

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE E MANEJO DA VIDA  
SILVESTRE

DISSERTAÇÃO-PPG-MESTRADO

**DNA antigo de amostras de ossos de baleia-franca-austral, *Eubalaena australis*  
(Desmoulins, 1822) (Mysticeti, Cetartiodactyla) no Atlântico Sul Ocidental.**

Débora Stefani Gasperin

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati.

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Rosa de Oliveira.

São Leopoldo (RS),

Julho de 2014.

Débora Stefani Gasperin

**DNA antigo de amostras de ossos de baleia-franca-austral, *Eubalaena australis*  
(Desmoulins, 1822) (Mysticeti, Cetartiodactyla) no Atlântico Sul Ocidental.**

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

Área de concentração: Diversidade e Manejo da Vida Silvestre.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati.

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Rosa de Oliveira.

São Leopoldo (RS),

Julho de 2014.

G249d

Gasperin, Débora Stefani

DNA antigo de amostras de ossos de baleia-franca-austral, *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822) (Mysticeti, Cetartidactyla) no Atlântico Sul / Débora Stefani Gasperin. – 2014.

65 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, São Leopoldo, RS, 2014.

Área de concentração: Diversidade e Manejo da Vida Silvestre.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati.

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Rosa de Oliveira.

1. Baleia-franca-austral – Atlântico Sul. 2. *Eubalaena australis*. 3. DNA antigo. 4. Dextran Blue. I. Título. II. Valiati, Victor Hugo. III. Oliveira, Larissa Rosa de.

CDU 599.512

Catálogo na Publicação:  
(Bibliotecária Raquel Herbcz França – CRB 10/1795)

## AGRADECIMENTOS

Nem acredito que consegui chegar até aqui!!! Só quem acompanhou de perto sabe como foi difícil e muitas vezes estressante essa jornada, mas no fim nós conseguimos! Quero muito agradecer a todos que me apoiaram, incentivaram e estiveram do meu lado nesse longo trabalho, que muitas vezes me deixou louca, angustiada e também muito feliz. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço minha família em primeiro lugar, pois sempre me apoiou em todas as decisões na minha vida. Pai, mãe e Júlia, vocês são incríveis, não tenho palavras pra agradecer todo carinho, amor, paciência e incentivo que vocês me deram nessa fase tensa da minha vida. A força e o colo de vocês foram fundamentais para continuar com meus objetivos e chegar até aqui. Quero agradecer especialmente ao amor da vida, Leonardo Jungblut, que sempre esteve fielmente ao meu lado, de braços abertos para o que der e vier. Meu amor, sem dúvida você é minha fonte de energia e felicidade, foi você que deixou minha vida colorida e divertida no meio desta loucura toda. Muito obrigada a vocês quatro, eu tenho muito orgulho de fazer parte desta família!

Aos meus orientadores, Victor Hugo Valiati e Larissa Rosa de Oliveira. Meus queridos, muito obrigada por estarem sempre por perto, me auxiliando em todas as fases do trabalho e acreditando que tudo daria certo, mesmo quando tudo parecia perdido. Vitinho, você é um exemplo de pessoa e profissional, foi uma honra trabalhar contigo e com todos que fazem parte da família da Biologia Molecular-UNISINOS. Aos meus amigos e colegas de trabalho que sempre me ensinaram e ajudaram: Mário Josias Muller, Ana Lusia Leal, Guilherme Cauduro, Felipe Benites, Tenille Dorneles, Gabriela Kern e ao professor Luis Fernando da Costa Medina, que aos poucos foi se tornando um grande amigo e conselheiro. Muito obrigada pela amizade, carinho, incentivo e confiança do dia-dia, com certeza quero vocês pra sempre na minha vida!!

Um agradecimento especial ao Dr. Enrique Alberto Crespo do *Laboratorio de Mamiferos Marinos* (LAMAMA) do *Centro Nacional Patagónico* (CENPAT) e ao Dr. Paulo A. C. Flores do Centro Mamíferos Aquáticos do Instituto Chico Mendes de Santa Catarina (CMA-ICMBio), que proporcionaram tudo isso através da coleta de material.

Obrigada a todos vocês!!!!

## RESUMO

A baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*) foi alvo de grande exploração comercial entre os séculos XVII a XX no Hemisfério Sul. Estimativas recentes sugerem que a população mundial da espécie é de 12.000 indivíduos, o que representaria 17 a 21% do seu tamanho original. Apesar de aparente recuperação, o declínio drástico no tamanho da população, resultante dos 400 anos de atividade da caça, pode ter gerado altos níveis de endogamia, baixa capacidade reprodutiva e perda de variabilidade genética da espécie, podendo ter seu potencial adaptativo comprometido, aumentando assim a probabilidade de extinção. Frente ao exposto é de extrema importância a avaliação comparativa da variabilidade genética entre as populações atuais de *E. australis* e amostras representativas do período de caça, em especial no Brasil. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: I. Otimizar e comparar métodos de extração e amplificação de DNA antigo (aDNA) de ossos de baleia-franca-austral, em diferentes estados de degradação; II. Caracterizar geneticamente segmentos da região D-Loop do DNA mitocondrial (mtDNA) a partir de ossos de espécimes de *E. australis* coletados na Península Valdés na Argentina e em Santa Catarina no Brasil; e III. Comparar as sequências nucleotídicas da região recuperada nas amostras de aDNA com as descritas para as populações atuais. Este estudo comparou cinco métodos diferentes para obter material genético de amostras degradadas. O método de extração que mostrou ser mais eficiente foi o que continha o reagente Dextran Blue. Com a amplificação de 20 fragmentos curtos, obtidos pelo Nested-PCR, com clonagem e posterior sequenciamento, foi possível recuperar pequenos fragmentos, que variaram de 7 a 59 pb, da região D-Loop do mtDNA de 11 amostras de ossos de *E. australis* das 88 tentativas realizadas. Ao analisar o material recuperado com dados atuais da espécie, o programa Network 4.6 revelou uma rede contendo 19 haplótipos, sendo quatro haplótipos restritos às populações antigas e até então não descritos na literatura. Os resultados são preliminares e seus significados devem ser avaliados com muita cautela. Contudo, deve-se ressaltar que os quatro novos haplótipos encontrados podem sustentar a hipótese de uma maior diversidade haplotípica em *E. australis* quando a mesma era caçada comercialmente.

