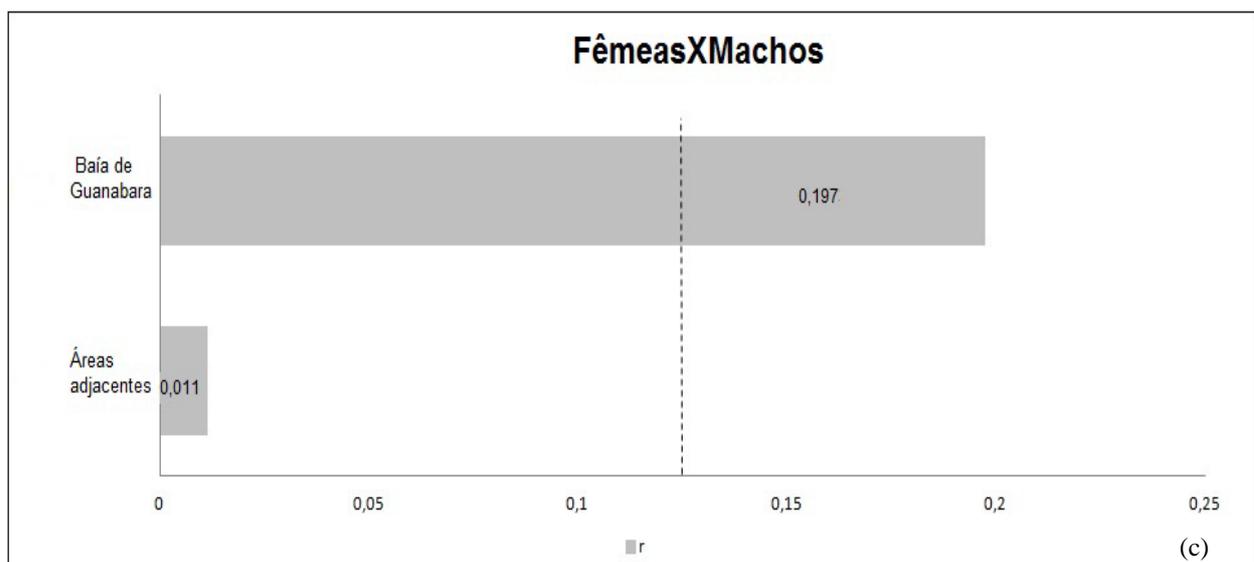
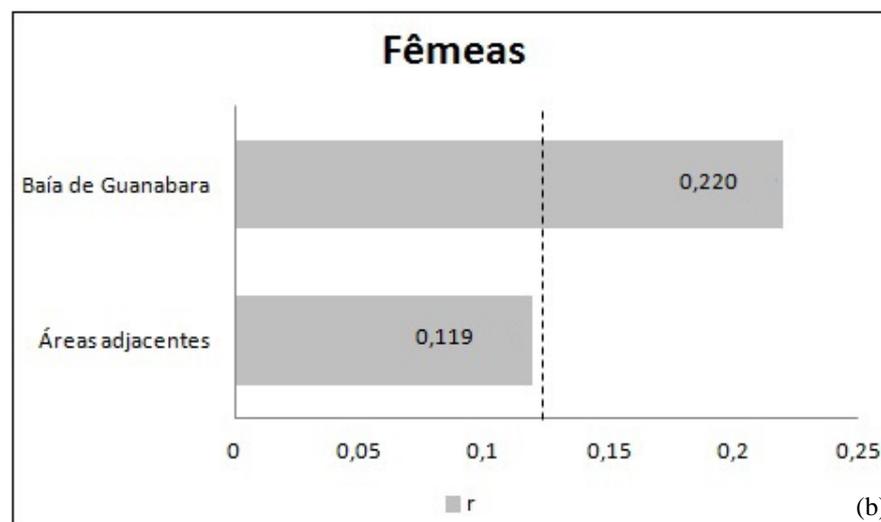
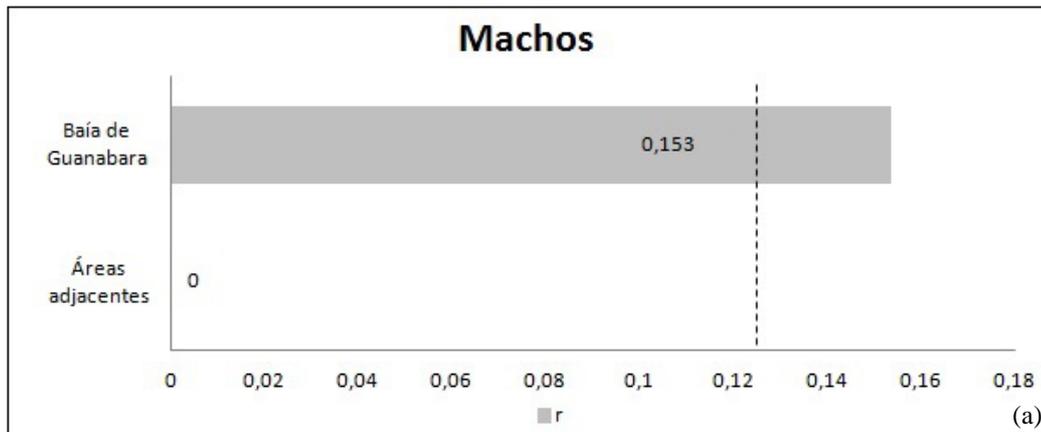


Figura 18: Análise de parentesco de botos-cinza da Baía de Guanabara e áreas adjacentes: (a) entre os machos; (b) entre as fêmeas e (c) entre fêmeas e machos. A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).

A análise de variância simples (ANOVA) para um fator e o teste de comparação múltipla de *Tukey* revelaram que as médias de parentesco observadas dentro das áreas adjacentes e dentro da Baía de Guanabara são estatisticamente diferentes, com valor de P igual a 0,007 (significativo, $\alpha = 0,05$) (FIGURAS 19a-c).

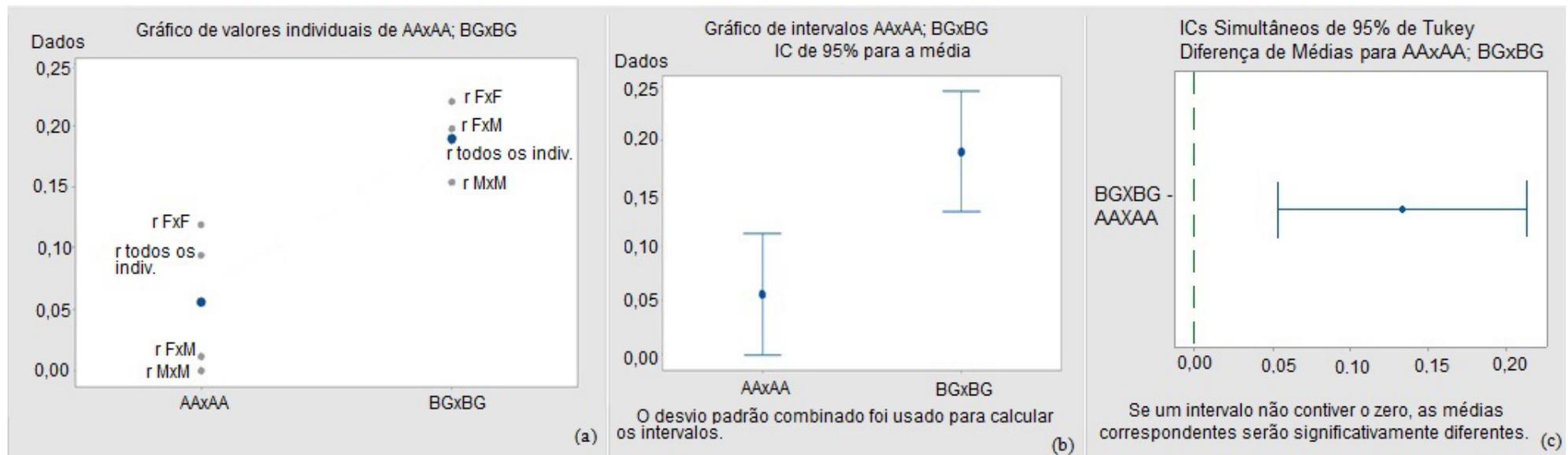


Figura 19: Valores médios de r gerados para parentesco de botos-cinza (*Sotalia Guianensis*) nas áreas adjacentes (AA) e dentro da Baía de Guanabara (BG). Em (a), valores individuais em cinza e pontos azuis representando médias (AA = 0,056; BG = 0,189); (b) intervalos de confiança a partir de desvio padrão combinado (0,046) e (c) intervalo de confiança que mostra a média de BG menos a média de AA.

A Figura 20a-c ilustra a análise da classe etária dentro dos grupos organizados por sexo na Baía de Guanabara. Entre machos, os indivíduos mais aparentados foram os filhotes e os juvenis ($r = 0,234$), enquanto os adultos e filhotes não foram relacionados geneticamente ($r = 0,029$). As investigações dentro do grupo de fêmeas indicaram que as díades mais aparentadas são aquelas formadas por adultas e juvenis ($r = 0,338$), enquanto as compostas por filhotes e juvenis tiveram menor parentesco ($r = 0,154$). Ao considerarmos as díades de fêmeas e machos,

notamos que os mais aparentados são as fêmeas adultas e os machos filhotes ($r = 0,299$) e os filhotes são os menos relacionados ($r = 0,120$).

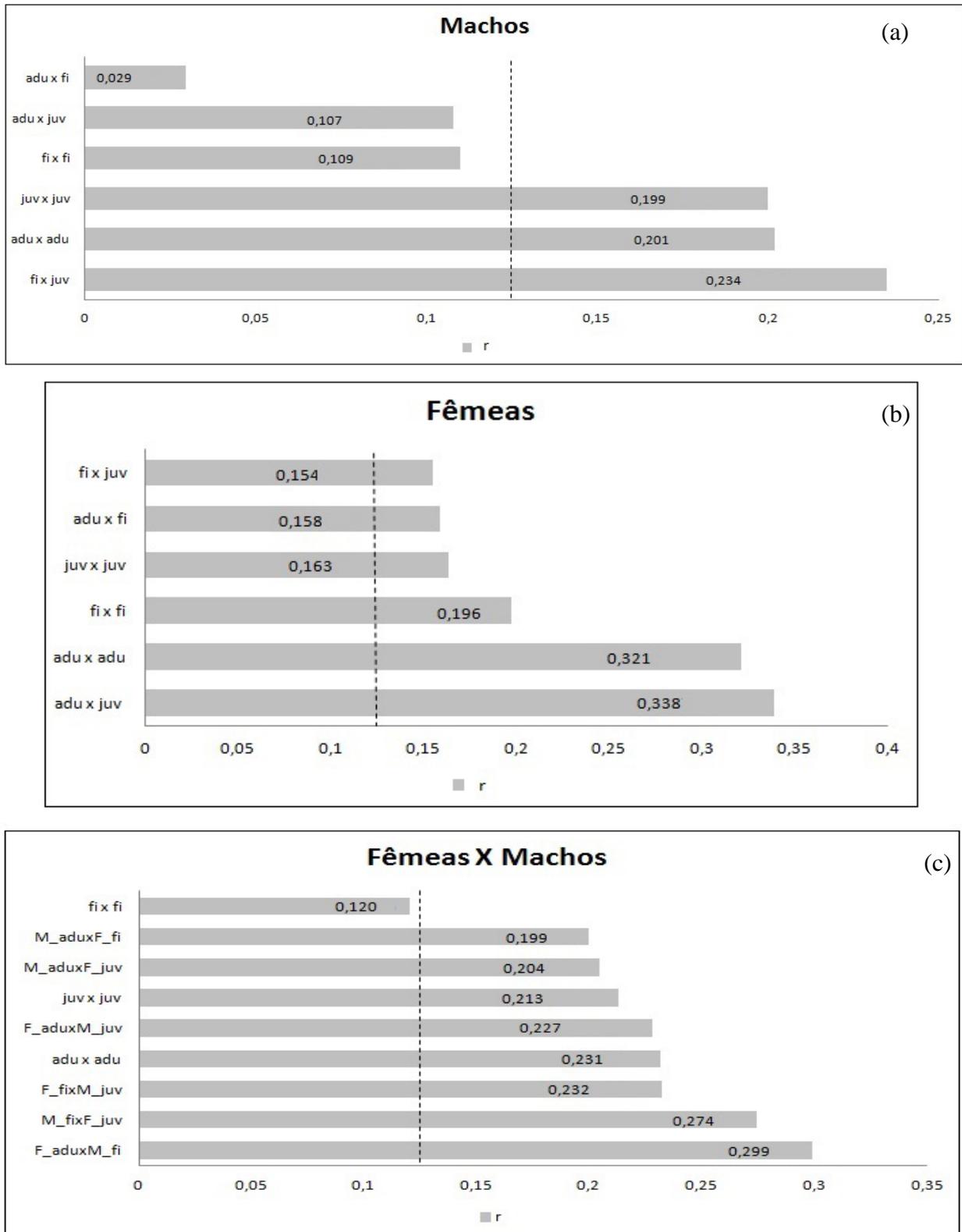


Figura 20: Análise de parentesco de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Baía de Guanabara por classe etária a partir da comparação de díades de filhotes (fi), adultos (adu) e juvenis (juv) exclusivas e misturadas: (a) entre os machos; (b) entre as fêmeas e (c) entre fêmeas e machos. No gráfico (c), fêmeas (F) e machos (M) foram discriminados nas análises em classes etárias diferentes. A linha tracejada indica o valor mínimo determinante de parentesco ($r = 0,125$).

A análise de variância simples (ANOVA) para um fator e o teste de comparação múltipla de Tukey revelaram que as médias de parentesco observadas por classe etária dentro dos grupos segmentados por sexo na Baía de Guanabara não são estatisticamente diferentes, com valor de P igual a 0,515 ($\alpha = 0,05$) (FIGURA 21). Na Figura 22a-b, intervalos de confiança de 95% para a média.