Palavras-chave: *Eubalaena australis*; aDNA; Dextran Blue; Haplótipos.

## ABSTRACT

The Southern Right Whale (*Eubalaena australis*) was object of great commercial exploitation between the XVII and XX centuries in the Southern Hemisphere. Recent surveys suggest that the world's population is of 12,000 specimens, which would represent 17% to 21% of its original size. Despite the supposed recovery, the drastic populational decline, resultant from 400 years of hunting activities, could have generated high levels of endogamy, low reproduction capacity and loss of genetic variability of the species, compromising their potential of adjustment, thus increasing their probability of extinction. Due to the exposed, it is of extreme importance the comparative evaluation of the genetic variability between the current *E. australis* population and representative samples from the hunting period, especially from Brazilian coast. Therefore, the purpose of this study was: I. To optimize and compare extraction and amplification methods of aDNA from Southern Right Whale's bones in different stages of deterioration; II. To genetically characterize segments of the mtDNA's D-Loop region from *E. australis* bones collected at Península Valdés in Argentina and Santa Catarina in Brazil, and III. To compare nucleotide sequences of the recovered region from aDNA samples with those described for the current populations. This study compared five different extraction methods in order to obtain genetic material from deteriorated samples. The extraction method containing Dextran Blue reagent showed the higher efficiency. With the amplification of 20 short fragments and overlapping of aDNA through Nested-PCR technique, and further cloning of the latter fragment, it was possible to sequence small fragments, varying from 7 to 59 pb, from the mtDNA's D-loop region from 11 bones samples of *E. australis*, out of the 88 attempts performed. Analyzing the recovered material together with the updated data of the species, the Network 4.6 program revealed a network containing 19 haplotypes, 4 of them generated only with ancient population samples, which are new for the species. The results are still preliminary and their meanings should be evaluated with caution. However, it should be noted that the four new haplotypes found could support the hypothesis of a higher haplotype diversity in *E. australis* when it was hunted.

Key words: *Eubalaena australis*; aDNA; Dextran Blue; Haplotypes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1-** Fragmento de osso de *Eubalaena australis* utilizados no estudo.

**Figura 2-** Fragmento de osso de *Eubalaena australis* utilizados no estudo.

**Figura 3A-** Eletroforese em gel de agarose para a amplificação de aDNA obtido através da extração com o kit *Qiagen DNA Investigator [QIAGEN®]*.

**Figura 3B-** Eletroforese em gel de agarose para amplificação com aDNA extraído com fenol-clorofórmio.

**Figura 3C-** Eletroforese em gel de agarose para amplificação de aDNA obtido pelo protocolo com acetato de sódio.

**Figura 4A-** Eletroforese em gel de agarose para amplificação de aDNA extraído com a utilização de Dextran Blue.

**Figura 4B-** Eletroforese em gel de agarose para amplificação de aDNA extraído com a utilização de Dextran Blue.

**Figura 4C-** Eletroforese em gel de agarose para amplificação de aDNA extraído com a utilização de Dextran Blue.

**Figura 5-** Alinhamento dos fragmentos de aDNA recuperados a partir de ossos de *E. australis* com sequências da região D-Loop do mtDNA depositadas no GenBank.

**Figura 1-** Alinhamento dos fragmentos de aDNA recuperados a partir de ossos de *E. australis*, da região D-Loop do mtDNA, com amostras de espécimes depositados no GenBank.

**Figura 2-** Rede haplotípica construída pelo programa Network 4.6 para os espécimes de *Eubalaena australis* atuais e antigos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Pares de *primers* utilizados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

**Tabela 2-** Funções dos reagentes ativadores utilizados na técnica de PCR.

**Tabela 3-** Tentativas de PCRs convencionais e Nested-PCR para amplificação de aDNA.

**Tabela 4-** Fragmentos de aDNA de ossos de *E. australis* recuperados durante a técnica de clonagem.

**Tabela 1-** Pares de *primers* utilizados na técnica de Nested-PCR.

**Tabela 2-** Fragmentos de aDNA de ossos de *E. australis* recuperados durante o estudo.



## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>10</b>
1.1 A BALEIA-FRANCA-AUSTRAL E O GÊNERO <i>EUBALAENA</i> .....	10
1.2 A BALEIA-FRANCA-AUSTRAL.....	10
<b>1.2.1 A caça da baleia-franca-austral no Sul do Brasil.....</b>	<b>12</b>
1.3 CONSERVAÇÃO DE <i>EUBALAENA AUSTRALIS</i> NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL.....	14
1.4 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO E DNA ANTIGO (ADNA).....	16
<b>Capítulo 1</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 AMOSTRAS.....	20
<b>2.1.2 Preparação das amostras.....</b>	<b>21</b>
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE OSSOS.....	22
<b>2.2.1 Extração de aDNA com o kit <i>Qiagen DNA Investigator [QIAGEN®]</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2 Extração de aDNA com Fenol-Clorofórmio (Sambrook &amp; Russel, 2001).....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3 Extração de aDNA com Fenol-Clorofórmio (Adaptado durante o estudo)...</b>	<b>24</b>
<b>2.2.4 Extração de aDNA com Acetato de Sódio (Cattaneo <i>et al.</i>, 1995).....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.5 Extração de aDNA com Dextran Blue (Kalmár <i>et al.</i>, 2000).....</b>	<b>26</b>
2.3 AMPLIFICAÇÃO DO ADNA.....	26
<b>2.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2 Nested-PCR.....</b>	<b>29</b>
2.4 PRODUÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	30
2.5 CLONAGEM.....	30
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>51</b>