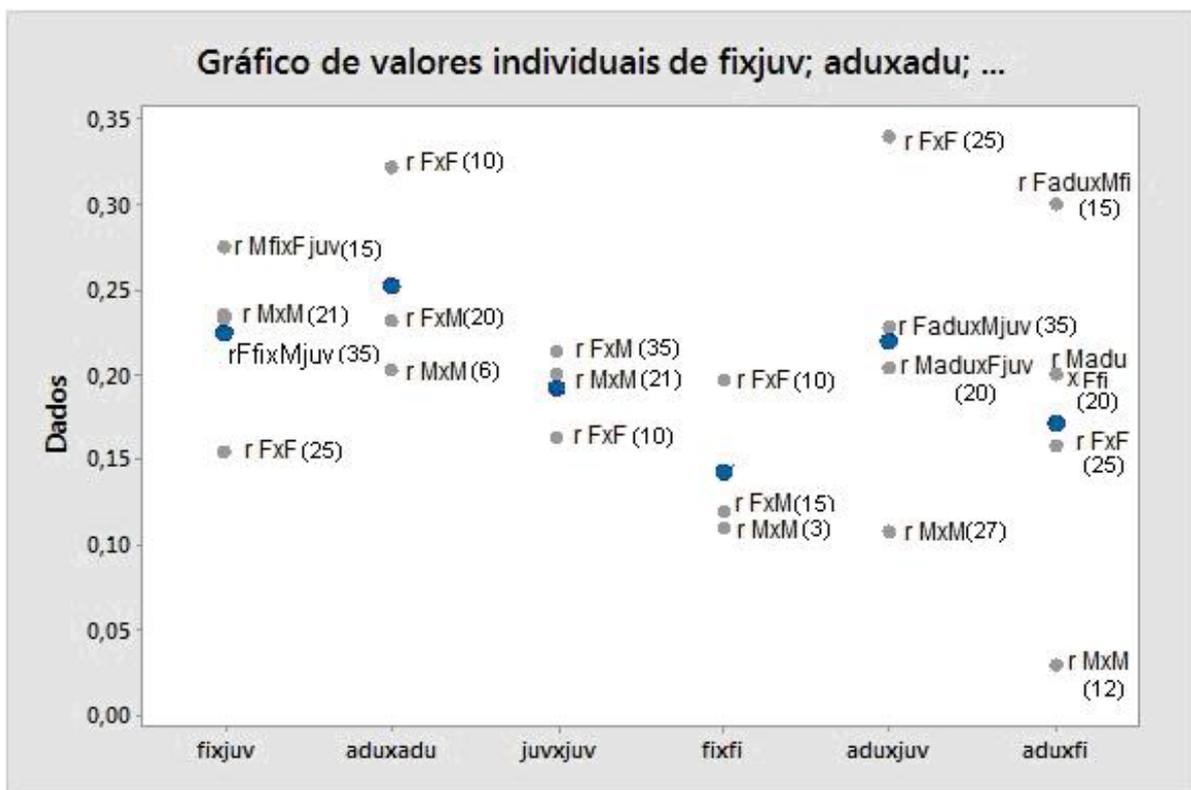


Figura 21: Valores médios de r gerados para parentesco de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em grupos organizados por sexo (machos vs. machos; fêmeas vs. fêmeas e fêmeas vs. machos) para díades definidas por classe etária: filhote vs. filhote (fixfi); filhote vs. juvenis (fixjuv); filhotes vs. adultos (fixadu); adulto vs. adultos (aduxadu); adulto vs. juvenis (aduxjuv) e juvenis vs. juvenis (juvxjuv). Valores individuais em cinza e pontos azuis representando médias (fixjuv = 0,224; aduxadu = 0,251; juvxjuv = 0,192; fixfi = 0,142; aduxjuv = 0,219 e aduxfi = 0,171) e entre parênteses número de díades comparadas dentro de cada categoria.

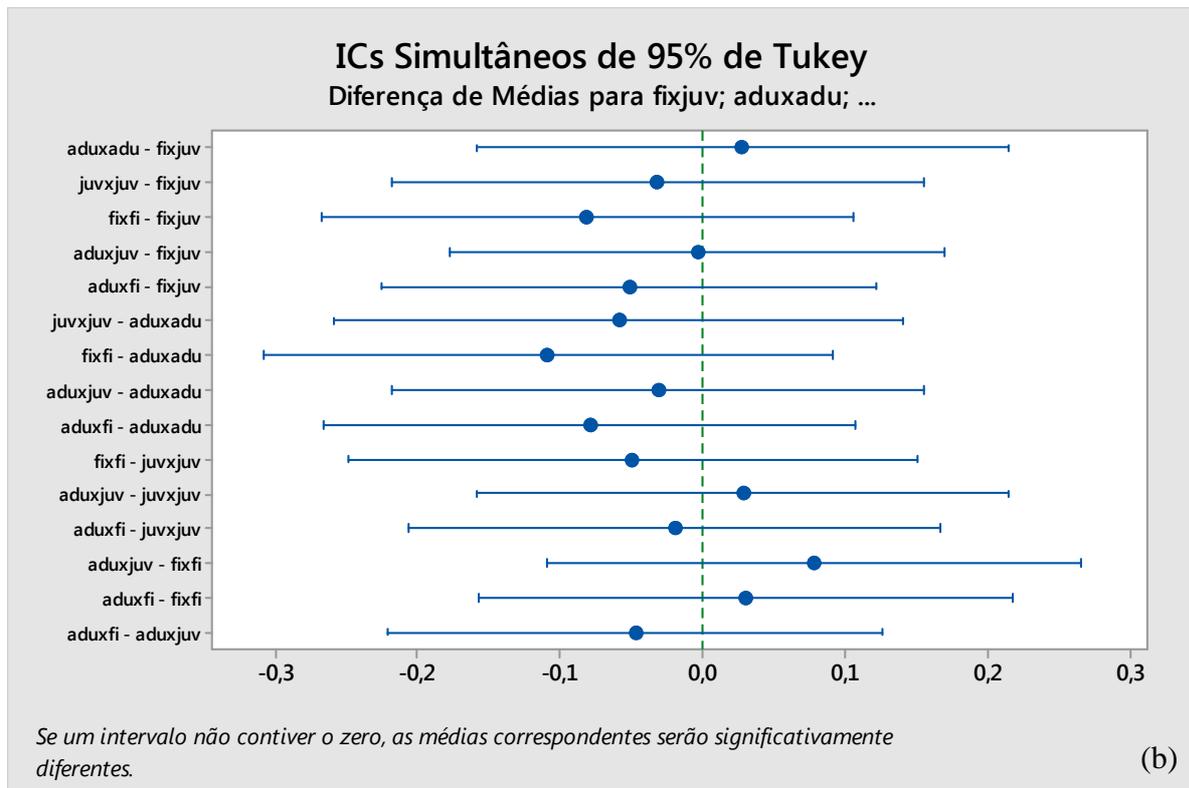
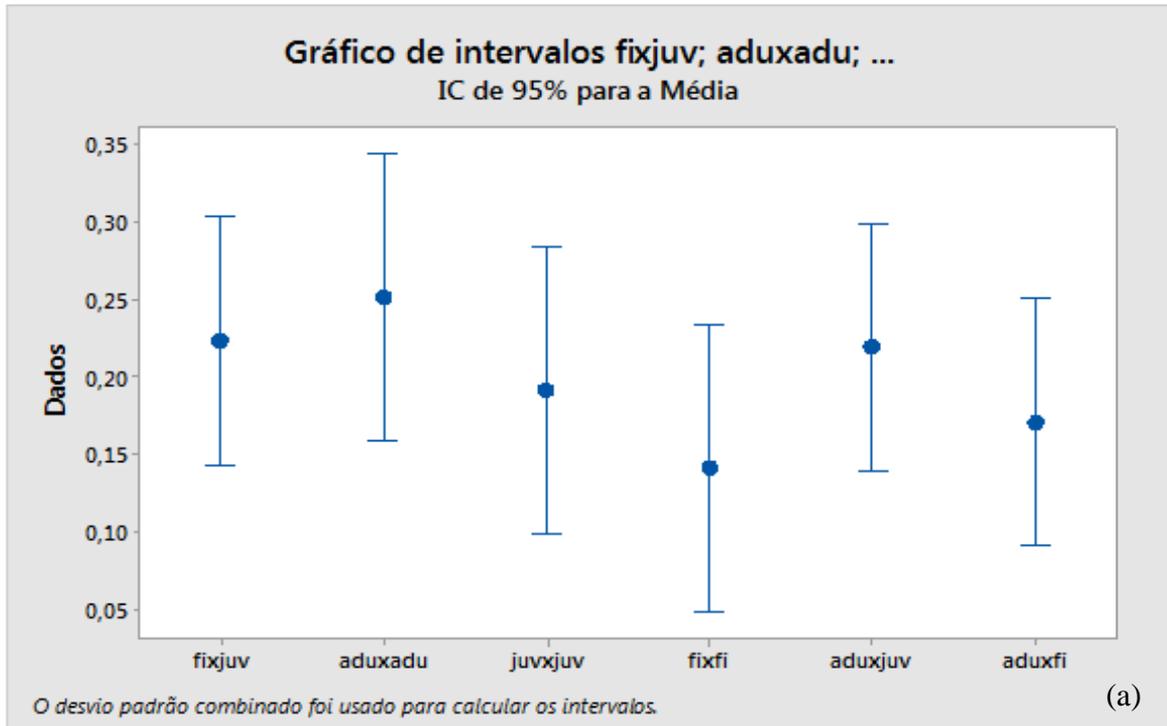


Figura 22: Valores médios de r gerados para parentesco de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em grupos organizados por sexo (machos vs. machos; fêmeas vs. fêmeas e fêmeas vs. machos) para díades definidas por classe etária: filhote vs. filhote (fixfi); filhote vs. juvenis (fixjuv); filhotes vs. adultos (fixadu); adulto vs. adultos (aduxadu); adulto vs. juvenis (aduxjuv) e juvenis vs. juvenis (juvxjuv). Em (a), intervalos de confiança a partir de desvio padrão combinado (0,075) e (b) intervalo de confiança que mostra a média de cada díade menos a média de outra díade.

5. DISCUSSÃO

5.1 Variabilidade genética: baixa riqueza alélica e diversidade

O estudo da variabilidade genética é extremamente importante, pois a variação é a base para a seleção natural, representando, portanto, um componente fundamental para a evolução das espécies (ALLCOCK *et al.*, 1995). A comparação entre os animais das áreas adjacentes e da Baía de Guanabara mostrou que essa última possui riqueza alélica menor para todos os marcadores, com exceção do locus *sgui003* que foi monomórfico nos botos-cinza de fora da baía. Na Baía de Guanabara, por sua vez, o monomorfismo ocorreu no marcador *sgui007*. É interessante destacar que a variabilidade foi menor na Baía de Guanabara mesmo com um número três vezes maior de animais analisados ($N = 30$) do que nas águas adjacentes ($N = 9$). Notamos ainda que os indivíduos da Baía de Guanabara possuem um número maior de alelos privados ($N = 13$) do que os animais das áreas adjacentes ($N = 10$). A esses resultados é importante acrescentar ainda o déficit de heterozigotos identificado tanto pelo *Micro-checker* quanto nas análises de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Todos esses achados sugerem uma perda de variabilidade genética da população de botos-cinza da Baía de Guanabara.

Entre os fatores que podem estar contribuindo para esse cenário, está a redução do tamanho populacional, tal como evidenciado a partir do monitoramento dos últimos 20 anos na Baía de Guanabara, visto que esse processo pode levar à perda de diversidade genética. Como lembram Solé-Cava e Cunha (2012), a redução do tamanho populacional efetivo é um dos principais responsáveis pela perda de variabilidade em populações ameaçadas de extinção. Em estudos com o golfinho-de-hector (*Cephalorhynchus hectori*), Pichler e Baker (2000) também encontraram diversidade genética reduzida na Ilha Norte e na costa leste da Nova Zelândia, o que consideraram ter sido causado pela redução do tamanho das populações, em função da elevada mortalidade dos animais em redes de pesca. Mas é possível ainda que outros elementos, além do declínio populacional, estejam por trás da baixa variabilidade genética. Estudos realizados com *Phocoena sinus*, popularmente conhecida como vaquita, boto-do-pacífico ou toninha-do-golfo, também encontraram baixa diversidade genética (ROSEL e ROJAS-BRACHO, 1999), no entanto, sua homogeneidade parece ter sido causada por efeito fundador na origem da espécie (TAYLOR e ROJAS-BRACHO, 1999).

Níveis moderados de diversidade genética e baixa riqueza alélica também foram observados em *Sotalia guianensis* em outras áreas (CUNHA *et al.*, 2005; HOLLATZ *et al.*, 2011). Cunha e colaboradores (2005) e Cunha (2007) utilizaram a região controle do DNA mitocondrial e microssatélites para investigar amostras de *S. guianensis* coletadas nas Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Esses trabalhos revelaram baixa diversidade entre amostras do Sul/Sudeste. Nesse caso, os autores consideraram que esse achado seria o resultado da colonização dessa região a partir de um número reduzido de indivíduos (efeito fundador). A expansão de *Sotalia guianensis* ao longo da costa brasileira teria ocorrido no sentido norte-sul, sendo que, ao atingir essa última área, barreiras biogeográficas teriam possivelmente limitado a continuação da expansão (CUNHA *et al.*, 2005). Já em Hollatz e colaboradores (2011) a região controle do DNA mitocondrial e microssatélites foram usados para investigar indivíduos das baías de Sepetiba e Paraty. Estes autores também acreditam que um efeito fundador tenha sido determinante para os baixos níveis de diversidade observados. A heterozigosidade média observada no presente estudo para a Baía de Guanabara (0,249) foi um pouco menor do que a verificada por Santos (2015) para a mesma localidade (0,277). A análise de Santos (2015) também realizada com microssatélites específicos para *S. guianensis* apontou que a variabilidade genética da Baía de Guanabara foi inferior à observada entre os indivíduos da Baía de Sepetiba ($H_o = 0,308$), mas ligeiramente superior àquela encontrada na Baía de Ilha Grande ($H_o = 0,227$).

Outro fator que pode contribuir para a perda de variabilidade genética é uma organização social matrifocal (HOELZEL *et al.*, 1998; WHITEHEAD *et al.*, 2000). Em um estudo com orcas (*Orcinus orca*) das águas costeiras da Califórnia até o Alasca, Hoelzel e colaboradores (1998) consideraram que a baixa variabilidade genética observada a partir da análise de três marcadores nucleares e da região controle do DNA mitocondrial seria compatível com uma estruturação populacional matrifocal e com tamanho efetivo pequeno. Para Whitehead (1998), a cultura parece contribuir também para a baixa diversidade mitocondrial em sistemas matrifocais. O autor entende cultura, de acordo com o conceito de Boyd e Richerson (1985), ou seja, como uma informação que pode causar variação no comportamento e que é adquirida a partir de indivíduos da mesma espécie por imitação ou aprendizado. Se a transmissão cultural de comportamentos aumentar a sobrevivência ou reprodução de indivíduos aparentados, alelos neutros podem ser transmitidos ao longo das linhagens matrilineares, e a longo prazo as linhagens tenderiam a fixar tais alelos, mesmo sem que eles sejam diretamente selecionados.

5.2 Déficit de heterozigotos: endocruzamento

Tanto as áreas adjacentes quanto a Baía de Guanabara apresentaram déficits de heterozigotos, no entanto, é possível que fatores distintos estejam por trás desses resultados em cada uma das localidades analisadas. Solé-Cava e Cunha (2012) argumentam que mais do que a perda de variabilidade genética, um problema crucial em populações ameaçadas é o endocruzamento. Isso porque, segundo os autores, enquanto a variabilidade gênica reduzida prejudica o potencial de resposta a desafios ambientais, o endocruzamento leva ao aumento da expressão de genes deletérios na população (depressão por endocruzamento).

Na nossa análise, encontramos um índice de endocruzamento (F_{IS}) significativo para a Baía de Guanabara. Essa informação somada à redução populacional observada e à baixa variabilidade sugere que provavelmente o déficit de heterozigotos observado na Baía de Guanabara seja consequência do endocruzamento. A deriva gênica, força evolutiva que atua mais intensamente em populações pequenas e que reduz a variabilidade, também pode ser levada em consideração.

Outro dado que parece corroborar o endocruzamento relevante entre os botos da Baía da Guanabara é o resultado do teste de alelos nulos feito no programa *Micro-checker*. Essa análise mostrou que dos 11 marcadores utilizados na pesquisa cinco apresentaram evidência de alelos nulos, com déficit de heterozigotos. Alelos nulos são causados por mutações nas regiões flangeadoras dos microssatélites que impedem o anelamento de um dos iniciadores e a amplificação de um dos alelos em indivíduos heterozigotos para aquele alelo (JARNE e LAGODA, 1996). Com isso, indivíduos originalmente heterozigotos para esse alelo parecem ser homozigotos e as genotipagens resultam em déficit de heterozigotos e excesso de homozigotos. Todas as equações (Brookfield 1, Brookfield 2, Chakraborty e colaboradores e Oosterhout) usadas para estimar a frequência de alelos nulos fazem esse cálculo a partir da deficiência de heterozigotos, assumindo a panmixia. Na prática, isso significa que os estimadores consideram que a deficiência heterozigótica é resultado de alelos nulos e não de outros mecanismos, entre eles, efeito *Wahlund*, endocruzamento ou cruzamentos direcionados (TAVARES, 2007). Segundo Chybicki e Burczyk (2009), esses estimadores comumente superestimam a frequência de alelos nulos quando são utilizados em populações que experimentam alguma endogamia.

Outros fatores, como a residência dessa população, os aspectos ecológicos, o declínio populacional recente e o baixo tamanho populacional efetivo, indicam que o déficit de heterozigotos observado na Baía de Guanabara no presente estudo parece ser mais um indicativo de endocruzamento do que da presença de alelos nulos. De fato, considerando também os resultados que obtivemos com relação ao grau de parentesco dos botos da Baía de Guanabara (veja seção a seguir), temos evidências de consanguinidade entre esses animais.

Confirmando a previsão teórica, simulações têm demonstrado que o endocruzamento afeta negativamente a persistência das populações. O'Grady e colaboradores (2006) observaram, a partir de projeções computacionais estocásticas, que o endocruzamento pode diminuir os tempos médios de extinção em 37%. Na análise, o grupo considerou os efeitos da endogamia em populações naturais de mamíferos e aves. As comparações foram feitas com e sem efeito do endocruzamento e em populações com 100, 500 e 2000 indivíduos. Para os autores, esses achados apontam que o endocruzamento representa uma das principais ameaças para a maioria dos táxons de mamíferos e aves cujas populações atingem tamanhos que variam de pequeno a moderado, ou seja, com pouco menos de 1000 indivíduos. Para Taylor e Rojas-Bracho (1999), o endocruzamento sofrido no passado pela vaquita (*Phocoena sinus*) foi determinante para o seu atual estado de conservação alarmante: esse cetáceo é classificado como criticamente ameaçado pela IUCN. Por meio de simulações, os autores observaram que mais de 84% das fixações alélicas ocorreram no passado e não no declínio populacional recente. Ou seja, os autores defendem que a baixa variabilidade é decorrência de um evento fundador na origem da espécie, e não do gargalo sofrido nas últimas gerações. Assim, a espécie seria naturalmente rara desde sua origem. Refletindo sobre esse contexto, vemos que uma das possibilidades para explicar o cenário seria que o fato da espécie permanecer com variabilidade reduzida por um longo tempo pode ter levado a eliminação dos genes altamente deletérios ao longo da evolução. Mas, mesmo assim, ainda haveria genes levemente deletérios, que poderiam trazer problemas como malformações, no entanto, eles não levariam à morte, tampouco impediriam a reprodução (LYNCH, 1995).

Alguns autores têm mostrado, no entanto, que dado os custos do endocruzamento, mecanismos para evitá-lo podem ser selecionados quando forem menos custosos do que os efeitos do próprio endocruzamento (WASER *et al.*, 1986; KOKKO e OTS, 2006). Nessas situações, a escolha de parceiros geneticamente diferentes (AMOS *et al.*, 201; HOFFMAN *et al.*, 2007), a dispersão do sítio de nascimento (GREENWOOD, 1980) ou a capacidade de diferenciar os parentes (BLOUIN e BLOUIN, 1988) seriam, por exemplo, estratégias favorecidas pela

seleção natural. No entanto, estudos com populações naturais sugerem que, mesmo diante dos efeitos deletérios causados pelo endocruzamento, nem sempre os mecanismos para evitá-lo são selecionados e perpetuados entre os indivíduos. Frère e colaboradores (2010) apresentam, por exemplo, o caso dos *Tursiops* sp. de Shark Bay, Austrália. Os autores encontraram níveis de endocruzamento maiores do que os esperados ao acaso nesses animais e observaram ainda que tanto fêmeas endocruzadas quanto aquelas com filhotes endocruzados têm o valor adaptativo (medido pelo sucesso no parto) reduzido. Além disso, a pesquisa australiana mostra que fêmeas que têm filhotes mais cedo possuem mais chances de serem endocruzadas, o que, para a equipe, indica que a idade das fêmeas, bem como a experiência, são fatores determinantes na prevenção do endocruzamento, ou seja, fêmeas mais jovens seriam mais vulneráveis a cruzar com parentes por desconhecerem sua relação de consanguinidade com machos mais velhos. Todas essas questões parecem pertinentes também para os botos da Baía de Guanabara, pois, além dos dados genéticos fornecidos nesse estudo e discutidos acima, dados ecológicos mostram que, atualmente, um pequeno grupo de fêmeas experientes é responsável pela geração de filhotes, pois algumas fêmeas não têm dado à luz e outras perdem seus filhotes nos primeiros meses de vida (AZEVEDO AF, comunicação pessoal).

Já nas áreas adjacentes a explicação para um índice de endocruzamento (F_{IS}) ainda mais significativo do que dentro da Baía de Guanabara (0,336 vs. 0,280) é diferente. Nossa hipótese é que o valor elevado de F_{IS} não esteja refletindo o endocruzamento nas áreas adjacentes, mas sim seja consequência de uma distorção causada pelo efeito *Wahlund*. Quando analisamos as frequências genotípicas em uma população grande e panmítica, observamos um dado número de homozigotos. Se conduzirmos a mesma análise agrupando populações subdivididas, ao combinarmos as médias dessas frequências chegaremos a um valor superior àquele encontrado quando apenas um conjunto de dados foi avaliado. Esse excesso de homozigotos (ou deficiência de heterozigotos) acontece porque os cruzamentos não estão ocorrendo ao acaso entre todos os indivíduos, mas sim preferencialmente dentro das populações. A esse efeito matemático no qual encontramos frequências elevadas de homozigotos ao analisar conjuntamente populações subdivididas dá-se o nome de efeito *Wahlund* (RIDLEY, 2006).

É possível, portanto, que o efeito *Wahlund* esteja por trás do déficit de heterozigotos nas áreas adjacentes, visto que os nove indivíduos incluídos nessa categoria foram recolhidos em diferentes áreas, sendo algumas relativamente distantes. Os municípios de Barra de Guaratiba e Rio das Ostras são separados, por exemplo, por 211 km. Rio das Ostras (22°31'37"S, 41°56'42"W) faz parte da costa centro-norte do estado do Rio de Janeiro e *Sotalia guianensis* é

frequentemente observada nessa região (SICILIANO *et al.*, 2006). Por outro lado, a costa centro-sul do Rio de Janeiro abriga, além da Baía de Guanabara, outras populações residentes de boto, sendo elas Baía de Sepetiba (FLACH *et al.*, 2008a; FLACH *et al.*, 2008b) e Baía de Ilha Grande (LODI e HETZEL, 1998; ESPÉCIE *et al.*, 2010 e SOUZA, 2013). Nesta última, há ainda a Baía de Paraty que compõe o complexo da Baía de Ilha Grande (KREBS, 2008). A diferenciação populacional entre os botos das baías costeiras do Rio de Janeiro tem sido revelada a partir de dados genéticos (HOLLATZ *et al.*, 2011; SANTOS, 2015), por isótopos estáveis (BISI *et al.*, 2012), organoclorados (VIDAL, 2010) e emissões sonoras (ANDRADE, 2010).

Da mesma forma que nas baías costeiras, é possível que haja mais de uma população nas áreas adjacentes, ou ainda, que alguns indivíduos recolhidos fora da Baía de Guanabara sejam, na realidade, integrantes da população residente da Baía de Guanabara (caso dos indivíduos coletados em Niterói). Os resultados observados no Structure corroboram essa hipótese, pois, na população formada por indivíduos das áreas adjacentes, justamente os dois animais recolhidos em Niterói (MQ135, MQ136; fêmea e seu filhote), apresentaram composição genética maior da Baía de Guanabara. Outros três indivíduos apresentaram genótipos misturados, sendo eles de Barra de Guaratiba (MQ138, fêmea juvenil/adulta), Restinga da Marambaia (MQ227 juvenil/adulto) e outro da Praia da Reserva (MQ376, macho juvenil/adulto). As análises de parentesco indicam que à exceção dos animais citados acima e de outro recolhido fora da Baía (fêmea de Rio das Ostras juvenil/adulta), a maioria dos botos das áreas adjacentes não apresenta parentesco nenhum, ou seja, das 72 comparações feitas, 50 (69,4%) revelaram índices r iguais a zero. A ausência de consanguinidade pode ser um indicativo também de que, de fato, indivíduos provenientes de populações diferentes foram reunidos na categoria áreas adjacentes, o que corrobora a possibilidade da deficiência de heterozigotos ter sido causada pelo efeito *Wahlund*.

5.3 Diferenciação genética: evidências a partir da análise Bayesiana de agrupamento e atribuição e do F_{ST}

Tanto o F_{ST} quanto a análise Bayesiana de agrupamento e atribuição suportaram a existência de diferenciação genética entre os animais de dentro da Baía de Guanabara e os de fora dessa área. O resultado obtido a partir do F_{ST} foi mais sutil do que o revelado na análise Bayesiana, uma vez que o valor encontrado ($F_{ST} = 0,040$; $P = 0,049$) ficou próximo ao limite de

significância. De fato, o F_{ST} se mostra menos sensível à detecção de diferenciação genética sutil, tal como a esperada em análises de microescala. É possível, por exemplo, que a definição de grupos *a priori*, exigida pelo F_{ST} , tenha afetado a análise, pois, tal como discutido anteriormente, há indícios de que tenhamos tratado locais de mistura populacional como homogêneos (SOLE-CAVA e CUNHA, 2012). Nesse sentido, a análise Bayesiana de agrupamento e atribuição realizada no Structure, utilizando modelo de mistura e informação geográfica como *prior* (HUBISZ *et al.*, 2009), se mostra mais sensível para detectar diferenciações sutis (estruturação fraca), tal como a observada entre subpopulações intraespecíficas residentes de uma região com formação recente, como é o caso da Baía de Guanabara (cerca de 3000-3500 anos, AMADOR, 1997; SEMA, 1998). O modelo proposto por HUBISZ e colaboradores (2009) também é mais adequado para casos em que o tamanho amostral é reduzido, além de ser capaz de ignorar a informação geográfica quando os indícios acerca de estruturação populacional não são evidentes ou quando a estrutura se mostra incoerente com os locais deduzidos na amostragem.

Além disso, é importante lembrar, tal como citado acima, que há a possibilidade de indivíduos de dentro da Baía de Guanabara terem sido atribuídos de forma equivocada às áreas adjacentes, visto que pela análise Bayesiana de agrupamento e atribuição cinco indivíduos alocados nesse último conjunto apresentaram maior composição genética da Baía de Guanabara. Combinando esse resultado com as análises do *ML-Relate*, notamos que esses cinco animais apresentaram índices de parentesco relativamente elevados entre si, sendo o maior deles obtido entre a fêmea e seu filhote de Niterói ($r = 0,6634$), tal como esperado. Além dessa díade, notamos alto grau de parentesco entre a fêmea de Niterói e o indivíduo da Marambaia ($r = 0,657$), bem como entre o filhote de Niterói e o de Marambaia ($r = 0,2966$) e entre a fêmea de Niterói e a fêmea de Barra de Guaratiba ($r = 0,3484$). Apenas o macho da Praia da Reserva se mostrou mais distante não apresentando parentesco com nenhum desses animais, com exceção da fêmea de Niterói ($r = 0,138$). Assim, se algum desses animais, de fato, foi atribuído de maneira equivocada às áreas adjacentes, a reagrupação dos mesmos dentro do conjunto amostral da Baía de Guanabara poderia aumentar o sinal de estruturação observado e talvez torná-lo até mesmo mais perceptível pelo F_{ST} .

A diferenciação genética observada nesse estudo era esperada, pois, tal como citado acima, tem sido evidenciada em diferentes populações de *S. guianensis* do estado do Rio de Janeiro. Hollatz e colaboradores (2011) observaram diferenciação genética entre botos-cinza machos da Baía de Paraty e da Baía de Sepetiba. Recentemente, um estudo de Santos (2015) apontou diferenciação genética entre os animais das baías de Guanabara, Sepetiba e Ilha Grande.

Essas informações são acompanhadas por dados biogeoquímicos e ecológicos que também apontam delimitações populacionais (BISI *et al.*, 2012; VIDAL, 2010; ANDRADE, 2010 e SANTOS, 2015).

Segundo Wright (1978), é possível observar três tipos principais de estruturação de populações: (a) isolamento por distância; (b) modelo de ilhas e (c) modelo passo-a-passo ("stepping stones"). Tal como proposto por Cunha (2003), é possível que esse último modelo ("stepping stones") seja o mais adequado para explicar o fluxo gênico em *S. guianensis*, visto que o hábito costeiro implica em uma distribuição ao longo de um único eixo dimensional. Por esse modelo, cada subpopulação somente troca migrantes com as populações vizinhas (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012). Isso indica que a probabilidade de cruzamentos dentro de cada subpopulação é maior do que a probabilidade de cruzamento entre indivíduos de subpopulações diferentes. Mas embora menos frequente, esse cruzamento interpopulações ocorre, porém, diferentemente do modelo de ilhas, no qual a distância entre as subpopulações não é determinante para estabelecer o nível de fluxo gênico interpopulações, no modelo passo-a-passo, a probabilidade de ocorrer cruzamento entre indivíduos de subpopulações diferentes está relacionada à distância geográfica, assim a chance desse cruzamento ocorrer aumenta quando as subpopulações estão mais próximas entre si. Wright propôs, com base no modelo de ilhas, que um migrante por geração bastaria para impedir a diferenciação por deriva. Segundo Slatkin (1985), essa previsão também parece relevante para o modelo "stepping stones". Nesse ponto, é interessante registrar que recentemente foi identificada a entrada de quatro indivíduos provenientes da Baía de Sepetiba na Baía de Guanabara, também localizada no centro-sul do Rio de Janeiro. Esses animais foram reconhecidos a partir de fotoidentificação (AZEVEDO AF, comunicação pessoal). Esse dado reforça a ideia de que, em *S. guianensis*, a estruturação parece ocorrer a partir do modelo passo-a-passo. A análise Bayesiana de agrupamento e atribuição indicou que, dentro da Baía de Guanabara, há pelo menos um indivíduo que apresenta alta proporção genotípica correspondente à população das áreas adjacentes (MQ98, feto) e há outros (MQ33, macho e MQ143, macho) que também possuem contribuição genotípica relevante da população verde (aproximadamente 40%). Essas informações corroboram a sutileza da diferenciação genética dos animais da Baía de Guanabara, o que era esperado, visto que se trata de uma análise em microescala.

Quanto à análise de estruturação populacional conduzida nesse trabalho, vale ressaltar que há limitações em função do tamanho amostral reduzido das áreas adjacentes ($N = 9$), e da possível sobreposição de gerações dos indivíduos do interior da Baía de Guanabara. No entanto,

esse estudo não teve como objetivo principal a investigação da existência de estruturação populacional. Os animais recuperados fora da Baía de Guanabara atuaram principalmente como um grupo controle para a análise de diversidade genética e parentesco da população da Baía de Guanabara.