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação tem como objeto de estudo o cetáceo *Eubalaena australis*, popularmente conhecido como baleia-franca-austral. Os ossos utilizados como amostras para as análises genéticas foram coletados previamente (n=105) nas duas principais áreas de reprodução da espécie no Oceano Atlântico Sul Ocidental: Península Valdés, Argentina e Santa Catarina, Brasil. O trabalho foi dividido em dois capítulos e uma introdução geral tratando de diferentes aspectos relativos à espécie, da genética da conservação e de DNA antigo (aDNA). Após os dois capítulos há uma conclusão geral envolvendo a relação das principais ideias de cada um dos capítulos. O capítulo primeiro “**Otimização de métodos de extração e amplificação de DNA antigo (aDNA) em ossos de *Eubalaena australis* (baleia-franca-austral)**” teve como objetivos otimizar e comparar métodos de extração e amplificação de aDNA de ossos de baleia-franca-austral (*E. australis*), em diferentes estados de degradação, com a finalidade de isolar a maior quantidade de ácido nucléico possível, reduzir os inibidores da PCR e contaminações exógenas. O segundo capítulo “**Análise da diversidade genética da baleia-franca-austral, *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822) (Mysticeti, Cetartiodactyla) nos períodos pré e pós caça no Atlântico Sul Ocidental**” teve como objetivos caracterizar geneticamente segmentos da região D-Loop do DNA mitocondrial a partir de ossos de espécimes de *E. australis* coletados na Península Valdés na Argentina e em Santa Catarina no Brasil e comparar as sequências nucleotídicas da região D-Loop recuperadas nas amostras de aDNA com as descritas para as populações atuais.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 A BALEIA-FRANCA-AUSTRAL E O GÊNERO *EUBALAENA*

A baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*) (Desmoulins, 1822) é uma espécie pertencente à Ordem Cetartiodactyla, Subordem Cetacea, Infraordem Mysticeti e junto com a *Eubalaena glacialis* (Muller, 1776), *Eubalaena japonica* (Lacépède, 1818) e *Balaena mysticetus* (Linnaeus, 1758) compõe a família Balaenidae (Cummings, 1985). As três espécies do gênero *Eubalaena* são geograficamente isoladas e apresentam diferenças genéticas no comportamento de acasalamento e período reprodutivo (Cummings, 1985). Em termos de distribuição, *Eubalaena australis* é encontrada no Hemisfério Sul e são reconhecidas a existência de várias populações (Rice, 1998). Por outro lado, *E. glacialis* é formada por somente duas populações encontradas nos oceanos Atlântico e Pacífico Norte (Rosembaum *et al.*, 2000) e *E. japonica*, possui apenas uma população restrita ao oceano do Pacífico Norte, próximo a região do Japão (Gaines *et al.*, 2005).

### 1.2 A BALEIA-FRANCA-AUSTRAL

As baleias-franca são facilmente diferenciadas dos outros cetáceos por possuírem características singulares como: borrifo único em forma de “v”, ausência de sulcos ventrais e nadadeira dorsal. Seu corpo é robusto, sua coloração é negra com uma mancha branca no ventre de tamanho variável, nadadeiras peitorais largas e calosidades ao redor de sua cabeça, boca e orifício respiratório (Cummings, 1985). Essas calosidades são espessamentos na epiderme que surgem nos primeiros meses de vida (Payne *et al.*, 1983) e são infestadas por ectoparasitas da família Cyamidae, sendo o gênero mais comum *Cyamus*. Este anfípodo é o responsável pela coloração branca ou amarelada da pele desta região (Payne *et al.*, 1983; Rowntree, 1993). Apesar da distribuição das calosidades ser padrão nas baleias-franca, a forma, número e tamanho são variáveis em cada indivíduo, permitindo assim uma identificação individual (Payne *et al.*, 1983).

O comprimento total de uma fêmea adulta pode chegar até 18 metros e pesar até 60 toneladas, enquanto os machos, não passariam de 45 toneladas e comparativamente menor do que as fêmeas (Cummings, 1985). A espécie atinge a maturidade sexual em

torno dos seis anos de idade. A primeira gestação ocorre somente aos nove anos e dura entre 11 e 12 meses, sendo que cada fêmea tem em média um filhote a cada três anos (Payne, 1986; Payne *et al.*, 1990). Os filhotes nascem com aproximadamente cinco toneladas (Whitehead & Payne, 1981), medindo seis metros de comprimento (Best, 1994) e permanecendo com as mães por volta de um ano (Hamilton *et al.*, 1998). A longevidade das fêmeas é de aproximadamente 65 anos e sua vida reprodutiva ocorre até os 30 anos, podendo desta forma, ter até nove filhotes durante sua vida (Hamilton *et al.*, 1998).

*Eubalaena australis* apresenta um padrão sazonal de migração, passando os verões em áreas de latitudes altas e com grande produtividade primária (Evans, 1987). Nestas regiões que se encontra o krill (*Euphausia superba*), o principal alimento da espécie e também outros organismos do zooplankton que fazem parte de sua dieta (Clapham, 1999). No Hemisfério Sul as áreas conhecidas de alimentação ficam no entorno das Ilhas da Geórgia do Sul (Moore *et al.*, 1999) e próximas da Convergência Antártica (Goodall & Galeazzi, 1986). Segundo Valenzuela *et al.* (2009) *E. australis* apresentaria fidelidade a área de alimentação e este comportamento seria herdado culturalmente. Desta forma, as mães ensinariam seus filhotes a se localizarem durante seu primeiro ano de vida.

Estudos moleculares embasados tanto em marcadores nucleares quanto mitocondriais realizados por Ott (2002) e Ott *et al.* (2011) verificaram que as baleias-franca de três áreas distintas no Hemisfério Sul (Brasil, Argentina e Ilhas Geórgia do Sul) pertenceriam a uma única população genética que se alimentaria ao redor do arquipélago da Geórgia do Sul. Porém, pesquisas recentes, realizadas a partir de isótopos estáveis de ossos de baleias-franca revelaram uma composição isotópica diferente entre os indivíduos provenientes do Brasil e os da Argentina. Estes resultados sugerem que os grupos estariam se alimentando em áreas distintas e não somente na Geórgia do Sul (Vighi *et al.*, 2014).

Durante o período de reprodução no inverno e primavera austrais, as baleias-franca migram para as suas respectivas áreas reprodutivas, os “stocks” reprodutivos (Cummings, 1985). Sua reserva energética irá suprir suas exigências metabólicas, influenciar no desempenho reprodutivo e no desenvolvimento do seu filhote (Miller *et al.*, 2011). Segundo Miller *et al.* (2012), não existem evidências de que a espécie se alimente durante este período, que dura cerca de cinco meses (Payne, 1986). Contudo o

estudo dos isótopos estáveis realizado por Vighi *et al.*(2014), revelou valores que sugerem que a *E.australis* se alimentaria também em seus “stocks” reprodutivos.

No Hemisfério Sul, existem quatro “stocks” reprodutivos de baleias-franca. Estes são encontrados na costa da África do Sul, na Austrália, nas regiões sub-Antárticas da Nova Zelândia e na América do Sul. Nesta última área com maior concentração nas águas costeiras da Península Valdés (Argentina) e Santa Catarina (sul do Brasil) (IWC, 2001; Payne, 1990). Para este último “stock”, as avistagens da espécie ocorrem entre os meses de julho e dezembro, tendo sua maior densidade entre os meses de setembro e outubro (Payne, 1986).

As baleias-franca que passam o inverno no sul do Brasil estão sendo pesquisadas desde 1986 e aproximadamente 300 indivíduos já foram foto-identificados por meio de suas calosidades (Groch, 2005). Com base nos estudos realizados pela autora, foi possível comprovar que a presença nos “stocks” reprodutivos não é apenas casual, já que cerca de 10% das fêmeas avistadas com filhotes voltaram para a mesma região a cada três anos para procriar. Já as baleias adultas que migram com a finalidade de acasalar foram reavistadas em intervalos de tempo variável, mas também tendem a retornar para a mesma área reprodutiva.

### **1.2.1 A caça da baleia-franca-austral no Sul do Brasil**

*Eubalaena australis* apresenta hábitos costeiros durante a reprodução sendo considerada relativamente lenta, com velocidades de deslocamento que variam entre 5 a 12 km/h durante sua migração sazonal (IWC/Brasil, 1999; Kenney, 2008). Além disso, a espécie possui uma camada de gordura que pode chegar até 26 cm de espessura no período pré gestação (Miller *et al.*, 2011), sendo por estas características chamada de baleia “certa” do sul (do inglês *Southern Right Whale*) e alvo de grande exploração comercial durante os séculos XVII a XX no Hemisfério Sul (IWC, 2001). Estima-se que durante este período foram capturadas aproximadamente 48000 baleias-franca no Oceano Atlântico, 37200 no Oceano Pacífico e 12500 no Oceano Índico (Dawbin 1986; Du Pasquier 1986; Best, 1987). A captura desta espécie durou cerca de 400 anos, levando a *E. australis* à beira da extinção (Ellis, 1969).

O histórico da caça comercial de baleias no Brasil começa em 1746, com a instalação da primeira armação baleeira no estado de Santa Catarina (Ellis, 1969). Esta construção foi chamada de Armação Nossa Senhora da Piedade e se localizava no atual

município de Celso Ramos (Ellis, 1969). Com o passar dos anos mais cinco edificações foram construídas no Estado (Saint-Hilaire, 1978): em 1772 foi fundada a Armação Lagoinha localizada na Praia da Armação em Florianópolis; em 1778 foi criada a Armação Itapocoróia na cidade de Piçarras; em 1795 foi construída a Armação São Joaquim de Garopaba; em 1796 foi instalada a Armação Sant'Anna de Imbituba, na cidade de Imbituba e em 1807 foi construída a última Armação, chamada de Armação Ilha da Graça, localizada no Canal São Francisco (Saint-Hilaire, 1978).

A armação Nossa Senhora da Piedade foi a maior e mais completa de todas. Esta contava com trapiche, capela, ferraria, casa de feitores, casa-grande, engenho de frigar composto por vinte caldeiras de ferro, engenho de azeite e três casas de tanques que possuíam treze reservatórios para armazenar azeite, totalizando 6329,50 m<sup>3</sup>. Além disso, esta Armação contava com hospital, armazéns, casa de depósito de lenha, telheiro para construção, quatro casas destinadas aos baleeiros e senzala, que eram distribuídas em quarenta e quatro casas e dois armazéns anexos (Ellis, 1969).

Todas as Armações foram construídas em enseadas, locais abrigados dos ventos e da agitação do mar, deste modo a caça e o trânsito de barcos eram facilitados (Ellis, 1969). Segundo Saint-Hilaire (1978), entre os anos 1748-1750, somente a Armação Nossa Senhora da Piedade capturou cerca de 500 baleias, em 1777 a Armação Itapocoróia caçou 300 baleias. Com a intensidade da caça ao longo do tempo o declínio da população destes cetáceos foi observado e em 1819 as seis armações catarinenses juntas capturaram apenas 59 animais (Saint-Hilaire, 1978).

Os equipamentos para a caça evoluíram de arpão com haste de madeira para as chamadas “bombaliças”, lanças com dinamites acopladas. Em 1952 foi implementado o uso de canhões no Estado de Santa Catarina, o que facilitava muito esta atividade (Palazzo & Carter, 1983). Em todo período de exploração o objetivo da caça nunca foi o consumo da carne, e sim a gordura da baleia era o principal interesse. Cada baleia rendia em média 15 barris de óleo (Saint-Hilaire, 1978). Este óleo era utilizado para fabricação de argamassa, iluminação (principal uso até metade do século XIX) e lubrificação. As cerdas bucais também eram comercializadas e úteis na fabricação de espartilhos. Segundo Palazzo & Carter (1983), a última baleia morta no estado de Santa Catarina foi no ano de 1973, esse cetáceo tinha 14 metros de comprimento e rendeu 40 tambores com 200 quilos de óleo.