5.4 Tamanho populacional efetivo e teste de gargalo populacional

O tamanho efetivo (N_e) é uma questão importante para populações ameaçadas (WRIGHT, 1931). Trata-se do número de indivíduos que efetivamente está contribuindo para a evolução da população (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012). Nesse sentido, indivíduos jovens e velhos demais para a reprodução, por não contribuírem para a formação da próxima geração, não são incluídos. Há uma relação entre variação genética e tamanho populacional efetivo, tal como expresso pelo modelo de alelos infinitos de Wright (1978), no qual a heterozigosidade esperada pode ser estimada a partir do tamanho efetivo e da taxa de mutação de um gene. Logo, o declínio do tamanho efetivo de uma população é um dos principais responsáveis pela perda de variabilidade em populações ameaçadas de extinção (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012).

Nossa análise apontou um N_e para a Baía de Guanabara de quatro indivíduos, com um intervalo de confiança (IC) variando de 2,2 a 10,4. Nas análises menos conservadoras (incluindo alelos com frequências de 0,02 e 0,01), os valores de N_e foram 7,7 (IC de 3,0 a 17,7) e 8,5 (IC de 3,2 a 19,3), respectivamente. Em todos os cenários possíveis, o N_e não ultrapassa duas dezenas, o que indica que menos de 20 indivíduos estão efetivamente contribuindo para a evolução da população. Segundo Whitehead (1998), cetáceos organizados em sistemas matrifocais têm tamanhos efetivos consideravelmente reduzidos. Em um estudo com o golfinho-chileno (*Cephalorhynchus eutropia*), Pérez-Alvarez e colaboradores (2015) identificaram um N_e de 101 para a população do Sul do Chile e um N_e de 39 para os indivíduos da região Norte. Já análises de Santos (2011) com toninhas (*Pontoporia blainvillei*) ($N = 253$), que indicaram estruturação em três grupos – (1) Rio de Janeiro/Espírito Santo; (2) São Paulo/Paraná e Norte de Santa Catarina e (3) Sul de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina –, revelaram tamanhos efetivos de 23,8; 56,2 e 622,1, respectivamente. Em um estudo com o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops aduncus*) da Moreton Bay, Austrália, Ansmann e colaboradores (2013) apontam um N_e de 56 para indivíduos do Sul ($N = 51$) e de 126 para os do Norte ($N = 47$). Em

todos os estudos nos quais o tamanho efetivo alcançou a faixa de algumas dezenas, os autores se mostram preocupados com a viabilidade das populações. O N_e da Baía de Guanabara é ainda mais baixo do que os valores considerados alarmantes nos estudos acima. Em *S. guianensis*, estudos apontando o tamanho efetivo são escassos, o que limita a comparação dos dados. Mas nossa análise com botos-cinza da Baía de Sepetiba (N_e de 52,7) também corrobora que, na Baía de Guanabara, a situação é extremamente preocupante. Um N_e de quatro indica que o tamanho populacional (censo) da população na geração anterior deveria ser em torno de 20 a 40 botos (FRANKHAM, 1995; PALSTRA e FRASER, 2012). Isso porque a razão média entre N_e/N obtida em meta-análises estaria entre de 0,1 (FRANKHAM, 1995) e 0,2 (PALSTRA e FRASER, 2012). Esses tamanhos populacionais na BG parecem subestimados já que dados de fotoidentificação apontam para uma população maior na geração anterior (AZEVEDO et al., 2004). A falta de precisão pode decorrer da sobreposição de gerações em nossa amostra e/ou ao endocruzamento na BG, que podem ter reduzido significativamente o N_e . Alternativamente, a relação N_e/N nos botos-cinza pode não corresponder à razão média, já que Palstra e Fraser (2012) relatam grande variação entre grupos taxonômicos com história de vida distintas. Estudos de Soulé e Wilcox (1980) e Franklin (1998) apontam que, em teoria, um tamanho populacional efetivo mínimo para evitar depressão por endocruzamento seria de 50 indivíduos. Já para evitar a perda de variabilidade devido à deriva gênica (FRANKLIN, 1998) seriam necessários no mínimo 500 indivíduos. Mas como esses números foram estimados a partir de moscas drosófilas, é necessário cautela ao estabelecer valores mínimos de tamanhos populacionais para fins de conservação (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012).

O tamanho efetivo também é afetado pela proporção sexual e pelo sistema de acasalamento (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012). Esse dado é relevante, por exemplo, quando há desvios da proporção de 1:1 entre machos e fêmeas que levam à diminuição da variabilidade total, uma vez que indivíduos do sexo mais raro passam a contribuir mais para as gerações seguintes. Da mesma forma, quando o sistema de acasalamento é poligínico ou poliândrico, os indivíduos que monopolizam a reprodução contribuem mais para o *pool* gênico (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012). Embora não existam ainda dados genéticos, supõe-se que o boto-cinza apresente sistema de acasalamento promíscuo. O tamanho relativo dos testículos sugere competição espermática (BÖSSENECKER, 1978; ROSAS, 2000). Nesse caso o sistema de acasalamento não resultaria em um menor N_e , e também contribuiria para manutenção da variabilidade genética da população.

Em um estudo com o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) na Reserva Mamirauá e arredores, Martin e Da Silva (2004) encontraram proporção sexual próxima de 1:1 entre machos e fêmeas (N =235), embora a análise de cada área em particular (canais de várzea, chavascal, ressacas na entrada do sistema Mamirauá e rios principais) tenha revelado segregação sexual espacial, com machos e fêmeas ocupando mais determinadas regiões. Por outro lado, um estudo na Índia com o golfinho-do-Ganges (*Platanista gangetica gangetica*) mostrou uma proporção sexual de machos adultos para fêmeas adultas de 0,66:1. Essa proporção enviesada para as fêmeas, somada a outros fatores como, por exemplo, uma quantidade importante de filhotes saudáveis (13,84% da população) foram considerados indícios de uma tendência de crescimento da população.

É interessante refletir sobre a razão sexual e seus impactos sobre o tamanho efetivo na Baía de Guanabara. Segundo Azevedo e colaboradores (2004), fêmeas (identificadas a partir do contato estreito com filhotes, e monitoradas a longo-prazo por foto-identificação) têm índices de reavistamento maiores e são observadas em intervalos menores, o que poderia indicar uma proporção maior de fêmeas adultas em relação a machos adultos nessa região. Por outro lado, a Baía de Guanabara representa um sítio importante de reprodução para essa espécie (AZEVEDO *et al.*, 2004). Portanto, é provável que a quantidade de machos adultos aumente a partir de imigração. Isso explicaria os dados obtidos a partir da coleta de carcaças ao longo de 19 anos, que sugerem uma proporção sexual próxima de 1:1, visto que, na amostra inicial, dos 60 indivíduos com sexo determinado, 31 eram fêmeas e 29 machos. Considerando apenas os adultos da Baía de Guanabara, oito eram machos e seis eram fêmeas. Infelizmente, muitas carcaças são recolhidas em decomposição avançada, o que impede a identificação dos indivíduos pelas marcas em suas nadadeiras dorsais. Essa informação esclareceria se os machos que morrem na Baía de Guanabara são residentes ou imigrantes. Sabendo da importância do tamanho efetivo para a variabilidade genética e, conseqüentemente, para a viabilidade da população, esses dados reforçam a importância do movimento de imigração de machos para a Baía de Guanabara, a fim de manter uma razão sexual natural próxima ao natural, além de reduzir o endocruzamento.

Estrangulamentos ou gargalos populacionais (SOULÉ, 1980), são caracterizados por uma redução do tamanho populacional e podem resultar na perda de diversidade genética (NEI *et al.*, 1975; TAJIMA, 1989, 1996; BOUZAT, 2010). Esse fenômeno pode comprometer a habilidade de uma espécie de se adaptar a mudanças ambientais (O'BRIEN e EVERMANN, 1988; FRANKHAM *et al.*, 1999; REUSCH e WOOD, 2007), aumentando o risco de extinção. É interessante notar que a própria redução populacional contribui ainda para aumentar a variância amostral, tornando a população mais sujeita aos efeitos da deriva genética (PRIMACK e

RODRIGUES, 2001; FRANKHAM *et al.*, 2004), além de aumentar as chances de endogamia (RALLS *et al.*, 1988).

Quando uma população experimenta uma redução recente no tamanho populacional efetivo, se observa uma redução correlacionada do número de alelos e de loci polimórficos. No entanto, segundo Cornuet e Luikart (1996), a redução do número de alelos ocorre de maneira mais acelerada do que a redução da heterozigosidade esperada. Isso acontece pela perda de alelos raros, que pode ser instantânea, enquanto a perda de heterozigosidade acontecerá por deriva e/ou endocruzamento ao longo de gerações. Assim, quando há um excesso de heterozigosidade esperada em relação à heterozigosidade esperada no equilíbrio mutação-deriva, há indícios de possível gargalo populacional.

Em nossa análise, nenhum dos três modelos utilizados no teste de detecção de gargalos revelou resultados significativos, portanto, não houve evidência de estrangulamento populacional. O teste "mode-shift" também corrobora essa conclusão. Isso indica, segundo Piry e colaboradores (1999), que não há evidência de gargalo populacional dentro de aproximadamente $2N_e-4N_e$ gerações no passado. Considerando que o tempo de geração estimado para *S. guianensis* é de 14 anos (TAYLOR *et al.*, 2007) e que a menor estimativa de N_e que obtivemos foi 2,2 e a maior 19,3, então a janela de detecção do estrangulamento populacional seria de 61,6 anos até 1024,8 anos atrás. Um estudo aponta que em 1985-1989 havia cerca de 400 botos na Baía de Guanabara (GEISE, 1991), portanto, o declínio mais acentuado teria ocorrido nos últimos 30 anos (AZEVEDO AF, em preparação), intervalo que está fora da janela de tempo investigada.

O tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*) é uma espécie ameaçada que sofreu um alarmante declínio populacional nas últimas décadas, passando de mais de 100 mil indivíduos no início do século 20 (LUO *et al.*, 2004) para menos de 3000 (DINERSTEIN *et al.*, 2007; MORELL, 2007). E, atualmente, segundo Dinerstein e colaboradores (2007) e Morell (2007), a espécie ocupa apenas 7% de seu território original. A população de tigres-siberianos da Rússia foi ainda mais impactada em função da caça e da captura de filhotes para exposição em zoológicos internacionais (HEPTNER e SLUDSKII, 1972). Com isso, durante a década de 40, a população foi estimada em 20 a 30 indivíduos (KAPLANOV, 1948). Após a proibição da caça em 1947, a redução das capturas e a implementação de medidas conservacionistas, a população aumentou e, em 2005, era estimada em 428-502 indivíduos (MIQUELLE *et al.*, 2007). Henry e colaboradores (2009) investigaram molecularmente amostras de indivíduos dessa população (N

= 95), mas não encontraram evidência de gargalo populacional, usando o programa Bottleneck v.1.2.02. O programa também falhou na detecção de estrangulamentos populacionais em outras populações que apresentavam evidências históricas de declínio acentuado. É o caso, por exemplo, das lontras-marinhas (*Enhydra lutris nereis*) da Califórnia. Segundo Kenyon (1969), a caça comercial levou à redução drástica da espécie *Enhydra lutris*, sendo resumida em uma dúzia de populações remanescentes. Segundo Aguilar e colaboradores (2008), as lontras chegaram a ser consideradas extintas na América do Norte no Sul do Alasca até uma população pequena ser redescoberta na região do Big Sur, na Califórnia. Esta foi considerada uma subespécie: *Enhydra lutris nereis*. Ao longo dos anos, a população foi se recuperando e atingiu de 2500 a 3000 animais (B. HATFIELD, US GEOLOGICAL SURVEY, dados não publicados). Ao analisar amostras dessa população, Aguilar e colaboradores (2008) não identificaram evidência de gargalo populacional ($N = 350$) a partir dos testes estatísticos (dentro dos últimos 200 anos), mas, a partir de análise Bayesiana encontraram sinal de forte redução populacional até 500 anos atrás. Outro caso interessante é o do golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) que habita a porção croata do Mar Adriático. Esses animais constituem a única espécie remanescente de mamífero marinho na região (BEARZI *et al.*, 2004; DURAS GOMERCIC *et al.*, 2009). Embora tenham sido abundantes até o final de 1950, o cenário começou a mudar em 1949 quando foi iniciada uma campanha para erradicar os animais, pois os pescadores consideravam os golfinhos competidores. Com o tempo, essa concepção foi sendo alterada e, após 1960, não foram mais registradas recompensas por assassinato desses animais (BEARZI *et al.*, 2004; BEARZI e FORTUNA, 2006). Em 1995, a morte dos golfinhos se tornou oficialmente ilegal na Croácia, visto que todos os mamíferos marinhos passaram a ser protegidos pela lei (BEARZI *et al.*, 2004; DURAS GOMERCIC *et al.*, 2009). Gomercic e colaboradores (2002) estimaram que a população de golfinho-nariz-de-garrafa da porção croata do Mar Adriático era composta por 218 animais em 1998. Ao analisar amostras desses animais ($N = 30$), a partir de 12 loci de microssatélites dinucleotídeos, Galov e colaboradores (2011) encontraram evidência ambígua de um gargalo populacional recente. Enquanto o teste da razão M (*M ratio test*, GARZA e WILLIAMSON, 2001) com dois conjuntos de valores paramétricos, sugeriu um estrangulamento populacional recente, a análise no programa Bottleneck, usando os três modelos TPM, SMM e IAM, não mostrou evidência de gargalo genético. Vale lembrar que o *M ratio test* e os testes de excesso de heterozigidade e frequência alélica têm janelas temporais de detecção diferentes (CORNUET e LUIKART, 1996; GARZA e WILLIAMSON, 2001).

A partir de uma revisão literária, Perry e colaboradores (2012) sugerem que testes de gargalo populacional baseados em microssatélites geralmente não detectam estrangulamentos em populações de vertebrados que sabidamente vivenciaram declínios. Os autores fizeram ainda simulações que ratificaram essa ideia. Populações simuladas que se encontravam em equilíbrio mutação-deriva foram submetidas a gargalos e o modelo de *Wright-Fisher* foi empregado para projetá-las em um futuro após os declínios no tamanho efetivo. Os resultados das simulações mostraram que os programas que testam a possível existência de gargalos populacionais podem ter um poder de detecção limitado principalmente por causa de tamanhos amostrais restritos. Outro aspecto discutido pelos pesquisadores é uma provável subestimativa das taxas de mutações de múltiplos passos. Isso porque os parâmetros adotados nesses modelos parecem não ser capazes de assumir taxas de mutação capazes de abranger a variação existente na evolução de microssatélites em vertebrados. Essa limitação, segundo os autores, faz com que os testes de gargalo tenham uma tendência maior de “apontar” possíveis estrangulamentos em populações estáveis.

Frente a essas considerações, entendemos que a ausência de evidência de gargalo na população de botos da Baía de Guanabara, a partir do programa Bottleneck, não elimina a possível existência de um estrangulamento genético nesses animais. Esses resultados sugerem que pesquisas futuras sobre o tema devem considerar a possibilidade de utilizar ferramentas analíticas diferenciadas.

5.5 Análises de parentesco

No presente trabalho, utilizamos um programa que investiga o grau de parentesco entre indivíduos a partir do cálculo do coeficiente r , portanto, trabalhamos com a estimativa da fração de alelos que é idêntica por descendência entre díades de indivíduos. Sabendo que a probabilidade de um alelo passar de uma geração a outra (passo genético) é de $1/2$, o cálculo do coeficiente de parentesco pode ser resumido pela fórmula $r = \sum (1/2)^N$, onde N é o número de passos genéticos que une dois indivíduos consanguíneos a um ancestral comum. Os valores r podem ser: 1 (gêmeos monozigóticos), 0,5 (pais-filos e irmãos inteiros), 0,25 (meio irmãos e tios) e 0,125 (primos de primeiros grau) (BLOUIN, 2003). Dois indivíduos são considerados aparentados quando possuem um valor de r igual ou superior a 0,125.

Ao comparar o índice de parentesco médio obtido dentro da Baía de Guanabara, dentro das áreas adjacentes e entre Baía de Guanabara e áreas adjacentes, observamos que apenas os animais de dentro da Baía de Guanabara revelaram um índice indicativo de parentesco ($r = 0,19$, acima de $0,125$). A organização espacial agregada de indivíduos geneticamente mais relacionados é frequente em populações naturais. Segundo Avise (2004), esse padrão pode ter várias consequências, sendo o endocruzamento uma delas, tal como discutido acima e, esse, de fato, parece ser um problema entre os botos da Baía de Guanabara. Mas outro aspecto relevante é que, algumas vezes, há a necessidade de manutenção dessas estruturas familiares para a reprodução da espécie (AVISE, 2004).

Estudos com outros mamíferos sociais terrestres têm apontado índices de parentesco relativamente parecidos, por exemplo, entre grupos de cães-selvagens-africanos (*Lycaon pictus*) ($r = 0,27$, GIRMAN *et al.*, 1997) e entre suricatas (*Suricata suricatta*) ($r = 0,28$, DUGDALE *et al.*, 2008). Ribas (2012) identificou um r médio de $0,23$ entre dez grupos de ariranhas (*Pteronura brasiliensis*) do Pantanal. Os grupos foram compostos normalmente por um casal alfa geneticamente não relacionado e por seus parentes. Mas a autora identificou um sistema social mais complexo do que o esperado, pois o grau de parentesco variou entre os grupos com alguns deles incluindo indivíduos completamente não relacionados. Os estudos em cetáceos com análises de parentesco ainda são escassos. Richard e colaboradores (1996) ao analisar três grupos de cachalote (*Physeter macrocephalus*) na costa do Equador, identificaram que o grau de parentesco dentro dos grupos foi maior do que entre grupos. Shelton (2006) analisou a composição de grupos de golfinho-cinzento (*Lagenorhynchus obscurus*) em duas localidades da Nova Zelândia: em Kaikoura (na costa oriental da Ilha Sul) e na Baía do Almirantado (na costa norte da Ilha Sul). A análise com microssatélites revelou que, na Baía do Almirantado, os indivíduos não formam grupos preferencialmente por parentesco. Já a análise de grupos berçários em Kaikoura mostrou que há uma tendência dos membros compartilharem um ancestral materno. Mas é interessante notar que, no caso da Baía do Almirantado, grupos de forrageamento e alimentação formados preferencialmente por adultos do mesmo sexo predominaram na análise. Já a análise com três estoques de beluga (*Delphinapterus leucas*) da Baía de Hudson, Canadá, e no entorno da mesma revelou que esses animais mantêm associações com indivíduos geneticamente relacionados durante eventos de migração (COLBECK *et al.*, 2012). Kita e colaboradores (2013) identificaram que, de 165 golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) capturados ao longo da costa do Japão, 120 apresentaram um índice de parentesco igual ou superior a $0,25$. Por outro lado, Viricel e colaboradores (2008), ao

compararem um grupo (N=52) de golfinhos-comuns (*Delphinus delphis*) provenientes de um encalhe em massa ocorrido em 2002 na costa da França do Canal da Mancha com outros 42 indivíduos oriundos de encalhes individuais ocorridos entre 1993 e 2003 ao longo da costa ocidental da França (Baía de Biscaia e Canal da Mancha), não encontraram evidências de que o primeiro grupo (encalhe em massa) apresentasse maior grau de parentesco entre si do que em relação aos outros animais (encalhes individuais).

5.6 Evidências de filopatria das fêmeas

Considerando apenas os resultados obtidos dentro da Baía de Guanabara, identificamos que tanto a análise na qual todos os componentes do grupo foram investigados ($r = 0,19$), quanto a análise entre fêmeas e machos ($r = 0,197$) e entre fêmeas e fêmeas ($r = 0,220$) indicaram níveis de parentesco ligeiramente inferiores aos atribuídos a meio-irmãos (0,25) (BLOUIN, 2003). Mesmo assim o valor observado para as comparações entre díades de fêmeas e fêmeas foi significativamente maior. Além disso, quando analisamos os grupos organizados por sexo (macho-macho; fêmea-fêmea e fêmea-macho) a partir da classe etária, notamos que, enquanto nas díades formadas exclusivamente por fêmeas os indivíduos com maior grau de parentesco foram adultas e juvenis/adultas, naquelas formadas unicamente por machos ou por fêmea-macho, os animais mais relacionados foram filhotes e juvenis/adultos. Mesmo sem apresentar diferença significativa, provavelmente em função do tamanho amostral reduzido de cada classe etária, tais achados indicam que animais que ainda não atingiram a idade de dispersão ou que se encontram próximo à mesma estão contribuindo de forma mais relevante para o parentesco entre os machos e nas comparações fêmea-macho. Por outro lado, no grupo formado exclusivamente por fêmeas, as adultas também se mostram altamente relacionadas com as demais. O monitoramento de longo-prazo por foto-identificação já havia mostrado que na BG existe um núcleo de fêmeas residentes, responsáveis pela geração dos filhotes (AZEVEDO AF, comunicação pessoal). Os dados de parentesco revelam que essas fêmeas são aparentadas entre si e a explicação mais provável é a filopatria. Esses resultados, somados ao fato de análises com *S. guianensis* terem apontado maior estruturação genética a partir de dados mitocondriais do que nucleares (CUNHA, 2007), reforçam a ideia da existência de filopatria das fêmeas dessa espécie. A fidelidade, nesse caso, é tanto ao sítio natal quanto ao grupo. Normalmente, a fidelidade ao grupo é um padrão

frequente em cetáceos, porém, quando a espécie apresenta o hábito de residência, tal como *S. guianensis*, a fidelidade ao sítio também ocorre.

Como observado para a maioria dos grupos de mamíferos sociais (GREENWOOD, 1980), também em *S. guianensis* aparentemente há uma tendência dos machos dispersarem mais do que as fêmeas. Um estudo de Amos e colaboradores (1991) realizado com baleias-piloto-de-peitorais-longas (*Globicephala melas*) das Ilhas Faroé, Dinamarca, também indicou que fêmeas são mais aparentadas entre si e que os machos se deslocam frequentemente entre os grupos ou permanecem no grupo natal, mas evitam a reprodução com fêmeas geneticamente relacionadas. O comportamento de dispersão também foi verificado para os machos dos grupos de cachalote (*Physeter macrocephalus*) no Equador. Tanto dados gerados por marcadores mitocondriais quanto aqueles fornecidos por microssatélites corroboraram a presença de um sistema social organizado em grupos matriarcais nos quais os machos dispersam por volta dos seis anos de idade (RICHARD *et al.*, 1996). A filopatria das fêmeas resulta na formação de grupos sociais que representam uma fração não aleatória do *pool* gênico das fêmeas adultas. Quando uma fêmea substitui sua mãe, assumindo o papel de reprodutora, leva a uma diferenciação genética entre os grupos em função das correlações alélicas matrilineares que se acumulam de maneira independente dentro dos diferentes grupos (STORZ *et al.*, 1999). Como lembram Storz e colaboradores (1999), a habilidade individual dos machos de monopolizar o acesso reprodutivo a grupos de fêmeas resulta em altos níveis de parentesco dentro da coorte de prole de cada grupo. Assim, índices de parentesco de 0,25 indicam que um único macho insemina todas as fêmeas reprodutoras em um grupo. Como consequência, o alto grau de filopatria das fêmeas associado à poligamia contribui para uma maior homogeneidade genética da coorte de filhotes de um grupo e para a maior variância entre os grupos dentro de uma população (STORZ *et al.*, 1999). Assim, esses autores entendem que, em um cenário de filopatria das fêmeas, o potencial de endocruzamento vai ser determinado pela velocidade de transferência dos machos entre os grupos. Nesse contexto, consideram relevante observar possíveis sobreposições entre a frequência de reprodução do macho e o início da maturidade sexual de suas descendentes fêmeas, bem como a frequência com que os machos juvenis atingem a maturidade sexual dentro do grupo natal. Nos botos da Baía de Guanabara, dados de fotoidentificação revelam que os juvenis se separam de suas mães entre quatro e cinco anos (AZEVEDO AF, comunicação pessoal), o que seria um pouco antes de atingirem a maturidade sexual (RAMOS, 1997). Acompanhar os juvenis após a separação de suas mães é difícil porque muitas vezes esses animais ainda não adquiriram marcas que permitam sua identificação. De qualquer modo, alguns

filhotes machos que puderam ser acompanhados permaneceram na Baía de Guanabara (AZEVEDO AF, comunicação pessoal), o que contraria a hipótese de dispersão dos machos.

Segundo Solé-Cava e Cunha (2012), a fidelidade à região natal é um dos fatores que limita a panmixia. Para Storz e colaboradores (1999), provavelmente a estruturação genética de grupos sociais exerce uma influência poderosa no curso de mudanças microevolutivas dentro das populações de muitas espécies de mamíferos. Hamilton (1964a, 1964b) propôs que a composição genética de um grupo socialmente organizado pode influenciar de maneira diferenciada o valor adaptativo de cada membro que compõe esse conjunto, o que possibilita que a seleção natural atue dentro do próprio grupo (WADE, 1982; WADE e McCAULEY, 1980, 1984; WILSON, 1975). Com isso, percebe-se que a estrutura populacional definida pela organização social tem implicações importantes para vários processos evolutivos (STORZ *et al.*, 1999).

No contexto ecológico, a fidelidade a uma localidade parece estar associada à proteção que ela confere em termos de sobrevivência. A Baía de Guanabara, assim como outras baías e estuários, fornece abrigo contra predadores e alimentação abundante (SANTOS *et al.*, 2001), apesar do elevado grau de degradação. Como discutido por Karczmarski (1999), onde há alta densidade de presas, os animais não são forçados a se deslocar por longas distâncias em busca de alimento, resultando, portanto, em alta fidelidade ao sítio. O fato de a área representar um local adequado para a reprodução (AZEVEDO *et al.*, 2004) também deve contribuir para a fidelidade.

Segundo Greenwood (1980), tem sido sugerido que as fêmeas de mamíferos são filopátricas porque, para esse grupo, os custos da dispersão, bem como os benefícios da fidelidade natal, são maiores do que para os machos. Assim, enquanto machos conseguem aumentar seu sucesso reprodutivo se separando das fêmeas após o cruzamento e indo em busca de novas parceiras (competição por parceiras sexuais), as fêmeas incrementam seu sucesso reprodutivo cuidando da prole (competição por recursos). Esse cuidado aumenta a probabilidade de sobrevivência dos filhotes e a chance deles alcançarem a maturidade sexual. Nunes (2007) lembra que, além da lactação, defender a prole de predadores e de indivíduos da mesma espécie representa custos para a fêmea. Nesse sentido, a permanência em um território conhecido pode ajudá-las nas tarefas de aquisição de alimento e de defesa. A possibilidade de habitar uma localidade conhecida confere ainda uma maior segurança quanto às variações do meio, visto que animais que residem em áreas sujeitas a intensas mudanças ambientais podem sofrer perdas relevantes em seu valor adaptativo (BOYCE e PERRINS, 1987). Adicionalmente, permanecer junto a outras fêmeas aparentadas também seria uma vantagem, para aumentar a proteção contra

predadores e outras ameaças e facilitar o aprendizado do filhote, e também visto que o risco delas praticarem o infanticídio seria menor.

Wolff (1994) propõe hipóteses alternativas para a filopatria das fêmeas. Segundo o autor, em função da competição intensa por parceiras, machos poligâmicos teriam uma longevidade reprodutiva menor do que as fêmeas. Assim, quando a fêmea juvenil atinge a maturidade sexual, a chance de seu pai ainda estar no sítio natal é reduzida, portanto, sua permanência nessa localidade reduziria o risco de um potencial cruzamento com seu pai. Em contrapartida, machos tendem a atingir a maturidade sexual e dispersar enquanto suas mães estão no sítio natal. Com isso, eles também reduzem o risco de cruzar com suas progenitoras. Já Perrin e Lehmann (2001) sugerem que o fato da seleção ter favorecido fêmeas capazes de reconhecer parentes pode ter contribuído para a evolução da filopatria, pois fêmeas dotadas dessa habilidade conseguiriam evitar o endocruzamento sem emigrar do local de nascimento, mesmo quando não há dispersão dos machos.

A capacidade de reconhecer indivíduos aparentados parece também ser influenciada pelo aprendizado associativo (KOMDEUR e HATCHWELL, 1999). Isso indica, segundo Perrin e Lehmann (2001), que durante o período de associação que precede a dispersão, os filhotes conseguiriam memorizar características dos parentes e seriam capazes de recordar tais traços após o período de dispersão. Além disso, o aprendizado associativo permitiria que o altruísmo fosse direcionado para os parentes. Outras habilidades parecem ser transmitidas também em grupos sociais. Krützen e colaboradores (2005) lembram, por exemplo, que o carregamento de esponjas por golfinhos (*Tursiops* sp.) no rostro para ajudar na busca por presas é um comportamento transmitido quase que exclusivamente pelas linhagens maternas. Em um estudo com grupos de macacos-grivet (*Chlorocebus aethiops*), Waal e colaboradores (2010) mostram que, em sistemas onde há filopatria das fêmeas, o aprendizado social parece focado nas fêmeas. Para os autores, talvez isso ocorra porque elas possuem mais conhecimento sobre a distribuição de recursos alimentares no território e porque têm laços sociais com a maioria dos outros membros do grupo (SMUTS *et al.*, 1987; DUNBAR, 1988). Assim, elas seriam melhores fontes de aprendizado social do que os imigrantes, pelo menos no contexto de forrageamento. Mesmo assim, é importante lembrar que além do sistema de transmissão vertical (progenitores para prole), existem ainda outros tipos de aprendizado que envolvem transmissão oblíqua (mais velhos para mais novos) e horizontal (transmissão lateral entre pares ou indivíduos de classes etárias semelhantes) (MANN *et al.*, 2007) e eles podem ser relevantes em sistemas onde há fidelidade ao grupo. Em um estudo com *Tursiops* sp. na Shark Bay, Austrália, Mann e

colaboradores (2007) apontam indícios da existência de um sistema de transmissão oblíqua. Segundo os autores, machos juvenis desenvolvem um repertório mais variado de táticas de forrageamento, visto que dispersam após o período de lactação. As fêmeas adultas apresentam apenas um subconjunto de estratégias de forrageamento, o que, segundo os autores, sugere que a expansão do repertório de forrageamento entre os machos imaturos pode ter sido consequência de transmissão oblíqua.