A lei contra a caça da *E. australis* foi implementada em 1935 (IWC, 2001) e teve sua reafirmação em 1942, com a criação da Comissão Internacional Baleeira (do inglês

“International Whaling Comission” - IWC) (Donovan, 1992). Porém esta lei não foi respeitada e durante os anos 60 a espécie sofreu exploração adicional. Sua captura ocorreu até 1973, período onde não houve registros da espécie na costa brasileira (Palazzo & Carter, 1983). A proibição oficial da caça comercial da baleia-franca no Brasil foi efetivada em 1987 (Lei Federal N° 7643, de 18 de dezembro de 1987).

Acredita-se que a população original de baleia-franca-austral, estimada entre 55.000 e 70.000 indivíduos no período pré-caça (IWC 2001), foi tão reduzida devido a exploração irracional ao ponto da espécie ter chegado à beira da extinção no Hemisfério Sul, sendo somente reavistadas no litoral Sul do Brasil na década de 80 (Câmara & Palazzo, 1986). Segundo estudos realizados por Groch (2005) entre os anos de 1997 e 2003, o número de fêmeas reprodutivas encontradas no Estado de Santa Catarina teve um aumento de 29,8% ao ano. Tal aumento pode ser consequência da imigração de outros “stocks” reprodutivos, como o da Argentina (Best *et al.*, 1993).

De acordo com Best (1988), a recuperação da população mundial de *E. australis* só começou ocorrer há cerca de 40 anos de forma lenta, apresentando uma taxa de crescimento de 7 a 8% ao ano (IWC, 2001). Estimativas recentes indicam que a população atual de *E. australis* é de aproximadamente 12.000 indivíduos (IWC, 2012), o que representaria 17 a 21% do seu tamanho populacional original. Todavia, dados moleculares sugerem que a espécie sofreu um gargalo genético significativo durante o final do Pleistoceno e início do Holoceno (22 e 6 mil anos atrás) (Oliveira *et al.*, 2011). Portanto, mesmo com fortes sinais de recuperação o declínio drástico no número populacional pode ter causado a diminuição da variabilidade genética da espécie (Oliveira *et al.*, 2011) antes mesmo da atividade da caça no século XVII.

### 1.3 CONSERVAÇÃO DE *EUBALAENA AUSTRALIS* NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL

*Eubalaena australis* está classificada como uma espécie vulnerável (VU) na categoria de ameaças da IUCN (2008) e no livro vermelho do Brasil faz parte da categoria em perigo (EN) (ICMBIO, 2005). Nos últimos anos, foram registradas aproximadamente 420 mortes de baleias-franca na área de reprodução na Península Valdés, cerca de 90% destes animais eram filhotes com menos de três meses de vida (Sironi *et al.*, 2012). Segundo Rowntree *et al.* (2010), entre 2007 e 2009 foi verificada uma média de 79 mortes por ano, isto representaria mais de um quinto dos filhotes

nascidos em 2008. A alta taxa de mortalidade ainda não foi explicada, porém no workshop realizado pela IWC em 2010 na Argentina foram propostas três hipóteses: pouca disponibilidade de alimento, exposição a biotoxinas e doenças infecciosas (IWC, 2010).

Além disso, a degradação de habitat, colisões com embarcações, poluição e emalramento em equipamentos de pescas são outros fatores que atingem fortemente sua conservação (Clapham *et al.*, 1999). No ano de 2010 foram registrados seis emalhamentos com baleias-franca em Santa Catarina, sendo as redes avistadas nas calosidades, orifício respiratório e cabeça do animal, o que muitas vezes resultou em encalhes e mortes (Pontalti *et al.*, 2011).

Segundo Vermeulen *et al.* (2012), o turismo de observação e o nado com as baleias podem gerar uma grande perturbação para o indivíduo. O comportamento calmo e tranquilo da *E. australis* também está sendo comprometido com a interação interespecífica com a gaivota *Larus dominicanus*. Esta ave marinha desenvolveu o hábito de atacar as baleias-franca que habitam a Península Valdés, a fim de se alimentar da pele descamada do dorso do animal e de sua gordura. O episódio foi primeiramente observado em 1984, descrito por Thomas (1988) e está se tornando mais comum nos últimos anos. Estudos realizados por Rowntree *et al.* (1998) mostraram um aumento nos ataques de *L. dominicanus* em *E. australis* de cinco vezes em 1995 na Argentina. No Estado de Santa Catarina, o molestamento às baleias-franca é mais raro, tendo sido observado o primeiro registro em 1998 por Groch (2000). No ano de 2009, durante um monitoramento aéreo, Rodrigues *et al.* (2010) acompanharam outro caso semelhante. Segundo os autores, cerca de 10 gaivotas atacaram uma mãe com seu filhote. Na maioria dos casos, as baleias-franca recuam, mergulham e nadam rapidamente, gerando um estresse que muitas vezes pode resultar em alto gasto energético, abandono e morte do filhote (Rodrigues *et al.*, 2010).

A alta taxa de mortalidade de baleias-franca, oriunda de eventos naturais, gargalos genéticos (do inglês *bottleneck*) ou até mesmo pela atividade da caça (como ocorreu no passado), é sem dúvida preocupante, pois com o declínio no tamanho efetivo da população pode ocorrer a diminuição da variabilidade genética nas gerações seguintes, aumentando assim os riscos de extinção da espécie (Allendorf & Luikart, 2007).

#### 1.4 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO E DNA ANTIGO (ADNA)



Com o surgimento da genética da conservação na década de 1980 a utilização de marcadores moleculares associados às bases teóricas da genética de populações e, mais recentemente, a teoria de coalescência, foi possível ter uma maior compreensão sobre a distribuição da variabilidade genética existente em populações dos mais diferentes táxons. Tais estudos vêm sistematicamente fornecendo importantes informações e auxiliando em programas de conservação dos ecossistemas e espécies (Allendorf & Luikart, 2007).