A maior parte dos dados analisados na Baía de Guanabara, tal como discutidos acima, apoia a ideia de filopatria das fêmeas e de dispersão dos machos. No entanto, dois resultados contradizem essa hipótese. Um feto coletado na Baía de Guanabara (MQ98) apresentou contribuição maior da população das áreas adjacentes em seu genótipo. Infelizmente, a mãe deste feto (MQ97) não pôde ser genotipada até o momento. O genótipo multilocus do feto mostra dois alelos exclusivos, um em homozigose no locus *sgui005*, e outro em heterozigose no locus *sgui014*. Tais alelos provavelmente influenciaram sua atribuição às áreas adjacentes. A genotipagem da mãe e a regenotipagem deste feto poderão confirmar a presença desses alelos, ou um erro de genotipagem. Se de fato a fêmea e seu filhote apresentarem tais alelos, a conclusão mais provável será que ela teria dispersado de outra área. Esse seria um indício contrário à hipótese de filopatria das fêmeas, mas não a invalidaria, pois a filopatria seria um padrão prevalente, mas não necessariamente obrigatório.

Também é digno de nota que a análise entre as díades formadas por machos e fêmeas adultos revelou índices de parentesco elevados ($r = 0,231$), o que não seria esperado em um cenário onde os machos dispersam. Conforme mencionado acima, o acompanhamento de alguns filhotes machos por fotoidentificação também sugere a permanência deles na BG após atingirem a maturidade sexual. Talvez esses resultados indiquem um desvio da estrutura social natural da espécie na BG. Uma explicação possível seria que a degradação ambiental da baía e o estrangulamento sofrido por essa população tenham afetado a estrutura social da espécie na Baía de Guanabara. Estudos apontam que os botos-cinza mudaram seus padrões de movimento e utilização do habitat nas últimas décadas (BOROBIA, 1984; GEISE, 1984). Especificamente, um padrão de movimento diário até a região da entrada da baía, observado até o início dos anos 2000, não ocorre mais. É possível que durante essas incursões à entrada da baía houvesse encontro com botos-cinza dispersores de outras áreas, e que nessas ocasiões os machos juvenis se incorporassem a esses grupos em dispersão. A ausência desses eventos pode ter reduzido a dispersão dos machos, e contribuído para o endocruzamento na BG. Essa alteração teria produzido ruído na nossa análise, embora o padrão de estrutura social da espécie ainda seja

perceptível. Apesar das últimas duas evidências em contrário, todos os demais resultados condizem com a filopatria das fêmeas e com a dispersão dos machos. Seria interessante investigar a estrutura social dos botos-cinza em outras baías onde há populações residentes, a fim de confirmar a prevalência deste padrão na espécie.

5.7 Relevância para a Conservação

Dada a diferenciação genética dos botos da Baía de Guanabara, o declínio populacional acentuado, o endocruzamento relevante e o tamanho populacional efetivo extremamente reduzido, é possível inferir que a população de *S. guianensis* dessa região está em risco elevado de extinção. As análises de parentesco corroboram a proposta de Cunha (2007) de que as fêmeas seriam filopátricas, e que os machos promoveriam o fluxo gênico na espécie. A filopatria das fêmeas implica em baixa probabilidade de recolonização em caso de extinção local. Já a dispersão diferenciada pode acarretar desvios na razão sexual, quando a mortalidade dos dispersores é alta, contribuindo para a redução do tamanho populacional efetivo. Nesse sentido, o presente trabalho salienta a importância de preservação da população geneticamente diferenciada da Baía de Guanabara, composta por um núcleo de fêmeas e seus filhotes, e da criação de corredores ecológicos que permitam que os machos alcancem as fêmeas desta e de outras populações. Para tanto, é necessária a criação de uma Unidade de Conservação que possa assegurar a viabilidade da população, bem como o estabelecimento de medidas de regulação e de fiscalização mais efetivas no controle das atividades humanas realizadas na Baía de Guanabara e no seu entorno. Idealmente, a manutenção dos botos-cinza da Baía de Guanabara deveria acontecer a partir de medidas que permitam o crescimento populacional, pela redução da mortalidade e pelo aumento da imigração, tornando tais taxas mais próximas às naturais. Se a translocação se tornar a única saída para evitar a extinção desta população, recomenda-se que os indivíduos introduzidos provenham da população geneticamente mais próxima possível da Baía de Guanabara.

6. CONCLUSÃO

- Os marcadores microssatélites revelaram baixa diversidade genética e alélica dos botos-cinza na Baía de Guanabara;
- A deficiência de heterozigotos observada na Baía de Guanabara possivelmente é consequência do endocruzamento, enquanto, nas áreas adjacentes, parece ser causada pelo efeito *Wahlund*;
- Os botos da Baía de Guanabara compõem uma população geneticamente estruturada e exclusiva;
- O tamanho populacional efetivo da Baía de Guanabara é extremamente baixo;
- Na Baía de Guanabara, os botos-cinza apresentaram alto grau de parentesco;
- As fêmeas são mais aparentadas entre si do que os machos, o que apoia a hipótese de filopatria das fêmeas nessa espécie.

7. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, A. *et al.* The distribution of nuclear genetic variation and historical demography of sea otters. *Journal compilation*, v. 11, p. 35-45, 2008.
- ALLCOCK, A.L. *et al.* *Genetic diversity as a component of biodiversity*. In: Heywood, V.H. e Watson, R.T. (Eds.). *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge Univ Press, Cambridge; 1995. p. 57-8.
- AMADOR, E. S. *Baía de Guanabara e Ecossistemas Periféricos: Homem e Natureza*. Rio de Janeiro, 1997. 539 p.
- AMOS, B.; BARRETT J.; DOVER G.A. Breeding behaviour of pilot whales revealed by DNA fingerprinting. *Heredity*, v. 67, p. 49–55, 1991.
- AMOS, W. *et al.* The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proc. R. Soc. Lond. B* v. 268, p. 2021–2027, 2001.
- ANANIAS, S. M. A. *Fidelidade à área e padrão de associação em Sotalia guianensis, baseado na técnica de foto-identificação*. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Estudos de Comportamento; Psicologia Fisiológica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- ANDRADE, L.G. *Assobios do boto-cinza, Sotalia guianensis (Cetacea:Delphinidae) em três áreas de concentração na costa do Estado do Rio de Janeiro*. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- ANSMANN I.C. *et al.* Monitoring Dolphins in an Urban Marine System: Total and Effective Population Size Estimates of Indo-Pacific Bottlenose Dolphins in Moreton Bay, Australia. *PLoS ONE* v.8 n.6 e65239, 2013.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York. Chapman & Hall, 1994.
- AVISE, J. C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2ª ed. Chapman e Hall, New York, 2004.
- AZEVEDO, A.F. *et al.* A note on site fidelity of marine tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) in Guanabara Bay, southeastern Brazil. *Journal of Cetacean Research and Management*. v. 3, n. 3, p. 265-268, 2004.

AZEVEDO, A. F. *Comportamento e uso do espaço por Sotalia guianensis (Cetacea: Delphinidae) na Baía de Guanabara e variação geográfica dos assobios da espécie ao longo da costa do Brasil*. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

AZEVEDO A.F. *et al.* Group characteristics of marine tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) (Cetacea: Delphinidae) in Guanabara Bay, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. v. 85, p. 209–212, 2005.

AZEVEDO, A.F. e SLUYS, M.V. Whistles of tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) in Brazil: Comparisons among populations. *J. Acoust. Soc. Am.* v. 117, n.3, p.1456-1464, 2005.

AZEVEDO A.F. *et al.* Habitat use by marine tucuxis (*Sotalia guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) in Guanabara Bay, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. v. 87, p. 201–205, 2007.

AZEVEDO, AF *et al.* Comportamento do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) (Cetacea: Delphinidae): amostragem, termos e definições. *Oecol. Bras*, 13(1):192-200, 2009a.

AZEVEDO, A. F. *et al.* Human-induced injuries to marine tucuxis (*Sotalia guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) in Brazil. *JMBA2- Marine Biodiversity Records*. p. 1-5, 2009b.

BAKER G.B. e WISE B.S. The impact of pelagic longline fishing on the flesh-footed shearwater *Puffinus carneips* in eastern Australia. *Biological Conservation*. v. 126, p. 306–316, 2005.

BARROSO, L.V. Aspectos da atividade de pesca na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. X Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, Anais, Guarapari (no prelo), 1997.

BEARZI, G., HOLCER, D., NOTARBARTOLO Di SCIARA, G. The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* v. 14, p. 363–379, 2004.

BEARZI, G. e FORTUNA, C.M. *Common bottlenose dolphin Tursiops truncatus (Mediterranean subpopulation)*. In: Reeves, R.R., Notarbartolo di Sciara, G. (Eds.), *Status and Distribution of Cetaceans in the Black Sea and Mediterranean Sea*. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Málaga, Spain, p. 64–73, 2006.

BELKHIR, K. *et al.* GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). 2002.

BÉRUBÉ, M. e PALSBOÛLL, P. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*. v. 5, p. 283-287, 1996.

BISI, T.L. *et al.* Trophic relationships and mercury biomagnification in Brazilian tropical coastal food webs. *Ecol Indic*. v. 18, p. 291–302, 2012.

BLOUIN, S. F. e BLOUIN, M. Inbreeding avoidance behaviors. *Trends Ecol. Evol.* v.3, p. 230–233, 1988.

BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*. v.18, p. 503–511, 2003.

BOROBIA, M. *Comportamento e aspectos biológicos dos botos da Baía de Guanabara, Sotalia sp.* 1984. Monografia (Bacharelado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BÖSSENECKER, P.J. The capture and care of *Sotalia guianensis*. *Aquatic Mammals*. v. 6, p. 13-17, 1978.

BOUZAT, J.L. Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection, and history. *Conserv. Genet.* v.11, p. 463–478, 2010.

BOYCE, M.S. e PERRINS, C.M. Optimizing Great Tit Clutch Size in a Fluctuating Environment. *Ecology*. v. 68, p. 142–153, 1987.

BOYD, R e RICHERSON, P. *Culture and the Evolutionary Process* (Univ. of Chicago Press, Chicago), 1985.

CABALLERO, S. *et al.* Taxonomic status of the genus *Sotalia*: Species level ranking for “tucuxi” (*Sotalia fluviatilis*) and “costero” (*Sotalia guianensis*) dolphins. *Marine Mammal Science*, v. 23, n.2, p. 358-386, 2007.

CAMPOS, L.B. *Rede social do boto-cinza (Sotalia guianensis) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro.* 2012. 63 f. Monografia (Ciências Biológicas) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

CANNTINGS, C. e THOMPSON, E.A. *Genealogical and Genetic Structure*. Cambridge. *Univ. Press*, Cambridge, U.K., 1981

CARVALHO, R. R. de. *Análise espaço-temporal do uso do habitat pelo boto-cinza (Sotalia guianensis) na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro*. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

CHAN, E.H.; LIEW, H.C. e MAZLAN, A.G. The incidental capture of sea turtles in fishing gear in Terengganu, Malaysia. *Biological Conservation*. v. 43, p. 1–7, 1988.

CHESSER, R. T. Further perspectives on the breeding distribution of migratory birds: South American austral migrant flycatchers. *Journal of Animal Ecology*. v. 67, n. 1, p. 69-77, 1998.

CHYBICKI, I.J. e BURCZYK, J.B. Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients. *Journal of Heredity*. v. 100, n. 1, p 106–113, 2009.

CIDS – Centro Internacional de Desenvolvimento Sustentável, Escola Brasileira de Administração Pública, Fundação Getúlio Vargas. Baía de Guanabara, Dossiê Sócio-Ambiental. Coord. D. Zee, p164, 2000.

COLBECK, G.J; *et al.* Groups of related belugas (*Delphinapterus leucas*) travel together during their seasonal migrations in and around Hudson Bay. *Proceedings of The Royal Society B* 280: 1752, 2012–2552, 2013.

COLTMAN, D. W. *et al.* Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. *Nature*. v. 426, p. 655–658, 2003.

CORNUET, J.M. e LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. v. 144, p. 2001-2014, 1996.

COSTA, H. Uma avaliação da qualidade das águas costeiras do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação de Estudos do Mar - Femar, 1998.

COSTA-URRUTIA, P *et al.* Population Genetic Structure and Social Kin Associations of Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *J Hered* . v. 103, p. 92–102, 2012.

CUNHA, H.A. *Movimentos e uso de habitat do boto-cinza, Sotalia fluviatilis (Cetacea: Delphinidae) na Baía de Guanabara, RJ, por meio de foto-identificação*. 1999. Projeto em Ecologia B, apresentado ao Depto. de Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

CUNHA, H.A *et al.*. Habitat utilization of the marine tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) in Guanabara Bay, Brazil. Abstracts of the Thirteenth Biennial Meeting of the Society for Marine Mammalogy– Maui, Hawaii, 28/11– 3/12/99, 1999.

CUNHA, H.A *et al.* Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology*. v. 148, p. 449–457, 2005.

CUNHA, H.A e SOLÉ-CAVA, A.M. Molecular sexing of tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*), using samples from biopsy darting and decomposed carcasses. *Genetics and Molecular Biology*. v. 30, n. 4, p. 1186-1188, 2007.

CUNHA, H.A. *Sistemática molecular e filogeografia do gênero Sotalia (Delphinidae) no Brasil*. 2007. Doutorado em Ciências Biológicas (Genética). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

CUNHA, H.A. e WATTS, P. C. Twelve microsatellite loci for marine and riverine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis* and *Sotalia fluviatilis*). *Molecular Ecology Notes*. v. 7, p. 1229–1231, 2007.

CUNHA, H.A; Da SILVA, V.M.F e SOLÉ-CAVA, A.M. *Molecular ecology and systematics of Sotalia dolphins*. In: M. Ruiz-garcia, J. M. Shostell (Eds.). *Biology, Evolution and Conservation of River Dolphins Within South America and Asia*. Nova Science Pub Inc, 2010.

Da SILVA, V.M.F e BEST, R.C *Sotalia fluviatilis*. *Mammalian Species*, v. 527, p. 1-7, 1996.

Da SILVA, V. M. F. *et al.* Distribution, Habitat Characteristics and preferences, and group size. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals*, v. 8, p. 31-38, 2010.

De WAAL, E. *et al.* Selective attention to philopatric models causes directed social learning in wild vervet monkeys. *Proc R Soc B277*: 2105–2111, 2010.

DeWOODY, J. A. Molecular Approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: practical applications for wild animals. *Journal of Wildlife Management*. v. 69, p.1400-1418, 2005.

DEFRAN, R.H.; SCHULTZ, G.M. e WELLER, D.W. *A technique for the photographic determination and cataloging of dorsal fins of the bottlenose dolphin (Tursiops truncatus)*. In: *Individual Recognition of Cetaceans: Use of Photoidentification and other techniques to Estimate Population Parameters – Report of the International Whaling Commission, Special Issue 12*, P.S. Hammond; S.A. Mizroch e G.P. Donovan (eds.). Cambridge, 1990.

DINERSTEIN, E. *et al.* The fate of wild tigers. *BioScience*. v. 57, p. 508–514, 2007.

DOBSON, F. Social structure and gene dynamics in mammals. *J Mammal.* v. 79, p. 667–670, 1998.

DO, C. *et al.* NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources.* v. 14, p. 209–214, 2014.

DRUMMOND, A.J. *et al.* Geneious v5.5 <<http://www.geneious.com>>, 2010.

DUFFIELD, D. e WELLS, R. *The Combined Application of Chromosome, Protein and Molecular Data for The Investigation of Social Unit Structure and Dynamics in Tursiops truncatus.* In: Genetic Ecology of Whales and Dolphins - Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13, A.R. Hoelzel e G.P. Donovan (eds.). Cambridge. 155-176, 1991.