A variabilidade genética é fundamental para evolução, pois fornece o material básico para a seleção natural, aumenta o potencial adaptativo e diminui as taxas de endocruzamento (Awise, 1994). O cruzamento entre indivíduos aparentados gera um desvio na aleatoriedade dos cruzamentos aumentando a homozigose. A baixa variabilidade genética e o endocruzamento aumentam também a possibilidade de combinação de variantes alélicas deletérias surgirem, o que pode gerar altas taxas de mortalidade, redução na fertilidade, crescimento lento ou instabilidade no desenvolvimento dos indivíduos que deveriam contribuir para próxima geração (Lacy, 1997; Solé-Cava, 2004).

Um genoma altamente utilizado em estudos populacionais, evolutivos e de demografia é o DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA é herdado preferencialmente pela linhagem materna, seu genoma é pequeno aproximadamente 16.000 pb em vertebrados (Brown *et al.*, 1982). Sua estrutura é simples, livre de íntrons e elementos de transposição, sendo assim, de fácil isolamento e análise (Awise *et al.*, 1987). Possui muitas cópias por célula o que torna o processo de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) mais eficaz (Morin *et al.*, 2007). Além disso, este marcador não possui mecanismo de reparo e sua taxa de substituição de nucleotídeos é de 5 a 10 vezes maior que no DNA nuclear. Desta forma, a evolução do mtDNA ocorre de forma mais rápida ao se comparar com outras regiões codificantes do genoma nuclear (Allendorf & Luikart, 2007).

Muitos estudos têm utilizado a região D-loop ou controladora do mtDNA como marcador para acessar a variabilidade genética existente nas populações. Esta região não é codificadora e contém elementos regulatórios para replicação e expressão do genoma mitocondrial (Sbisà *et al.*, 1997). Caracteriza-se por apresentar uma grande variabilidade genética e evoluir de forma mais rápida se comparada com as regiões de genes codificantes do genoma mitocondrial e do genoma nuclear (Hoelzel *et al.*, 1991).

Deleções e inserções na região D-loop ocorrem com menos frequência nos cetáceos se comparadas com outros vertebrados. Segundo Jackson *et al.* (2009), a taxa de substituição nucleotídica dos Mysticetos é de 8 a 10 vezes menor que outros mamíferos, podendo este fato estar relacionado ao tamanho do corpo do animal e seu longo período reprodutivo.

Apesar disto, a região controladora do mtDNA tem se mostrado a melhor região para analisar o DNA antigo de uma espécie. O DNA é considerado antigo quando recuperado de amostras degradadas ou arqueológicas (Lejzerowicz *et al.*, 2013), sendo assim pesquisas com aDNA baseiam-se na recuperação de material genético a partir de amostras mineralizadas e contribuem na reconstrução histórica da população comparando-se as informações genéticas antigas com as atuais (Der Sarkissian *et al.*, 2013). Tais pesquisas, muitas vezes apresentam grandes dificuldades nas técnicas de extração e amplificação do material genético devido ao alto nível de degradação das amostras. Para amenizar tal problema a técnica de clonagem de fragmentos de DNA tem sido muito utilizada nesta área de estudo (Rizzi *et al.*, 2012). Krings *et al.* (1997) reconstruíram uma sequência de aDNA de um hominídeo extinto (*Homo sapiens neanderthalensis*) por meio de uma metodologia que hoje é considerada clássica (Rizzi *et al.*, 2012). A metodologia consiste basicamente em amplificar diversos fragmentos curtos e sobrepostos de aDNA (60-200 pb). Cada fragmento amplificado é clonado e após isso, são selecionados vários clones da mesma amostra para o sequenciamento. Por fim, com o alinhamento das sequências é possível fazer uma comparação e reconstruir a região de interesse (Krings *et al.*, 1997; Rizzi *et al.*, 2012). Com a análise do aDNA é possível compreender diversos parâmetros populacionais como a perda de variabilidade genética, fluxo gênico, tamanho efetivo da população, expansão ou declínio e divergência populacional (Hoelzel, 1994; Roman & Palumbi, 2003).

Frente ao exposto é de extrema importância a avaliação comparativa da variabilidade genética entre as populações atuais de *Eubalaena australis* e amostras representativas do período de caça, em especial no Brasil.

## OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo geral criar um protocolo padrão de extração e amplificação de aDNA extraído a partir de ossos de diferentes indivíduos de *Eubalaena*

*australis*, coletados nas principais áreas de reprodução do Atlântico Sul Ocidental. Com isso, viabilizar a análise da variabilidade genética histórica da espécie e detectar uma potencial perda da mesma ao longo do tempo.

### **Objetivos específicos**

- A) Demonstrar, de forma comparativa, métodos de extração e amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de aDNA, afim de otimizar a obtenção de material genético a partir de ossos de baleia-franca-austral (com mais de 40 anos) em diferentes estados de degradação.
- B) Caracterizar geneticamente segmentos da região D-loop a partir de ossos de espécimes de *E. australis* coletados na Península Valdés na Argentina e em Santa Catarina no Brasil. Comparar essas sequências nucleotídicas recuperadas nas amostras de aDNA com as descritas para as populações atuais.

## Otimização de métodos de extração e amplificação de DNA antigo (aDNA) em ossos de *Eubalaena australis* (baleia-franca-austral)

### 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço das técnicas moleculares, tais como sequenciamento de última geração, tornou-se possível analisar não somente o DNA atual das espécies, mas também verificar o perfil histórico de uma população, a partir do estudo do DNA antigo (aDNA) (Rizzi *et al.*, 2012). Pesquisas realizadas com mamíferos marinhos têm revelado um grande potencial nas amostras de aDNA oriundas de materiais mineralizados, como ossos, dentes e barbatanas (Foote *et al.*, 2012). Tais amostras estão fornecendo informações essenciais para a compreensão de diversos parâmetros populacionais como a perda da variabilidade genética de uma espécie (decorrente de exploração - caça comercial) e a detecção de mudanças no fluxo gênico ao longo do tempo, ambos através do estudo do mtDNA (DNA mitocondrial). Análises com o genoma mitocondrial também estão esclarecendo questões relacionadas à distribuição geográfica de espécies e auxiliando na resolução taxonômica destas (Valentine *et al.*, 2008; De Bruyn *et al.*, 2009; Foote *et al.*, 2012).

Apesar de promissoras, as pesquisas com aDNA vêm apresentando dificuldades e problemas específicos como contaminação por DNA exógeno, presença de inúmeros agentes inibidores da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e degradação do material genético, este último podendo ocorrer devido ao avançado estado de decomposição das amostras (Rohland & Hofreiter, 2007). A decomposição dos tecidos ósseos ou mineralizados é influenciada tanto pela ação de microrganismos, fungos e bactérias em solos aerados, e cianobactérias em ambientes marinhos (Pesquero *et al.*, 2010), quanto pelo pH e quantidade de sal presentes no solo onde a amostra foi coletada. A exposição à radiação, disponibilidade de oxigênio e temperatura do ambiente (Lindahl, 1993) também influenciam na estrutura celular das amostras, que muitas vezes encontram-se tão degradadas que resultam em baixas concentrações de DNA nas extrações e/ou fragmentos curtos recuperados, os quais seriam utilizados

como molde (do inglês *template*) nas ampliações pela PCR (Geigl, 2002; Rohland & Hofreiter, 2007; Rizzi *et al.*, 2012).

Cabe ressaltar que a redução no tamanho dos fragmentos do aDNA (geralmente entre 100-500 pb) ocorre em decorrência do processo enzimático de hidrólise nas ligações fosfodiéster e glicosídicas. Nesse processo de clivagem as bases nucleotídicas podem ser alteradas ou removidas (Lindahl, 1993; Hofreiter *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, inserindo mudanças no material genético (Thomas *et al.*, 1989).

A contaminação de material genético exógeno nas amostras de aDNA é um problema que vem sendo relatado em diversos estudos e pode comprometer a autenticidade dos resultados (Cooper & Poinar, 2000). O DNA exógeno pode ser proveniente do próprio processo de decomposição das amostras, mas também pode surgir através de contaminações existentes no laboratório, a partir de outras amostras e materiais como tubos, pipetas e ponteiras não esterilizadas (Cooper & Poinar, 2000). Além da degradação presente nos tecidos ósseos e a grande chance de contaminação das amostras, compostos orgânicos (como colágeno, íons de cálcio ou ácido húmico) e a alta concentração de reagentes (dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), fenol e outros) utilizados nas técnicas de extração de DNA podem atuar como inibidores durante as ampliações pela PCR (Moreira, 1998). Além de inibir a atividade da enzima *Taq* Polimerase durante a PCR, os agentes inibidores podem interferir no rompimento celular e na degradação do DNA (Alaeddini, 2012).

Com a finalidade de minimizar tais problemas e recuperar aDNA íntegro, vêm sendo testados diversos protocolos (Kalmár *et al.*, 2000; Barnett & Larson, 2012; Campos *et al.*, 2012). Para isolar a maior quantidade de ácido nucléico possível, reduzir os inibidores da PCR e contaminações exógenas, este trabalho teve como objetivo otimizar e comparar métodos de extração e amplificação de aDNA de ossos de baleia-franca-austral (*E. australis*) em diferentes estados de degradação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS**

Para a realização desta pesquisa foram previamente coletados ossos de *Eubalaena australis* (n=75) pelo Dr. Enrique Alberto Crespo do *Laboratorio de Mamiferos Marinos* (LAMAMA) do *Centro Nacional Patagónico* (CENPAT), pela

Dra. Larissa Rosa de Oliveira do Laboratório de Ecologia de Mamíferos (LEM) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) e pelo Dr. Paulo A. C. Flores do Centro Mamíferos Aquáticos do Instituto Chico Mendes de Santa Catarina (CMA-ICMBio), nas duas principais áreas de reprodução da espécie no Oceano Atlântico Sul Ocidental: Península Valdés (42°30'S; 64°30'W), Argentina (n=35) e Santa Catarina, Brasil (n=40) (entre 29°30'S; 49°41'W e 25°56'S; 48°28'W). Para as coletas das amostras e identificação individual, os pesquisadores (especialistas em cetáceos) utilizaram diversos critérios como: localidade e distância entre os ossos, região óssea e tamanho dos fragmentos coletados. Desta forma cada amostra coletada corresponde a um indivíduo diferente.

As amostras identificadas com códigos, locais e datas de coleta foram enviadas para o LEM - UNISINOS. No Laboratório de Biologia Molecular da UNISINOS foram tomadas todas as precauções necessárias para evitar contaminação externa das amostras e garantir a integridade do aDNA seguindo o protocolo de Cooper & Poinar (2000). Cada fragmento de osso utilizado no estudo apresentou um alto nível de degradação (Figura 1 e 2), causada tanto por fatores ambientais (exposição solar, umidade, tempo de contato com água do mar), como pela ação do tempo.