DUGDALE, H.L. *et al.* Reproductive skew and relatedness in social groups of European badgers, *Meles meles.* *Molecular Ecology,* v. 17, p. 1815–1827, 2008.

DUNBAR, R. I. M. Primate social systems. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1988.

ÐURAS GOMERCIC , M *et al.* Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) depredation resulting in larynx strangulation with gill-net parts. *Mar. Mammal Sci.* v. 25, p. 392–401, 2009b.

EARL, D. A. e VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources.* v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

ESPÉCIE, M. A.; TARDIN, R. H.O. e SIMÃO, S. M. Degrees of residence of Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) in Ilha Grande Bay, south-eastern Brazil: a preliminary assessment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* v. 90, n. 8, p. 1633–1639, 2010.

FLACH, L.; FLACH, P. A. e CHIARELLO, A. G. Aspects of behavioral ecology of *Sotalia guianensis* in Sepetiba Bay, southeast Brazil. *Marine Mammal Science,* v. 24, p. 1, 2008a.

FLACH, L.; FLACH, P. A e CHIARELLO, A. G. Density, abundance and distribution of the guiana dolphin, (*Sotalia guianensis* van Bénédén, 1864) in Sepetiba Bay, Southeast Brazil. *The Journal of Cetacean Research and Management,* v. 10, p. 31-36, 2008b.

FLORES, P. A. C. Preliminary results of a photoidentification study of the marine tucuxi, *Sotalia fluviatilis*, in southern Brazil. *Marine Mammal Science.* v. 15, p. 840-847, 1999.

FLORES, P.A.C. Tucuxi *Sotalia fluviatilis*. In *Encyclopedia of marine mammals* (ed. W.F. Perrin *et al.*), p. 1267–1269. San Diego: Academic Press, 2002.

FRANKHAM, R. Effective population size adult population size ratios in wildlife – a review. *Genet. Res.* v. 66, p.95–107, 1995.

FRANKHAM, R., *et al.* Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim. Conserv.* v. 2, p. 255–260, 1999.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. e BRISCOE, D. A. Genetic consequences of small population size in: A primer of conservation genetics. Editora da Universidade de Cambridge. Cambridge-UK. p. 52-75, 2004.

FRANKHAM, R. Fundamentos de Genética da Conservação. Richard Frankham, Jonathan D. Ballou, David A. Briscoe. - Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 280p. 2008.

FRANKLIN, I.R e FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation I*, p. 69-70, 1998.

FRÈRE, C.H. *et al.* Inbreeding tolerance and fitness costs in wild bottlenose dolphins. *Proceedings of The Royal Society*, v. 277, p. 2667-2673, 2010.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE (RJ). Projeto de recuperação do ecossistema da Baía de Guanabara. Rio de Janeiro: FEEMA. v. 1, 1990.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE. Qualidade de Água da Baía de Guanabara (1990/1997). Programa de Despoluição da Baía de Guanabara/Programas Ambientais Complementares. Rio de Janeiro. v. 1, 1998.

GALOV, A *et al.* High genetic diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mammalian Biology*, v. 76, p. 339–344, 2011.

GARZA, J.C e WILLIAMSON, E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*. v. 10, p. 305–318, 2001.

GASPARI, S. *et al.* Social kin association and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean sea. *Mol Ecol.* v. 16, p. 2922–2933, 2007.

GEISE, L. *Distribuição geográfica e estimativa populacional dos botos da Baía de Guanbara – RJ, Sotalia sp.* 1984. Monografia (Bacharelado) – Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GERACI, J. R. e LOUNSBURY, V. J. Marine mammals ashore: a field guide for strandings. Texas A & M Sea Grant, 1993.

GERVAIS, P. Remarques sur les mammifères marins qui fréquentent les côtes de la France et plus particulièrement sur une nouvelle espèce de Dauphin propre à la Méditerranée. Bull Soc Centr Agricult comices agric départ I' Herault (Montpellier), 40 année (Avril, Main, Juin) 140-156, 1853.

GIRMAN, D. J. *et al.* A molecular genetic analysis of social structure, dispersal, and interpack relationships of the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. v. 40, p. 187-198, 1997.

GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim. Behav.* v. 28, p. 1140–1162, 1980.

GOMERCIC, H. *et al.* Estimation of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) population in the Croatian part of the Adriatic Sea. In: 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, Abstracts, The Hellenic Zoological Society. Thessaloniki, p. 43, 2002.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

HAMILTON, W.D. The genetical evolution of social behaviour. *J. Theor. Biol.* v. 7, p. 1–52, 1964a.

HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behavior. II. *Journal of Theoretical Biology*, v. 12, p. 12-45, 1964b.

HAMILTON, W. D. Geometry for the selfish herd. *Journal of Theoretical Biology*. v. 31, p. 295–311, 1971.

HAYNIE, M. L. *et al.* Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs. *Journal of Mammalogy*. v. 84, p. 1244–1253, 2003.

- HENRY, P *et al.* In situ population structure and ex situ representation of the endangered Amur tiger. *Molecular Ecology*. v. 18, p. 3173–3184, 2009.
- HEPPER, P.G. Kin Recognition. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.
- HEPTNER, V.G e SLUDSKII, A.A. *Carnivora (hyaenas and cats)*. In: Mammals of the Soviet Union (eds Heptner VG, Naumov NP), pp. 95–193. Amerind Publishing Co., New Dehli, 1972.
- HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*. v. 38, p. 209-216, 1981.
- HOELZEL, A.R.; DAHLHEIM, M. e STERN, S.J. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *J Hered.* v. 89, p.121–128, 1998.
- HOFFMAN, J. I. *et al.* Female fur seals show active choice for males that are heterozygous and unrelated. *Nature*. v. 445, p. 912–914, 2007.
- HOHN, A.A. *et al.* Growth layers in teeth from known age, free-ranging bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science*. v. 5, p. 315–342, 1989.
- HOLLATZ, C. *et al.* Microsatellite data reveal fine genetic structure in male Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) in two geographically close embayments at south-eastern coast of Brazil. *Mar. Biol.* v. 158, p. 927–933, 2011.
- HINDE, R.A. *Interactions, relationships, and social structure*. In: Man (New Series), 11,(I), 1-17, 1976.
- HUBISZ, M. J. *et al.* Technical Advances: Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*. v. 9, p. 1322–1332, 2009.
- HUGHES, C. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology*. v. 79, n. 2, p. 383-399, 1998.
- JABLONSKI, S.; AZEVEDO, A.F. e MOREIRA, L.H.A. Fisheries and conflicts in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v. 49, p. 79–91, 2006.
- JAKOBSSON, M. e ROSENBERG, N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, v. 23, p. 1801-1806, 2007.

JARNE, P. e LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE*, v.11, p.424-429, 1996.

JEFFERSON, T.A.; LEATHERWOOD, S. e WEBER, M.A. FAO species identification guide. *Marine Mammals of the World*. FAO, Rome. 320p., 1993.

KALINOWSKI, S.T.; WAGNER, A.P. e TAPER, M.L. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*. v. 6, p. 576-579, 2006.

KAPLANOV, L.G. *Tigers in Sikhote-Alin*. In: Tiger, Red Deer, and Moose, Materialy k poznaniyu fauny i flory SSSR, pp. 18–49. Izd. Mosk. Obschestva Ispytateley Prirody. Novaya Seria, Moscow, 1948.

KARCZMARSKI, L. Group dynamics of humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in the Algoa Bay region, South Africa. *Journal of Zoology*, v. 249, p. 283-293, 1999.

KENYON, K.W. The sea otter in the eastern Pacific Ocean. *N. Am. Fauna*. v. 68, p. 1–352, 1969.

KITA, Y.F. *et al.* Genetic and family structure in a group of 165 common bottlenose dolphins caught off the Japanese coast. *Marine Mammal Science*. v. 29, n. 3, p. 474–496, 2013.

KJERFVE, B. *et al.* Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*. v. 17, n. 3, p. 1609-1643, 1997.

KOKKO, H. e OTS, I. When not to avoid inbreeding. *Evolution*. v. 60, p. 467–475, 2006.

KOMDEUR, J. e HATCHWELL, B.J. Kin recognition: function and mechanism in avian societies. *Trendsecology and evolution*. v. 14, p. 237-241, 1999.

KRÜTZEN, M.; SHERWIN, W.B. e CONNOR, R.C. Contrasting relatedness patterns in bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) with different alliance strategies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. v.270, p. 497–502, 2003.

KRÜTZEN, M. *et al.* Cultural transmission of tool use in bottlenose dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 102, p. 8939–8943, 2005.

- LAILSON-BRITO, J. Jr *Bioacumulação de mercúrio, selênio e organoclorados (DDT, PCB e HCB) em cetáceos (Mammalia, Cetacea) da costa sudeste e sul do Brasil*. 2007. 261 f. Tese (Doutorado em Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- LAMBIN, X e YOCCOZ, N. The impact of population kin-structure on nestling survival in Townsend's voles, *Microtus townsendii*. *Journal of Animal Ecology*, v. 67, n. 1, p. 1-16, 1998.
- LAWSON, H. e PERRIN, L.J.N. Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology*. v. 16, p. 1559–1578, 2007.
- LYNCH, M. e RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*. v. 152, p. 1753–1766, 1999.
- LODI, L. e HETZEL, B. Grandes agregações do boto-cinza (*Sotalia fluviatilis*) na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro. *Bioikos* (Campinas), v. 12, p. 26-30, 1998.
- LÓPEZ, A. *et al.* Fishery by-catches of marine mammals in Galician waters: results from on-board observations and an interview survey of fishermen. *Biological Conservation*. v. 111, p. 25–40, 2003.
- LOWE, W.H.; ALLENDORF, F.W. INVITED REVIEW What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology*, v. 19, p. 3038–3051, 2010.
- LUIKART, G. e CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*. v. 12, p. 228-237, 1998.
- LUNARDI, D.G. *Comportamento social de botos-cinza, Sotalia guianensis, na Praia de Pipa, RN, Brasil: dinâmica, sequência, sincronia e respostas ao turismo de observação*. 2011. 157 f. Dissertação (Mestrado em Estudos de Comportamento; Psicologia Fisiológica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- LUNARDI, D.G. e FERREIRA, R.G. Group composition influences on behavioral sequence patterns of the Guiana dolphin *Sotalia guianensis*. *Journal of Ethology*. v. 31, p. 49–53, 2013.
- LUO, S.J *et al.* Phylogeography and Genetic Ancestry of Tigers (*Panthera tigris*). *PLoS Biology*. v. 2, p. 1–19, 2004.
- MACCOLL, A.D.C. *et al.* Spatial arrangement of kin affects recruitment success in young male red grouse. *Oikos*, v. 90, p. 261–270, 2000.

MAGNANI, MC. Modelagem da estrutura social e populacional de *Sotalia guianensis*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Santa Catarina.

MAGRINI, A. e Dos SANTOS, M. A. Gestão Ambiental de Bacias Hidrográficas – Rio de Janeiro – ed. TUIG, 2001.

MANN, J.; SARGEANT, B.L. e MINOR, M. Calf inspections of fish catches in bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.): opportunities for oblique social learning? *Marine Mammal Science*, v. 23, n. 1, p. 197–202, 2007.

MARTIN, A.R. e Da SILVA, V.M.F. River dolphins and flooded forest: seasonal habitat use and sexual segregation of botos (*Inia geoffrensis*) in an extreme cetacean environment. *Journal of Zoology*. v. 263, p. 295-305, 2004.

MAYR, L.M. *et al.* Hydrological characterization of Guanabara Bay. In: Magoon, O. & Neves, C. (Eds.) Coastal Zone: Coastlines of Brazil. New York, American Society of Civil Engineers. p. 124-138, 1989.

McCULLOUGH, D.R. The tule elk, its history, behaviour, and ecology. University of California. *Publications in Zoology*, v. 88, p. 1–209, 1969.

MELO, C.L.C. Aspectos ecológicos da alimentação do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro: comparações intra e interespecíficas. 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MENICONI, M.F.G de. Baía de Guanabara: síntese do conhecimento ambiental – Rio de Janeiro: Petrobras, 2012.

MIQUELLE, D.G. *et al.* 2005 Amur Tiger Census. *Cat News*. v. 46, p. 14–16, 2007.

MIRIMIN, L. *et al.* Insights into genetic diversity, parentage, and group composition of Atlantic white-sided dolphins (*Lagenorhynchus acutus*) off the west of Ireland based on nuclear and mitochondrial genetic markers. *Journal of Heredity*. v. 102, p. 79–87, 2011.

MÖLLER, L.M. *et al.* Alliance membership and kinship in wild male bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Proceedings of the Royal Society of London – Series B*, 268, p. 1941-1947, 2001.

MÖLLER, L.M. *et al.* Association patterns and kinship in female Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. v. 61, p. 109–117, 2006.

MÖLLER, L.M. e HARCOURT, R.G. Shared reproductive state enhances female associations in the Indo-Pacific Bottlenose Dolphin *Tursiops aduncus*. *Research Letters in Ecology*, doi: 10.1155/2008/498390, 2008.

MÖLLER, L.M. Sociogenetic structure, kin associations and bonding in delphinids. *Molecular Ecology*. v. 21, p. 745-764, 2012.

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

MORELL, V. Wildlife biology: can the wild tiger survive? *Science*. v. 317, p. 1312–1314, 2007.

MORITZ, C. Applications of mitochondrial-DNA analysis in conservation - a critical review. *Molecular Ecology*, v.3, p. 401-411, 1994.

NEI, M.; MARUYAMA, T. e CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability of populations. *Evolution*. v. 29, p. 1–10, 1975.

NERY, M.F. e SIMÃO, S.M. Sexual coercion and aggression towards a newborn calf of marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*). *Marine Mammal Science*. v. 25, n. 2, p. 450-454, 2009.

NORMAN, F.I. Preliminary investigation of the bycatch of marine birds and mammals in inshore commercial fisheries, Victoria, Australia. *Biological Conservation*. v. 92, p. 217–226, 2000.

NORRIS, K.S. *Some observations on the migration and orientation of marine mammals*. In: STORM, RM (Ed) *Animal orientation and navigation*. Corvallis: Oregon State University Press, p.101-125, 1966.

NORRIS, K. S. e DOHL, T.P. *The structure and function of cetacean schools*. In: L. M. Herman, ed. *Cetacean behavior: Mechanisms and processes*. John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 211–254, 1980.

NORRIS, K.S. e SCHILT, C.R. Cooperative societies in three-dimensional space: On the origins of aggregations, flocks, and schools, with special reference to dolphins and fish. *Ethology Sociobiology*, v. 9, p.149–179, 1988.

NUNES, S. *Dispersal and philopatry*. In: Wolff, J.O.; Sherman P.W (eds) *Rodent societies: an ecological and evolutionary perspective*. Chicago: The University of Chicago Press; p. 150-162, 2007.

O'BRIEN, S.J. e EVERMATM, J. F. Interactive influence of infections disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*. v. 3, p. 254-259, 1988.

O'GRADY, J.J. *et al.* Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biol Conserv*. v.133, p. 42–51, 2006.

OOSTERHOUT, V.C. *et al.* MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes*. v. 4, p. 535-538, 2004.

OWEN, E.C.G. *The reproductive and ecological functions of the pair-bond between allied, adult male bottlenose dolphins, Tursiops truncatus, in Sarasota Bay, Florida*. 2003. Dissertation, University of California, Santa Cruz.

PALSBOLL, P.J.; BERUBE, M.; ALLENDORF, F.W. Identification of management units using population genetic data. *TREE*, v. 22, p. 11-16, 2007.

PALSTRA, F.P. e FRASER, D.J. Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal. *Ecology and Evolution*. v. 2, n.9, p.2357-2365, 2012.

PARSONS, K.M. *et al.* Kinship as a basis for alliance formation between male bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the Bahamas. *Animal Behaviour*. v. 66, p. 185–194, 2003.

PARKS, S.D.E. *Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection*. 2001. PhD thesis, University of Dublin, Dublin.

PEERY, M.Z *et al.* Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, v. 21, p. 3403–3418, 2012.

PÉREZ-ALVAREZ, M.J. *et al.* Microsatellite Markers Reveal Strong Genetic Structure in the Endemic Chilean Dolphin. *PLoS ONE* , v. 10, n. 4, e0123956, 2005.

PERIN, G. *et al.* Five-year study on the heavy-metal pollution of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical speciation. *Water Research*. v. 31, p. 3017-3028, 1997.

PERRIN, W.F. e MYRRICK, Jr, A.C. (eds.) *Age determination of toothed whales and sirenians*. Reports of the International Whaling Commission (special issue), 3:229 pp, 1980.

PERRIN, N. e LEHMANN, L. Is sociality driven by the costs of dispersal or the benefits of philopatry? A role for kin-discrimination mechanisms. *American Naturalist*. v. 158, p. 471–483, 2001.

PETROBRAS – Relatório de Impacto Ambiental (RIMA) de Dragagem para Adequação das Bacias de Evolução e do Canal de Acesso para os Terminais Aquaviários das Ilhas Comprida e Redonda – Baía de Guanabara dezembro de 2010.

PICHLER, F.B. e BAKER, C.S. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society of London – Series B*, 267: 97-102, 2000.

PILOT, M.; DAHLHEIM, M.E. e HOELZEL, A.R. Social cohesion among kin, gene flow without dispersal and the evolution of population genetic structure in the killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Evolutionary Biology*. v. 23, p. 20–31, 2010.

PINEDO, M.C. e HOHN, A.A. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for precision in age estimation. *Marine Mammal Science*. v. 16, p.1-27, 2000.

PIRY, S.; LUIKART, G e CORNUET, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. v. 90, p. 502–503, 1999.

PIZZORNO, J.L.A.; LAILSON-BRITO, J.Jr. e GURGEL, I.M.G.N. Photoidentification of *Sotalia fluviatilis* in Guanabara Bay, RJ, Brazil. Abstracts of the Tenth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Galveston, Texas, USA, 1995.

POPPER, A.N. “*Sound emission and detection by delphinids*” In: *Cetacean Behaviour: Mechanisms and Functions*, Herman, L. M. (ed.) (Wiley, New York), pp. 1–52, 1980.

PRIMACK, R.B. e RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Londrina, E. Rodrigues, 328p, 2001.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M. e DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, p. 945-959, 2000.

QUELLER, D.C.; STRASSMANN, J.E.; HUGHES, C.R. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*. v. 8, p. 285–288, 1993.

RALLS, K.; BALLOU, J. D. e TEMPLETON, A. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conserv Biol*. v. 2, p. 185–193, 1988.

RAMOS, R. M. A. *Determinação de idade e biologia reprodutiva de Pontoporia blainvillei e da forma marinha de Sotalia fluviatilis (Cetacea: Pontoporiidae e Delphinidae) no Norte do Rio de Janeiro*. 1997. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

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

RÁNDIC, S. *et al.* A novel mammalian social structure in Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.): complex male alliances in an open social network. *Proceedings of The Royal Society*. v. 279, p. 3083-3090, 2012.

REEVES, R.R. *et al.* *Sotalia fluviatilis*. In: IUNC 292010. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <www.iucnredlist.org>. 2008.

REUSCH, T.B.H. e WOOD, T.E. Molecular ecology of global change. *Mol. Ecol*. v. 16, p. 3973-3992, 2007.

RIBAS, C. *Grau de parentesco e relações sociais em ariranhas (Pteronura brasiliensis)*. 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Programa de Pós-graduação em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus.

RICHARD, K.R. *et al.* Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p.8792-8795, 1996.

RICHARDSON, W.J. *et al.* *Marine Mammals and Noise* (Academic, New York), 1998.

RIDLEY, M. *Evolução*. Mark Ridley; tradução Henrique Ferreira, Luciane Passaglia, Rivo Fischer. 3ª. ed. - Porto Alegre: Artmed, 2006.

ROSAS, F.C.W. *Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de Sotalia guianensis e Pontoporia blainvillei (Cetacea, Delphinidae e Pontoporiidae) no litoral sul*

do estado de São Paulo e litoral do estado do Paraná, Brasil. 2000. 145 f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ROSAS, F.C.W. e MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Reproductive parameters of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) on the coast of Paraná State, Southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, Estados Unidos, v. 83, n.2, p. 507-515, 2002.

ROSAS, F.C.W.; BARRETO, A.S. e MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Reproduction of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) (Cetacea, Delphinidae) on the Paraná coast, southern Brazil. *Fishery Bulletin*, n. 101, p. 377-383, 2003.

ROSEL, P.E. e ROJAS-BRACHO, L. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus*. *Marine Mammal Science*. v. 15, n.4, p. 990-1003, 1999.

ROSENBERG, N.A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*. v. 4, p. 137-138, 2004.

ROSSI- SANTOS, M. R.; WEDEKIN, L. e MONTERIO FILHO, E.L.A. Residence and site fidelity of *Sotalia guianensis* in the Caravelas River Estuary, eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 87, p. 207-212, 2007.

ROSSI-SANTOS, M.R. e FLORES, P.A.C. Feeding Strategies of the Guiana Dolphin *Sotalia guianensis*. *The Open Marine Biology Journal*, 3:70-76, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

SANTOS, M.C.O.; BARÃO-ACUÑA, L. e ROSSO, S. Insights on site fidelity and calving intervals of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in southeastern Brazil. *Journal of the Marine Biology Association of the U.K.* v. 81, p. 1049-1052, 2001 .

SANTOS, M.C.O.; ROSSO, S. e RAMOS, R.M.A. Age estimation of marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biology Association of the U.K.* v. 83, p. 233-236, 2003.

SANTOS, M.C.O. e ROSSO, S. Ecological aspects of marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*) based on group size and composition in the Cananéia Estuary, Southeastern Brazil. *Lajam*. v. 6, n. 1, 71-82, 2007.

SANTOS, Fernanda Cerqueira. *Estruturação populacional e diversidade genética de Sotalia guianensis (Van Benéden, 1864) (Cetartiodactyla: Delphinidae) no litoral centro-sul do Estado*

do Rio de Janeiro. 2015. 104 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 233-234, 2000.

SCHULZE, B. *Estimativa populacional e área de vida do boto-cinza, Sotalia guianensis (Cetacea, Delphinidae) na Baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil*. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

SCHLÖTTERER C., KAUER, M. e DIERINGER, D. Allele excess at neutrally evolving microsatellites and the implications for tests of neutrality. *Proc Biol Sci*. v. 271, p. 869–874, 2004.

SEMA – SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE. Macroplano de Gestão e Saneamento Ambiental da Bacia da Baía de Sepetiba – Relatório Final, Parte I: Diagnóstico Ambiental. Governo do Estado do Rio de Janeiro, 1998.

SEMADS – Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Ambiente das águas no Estado do Rio de Janeiro. 2001.

SHELTON, De. Dusky Dolphins in New Zealand: Group Structure by Sex and Relatedness. Thesis Office of Graduate Studies of Texas A&M University, 2006.

SICILIANO, S. *et al.* Baleias, botos e golfinhos na Bacia de Campos. Série Guia de Campo: Fauna Marinha da Bacia de Campos. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006.

SIMÕES-LOPES, P.C. Sobre a ampliação do gênero *Sotalia* Gray, 1986 (Cetacea, Delphinidae) para as águas do estado de Santa Catarina - Brazil. Anais da 2ª Reunião de *Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul*, Rio de Janeiro, Brazil: Ed. FBCN, 1987.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. v. 16, p. 393-430, 1985.

SMOLKER, R.A. *et al.* Sex differences in patterns of association among Indian Ocean bottlenose dolphins. *Behaviour*. v.123, n 1-2, p. 38-69, 1992.

SMUTS, B.B. *et al.* (eds) *Primate societies*. Chicago, IL: Chicago University Press, 1987.

SOLÉ-CAVA, A.M. *Biodiversidade molecular e genética da conservação*. In: *Evolução Molecular*, S.R. Matioli (ed.), Editora Holos, 2000.

SOLÉ-CAVA, A.M. e CUNHA, H.A. *A Genética e a Conservação da Natureza*. In: Matioli SR, *Biologia Molecular e Evolução*. 2ª Ed, Holos editora, Ribeirão Preto, pp 217-238, 2012.

SORCI, G.; MASSOT, M. e CLOBERT, J. Maternal parasite load increases sprint speed and philopatry in female offspring of the common lizard. *Am. Nat.* v. 144, p. 153-164, 1994.

SOULÉ, M.E. *Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential*. In: M.E.; S, B.A. W (eds) *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp 111-124, 1980.

SOULÉ, M.E. e WILCOX, B.A. *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1980.

SOUZA, S.C.P. de *Estimativa de parâmetros populacionais dos botos-cinza (Sotalia guianensis VAN BÉNÉDEN, 1864) (CETACEA, DELPHINIDAE) na Baía de Paraty, (RJ)*. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

SPONG, G. *et al.* Genetic structure of lions (*Panthera leo L.*) in the Selous Game Reserve: implications for the evolution of sociality. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 15, p. 945–953, 2002.

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

TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*. v. 123, p. 585-595, 1989.

TAVARES, A.S.S. *Análise da estruturação genética da sub-espécie Patella candei gomesii Drouet 1858 (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) no arquipélago dos Açores*. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Recursos Genéticos) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

TAYLOR, B.L. e ROJAS-BRACHO, L. Estimating the risk of inbreeding depression in a naturally rare cetacean, the vaquita (*Phocoena sinus*). *Marine Mammal Science*. v. 15, n. 4, p. 1004-1028, 1999.

TAYLOR, B.L. *et al.* Generation length and percent mature estimates for IUCN assessments of cetaceans. Administrative Report LJ-07-01, Southwest Fisheries Science Center, 8604 La Jolla Shores Blvd., La Jolla, CA 92038, USA. 24 pp, 2007.

TYACK, P.L. “*Acoustic Communication under sea*” In: *Animal Acoustics Communication—Sound Analysis and Research Methods*, edited by S. L. Hopp, M. J. Owen, and C. S. Evans (Springer-Verlag, New York), pp. 163–219, 1998.

VALENTIN, J. L. *O sistema planctônico da Baía de Guanabara: síntese do conhecimento*. In: Silva, S. H. G. & Lavrado, H. P. (eds.), *Ecologia de Ambientes Costeiros do Estado do Rio de Janeiro*, PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, p.35-59, 1999.

VAN BÉNÉDEN, E. Sur un daulphin nouveau et um ziphiode rare. *Memm I' Acad Royale Sci Belgique*.v. 41, p. 2-44, 1864.

VAN De CASTEELE, T. *et al.* A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Mol. Ecol.* v. 10, p. 1539–1549, 2001.

VAN HORN, R.C. *et al.* Behavioural structuring of relatedness in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*) suggests direct fitness benefits of clan-level cooperation. *Molecular Ecology*, v.13, p. 449–458, 2004.

VAUGHAN, C. Change in dense forest habitat for endangered wildlife species in Costa Rica from 1940 to 1977. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University*. V. 3, p. 99–161, 2011.

VIDAL, L.G. *O uso do boto-cinza (Sotalia guianensis) como sentinela da poluição ambiental por compostos organoclorados (DDT, PCB, HCH, HCB e Mirex) em baías costeiras do Estado do Rio de Janeiro*. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

VIRICEL, A. et el. Insights on common dolphin (*Delphinus delphis*) social organization from genetic analysis of a mass-stranded pod. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. v. 63, p. 173–185, 2008.

WADE, M. J. Group selection: migration and the differentiation of small populations. *Evolution*, v. 36, p. 949-961, 1982.

WADE, M.J. e MCCAULEY, D.E. Group selection: the phenotypic and genotypic differentiation of small populations. *Evolution*. v. 34, p. 799-812, 1980.

WANG, J. An estimator of pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*. v. 160, p. 1203–1215, 2002.

WAPLES, R.S. e GAGGIOTTI, O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 1419-1439, 2006.

WASER, P.M.; AUSTAD, S.N. e KEANNE, B. When should animals tolerate inbreeding? *Am. Nat.* v. 128, p. 529–537, 1986.

WELLS, R.S.; SCOTT, M.D. e IRVINE, A.B. *The social structure of freeranging bottlenose dolphins*. In: H.GENOWAYS (Ed.). *Current Mammalogy*. New York, Plenum Press, v. 1, p. 247-305, 1987.

WELLS, R.S. e SCOTT, M.D. *Estimating Bottlenose Dolphin Population Parameters From Individual Identification and Capture-Release Techniques*. In: *Individual Recognition of Cetaceans: Use of Photo-identification and other techniques to Estimate Population Parameters – Report of the International Whaling Commission, Sp. Issue 12*, P.S. Hammond; S.A. Mizroch e G.P. Donovan (eds.). Cambridge, 1990.

WELLS, R.S. *The role of long-term study in understanding the social structure of a bottlenose dolphin community*, p.199-223. In: K. PRYOR & K.S. NORRIS (Eds). *Dolphin societies: discoveries and puzzles*. Berkeley, University of California Press, 397p, 1991.

WHITEHEAD, H. Cultural Selection and Genetic Diversity in Matrilineal Whales. *Science*. v. 282, p. 1708-1711, 1988.

WHITEHEAD, H.; CHRISTAL, J. e TYACK, P. *Studying cetacean social structure in space and time*. In: *Cetacean societies – field studies of whales and dolphins*. Mann, J.; Connor, R.; Tyack, P. e Whitehead, H. (eds.). The University of Chicago Press, 2000.

WILSON, S. A theory of group selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 72, p.143-146, 1975.

WISZNIEWSKI, J.; LUSSEAU, D. e MÖLLER, L.M. Female bisexual kinship ties maintain social cohesion in a dolphin network. *Animal Behaviour*. v. 80, p. 895–904, 2010.

WOLF, J.O. More on juvenile dispersal in mammals. *Oikos*, v. 71, p. 349-352, 1994.

WRIGHT, S., Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v. 16, p. 97–159, 1931.

WRIGHT, S. *Evolution and the genetics of populations*. The University of Chicago Press, London, 1978.

WÜRSIG, B. e JEFFERSON, T.A. *Methods of Photo-Identification for Small Cetaceans*. In: *Individual Recognition of Cetaceans: Use of Photo-identification and other techniques to Estimate Population Parameters – Report of the International Whaling Commission, Special Issue 12*, P.S. Hammond; S.A. Mizroch e G.P. Donovan (eds.). Cambridge, 1990.

ZAPPES, C.A. *et al.* Ethnobiology and photo-identification: identifying anthropic impacts on boto-cinza dolphin *Sotalia guianensis* in Sepetiba Bay, Brazil. *Revista Brasileira de Biociências*, v.8, n. 2, p221-224, 2010.