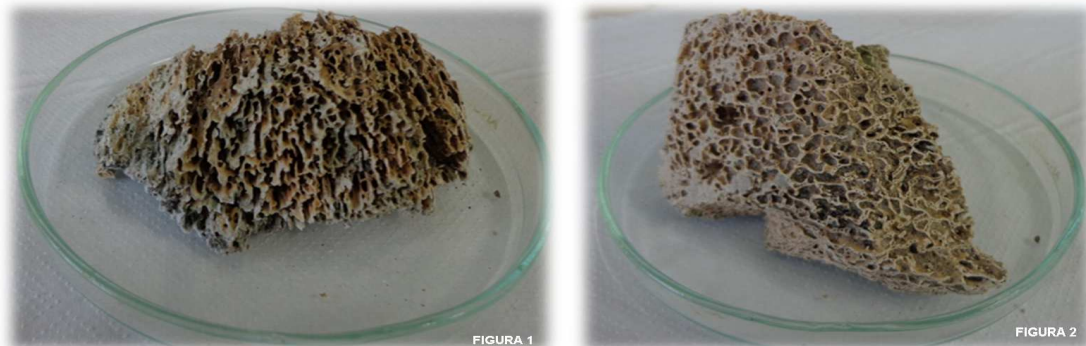


Figura 1 e 2. Fragmentos de ossos de *Eubalaena australis* de aproximadamente 15 cm utilizados no estudo. Nota-se que o material apresenta grande porosidade e alto nível de degradação.

### 2.1.2 Preparação das amostras

Cada amostra (fragmento de osso) de 5 a 15 cm foi primeiramente pulverizada mecanicamente com o auxílio de um moedor elétrico (Walita/ Philips) e macerada com nitrogênio líquido. Este procedimento foi fundamental para a extração do aDNA, pois aumentou a área de contato do pó de osso, resultante da maceração, com os reagentes e enzimas utilizadas no processo de quebra mecânica celular. Após macerados, os ossos

em pó (aproximadamente 400 mg) passaram por um processo de descalcificação. Segundo estudos prévios, tal procedimento influencia tanto na extração quanto a tipagem do DNA, já que o cálcio demonstrou ser um grande inibidor na amplificação pela PCR (Imaizumi *et al.*, 2005; Bessetti, 2007).

A descalcificação das amostras ocorreu com a adição de EDTA (Ácido Etileno-Diamino Tetracético) a 0.5 M, pH 8,0, por 72 horas, com agitação e troca de reagente a cada 24 horas (Hagelberg *et al.*, 1991; Imaizumi *et al.*, 2005). Por fim, as amostras foram lavadas com água ultrapura e centrifugadas. Esse procedimento foi repetido por três vezes para cada amostra, a fim de garantir a retirada absoluta do EDTA. As amostras foram secas a 35 °C por 12 horas e armazenadas em um tubo Falcon de 15 ml devidamente identificado.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE OSSOS

A técnica de extração de DNA de ossos consiste na obtenção de ácidos nucleicos a partir de duas fases básicas (Sepp *et al.*, 1994). Na primeira fase é adicionada na amostra uma solução tampão de digestão enzimática (Tris-HCl a 10 mM, soluções salinas como NaCl, MgCl<sub>2</sub> ou KCl, normalmente na concentração de 100 mM ou 50 mM e EDTA a 10 mM), detergentes, surfactantes, na concentração de 2 ou 10% (dodecil sulfato de sódio, brometo de cetiltrimetilamonio, lauril sarcosina, entre outros) e proteinase-K (20 mg/ml). Durante esse processo, as enzimas rompem os lipídios da membrana plasmática e organelas (lise celular), a proteinase-K desnatura as proteínas responsáveis pela proteção do DNA no cromossomo e o EDTA, como agente quelante, protege o ácido nucleico da ação das enzimas (Sambrook & Russel, 2001).

A segunda fase consiste na remoção dos resíduos celulares, proteínas e precipitação do material genético. Para tanto, os ácidos nucleicos sofrem a adição de solventes orgânicos, tampões de lavagem ou álcool isoamílico, e são separados das proteínas, lipídios e demais moléculas celulares através de centrifugação (Walker & Rapley, 1999). Por fim, com adição de álcool (etanol, isopropanol ou butanol) e solução salina (acetato de amônia, cloreto de sódio ou acetato de sódio), as moléculas de DNA se juntam e se precipitam, enquanto os outros componentes celulares permanecem dissolvidos na solução (Sambrook & Russel, 2001).

Neste estudo foram testados cinco métodos de extração de aDNA, os quais são descritos abaixo.

### **2.2.1 Extração de aDNA com o kit *Qiagen DNA Investigator [QIAGEN®]*- Método 1**

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, foram adicionados 100 mg de pó de osso de baleia-franca-austral, 360 µl de tampão ATL, 20 µl de proteinase-K (20 mg/ml) e 1 µl de carreador RNA. Com objetivo de gerar a lise celular, este material ficou incubado em uma temperatura de 56 °C entre 12 e 24 horas. Após este período, foram adicionados 300 µl de tampão AL nas amostras e estas ficaram em banho- maria a 70 °C durante 10 minutos. Os insolúveis foram precipitados pela centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, onde nele foram adicionados 150 µl de etanol absoluto (96-100%). A solução foi homogeneizada e transferida para a coluna MinElute QIAamp, em um tubo de coleta de 2 ml. O objetivo desta coluna é reter o DNA encontrado, enquanto outros resíduos celulares passam por meio de lavagens e centrifugação.

O material foi centrifugado a 6000 xg por 1 minuto, em seguida o filtrado foi descartado e a coluna MinElute QIAamp foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 ml. Foram adicionados na coluna (onde se encontra o DNA) tampões de lavagem. O primeiro tampão utilizado foi o AW1 e após centrifugação de 6000 xg por 1 minuto, foi adicionado o tampão AW2. A coluna MinElute QIAamp foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e foram adicionados 700 µl de etanol absoluto (100%) em baixas temperaturas. Ocorreu novamente uma centrifugação (nas mesmas condições anteriores) e a coluna foi incubada a 56 °C por 3 minutos para a secagem da membrana. Por fim, foram adicionados 20 µl de água ultrapura (MiliQ) para a resuspensão do DNA, seguido por uma centrifugação em velocidade máxima de 14.000 rpm por 1 minuto.

### **2.2.2 Extração de aDNA com Fenol-Clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001)- Método 2**

Foram transferidos 360 mg de pó de osso para um tubo de microcentrífuga 1,5 ml contendo 600 µl de tampão de lise (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA e SDS (dodecil sulfato de sódio) 2%), 40 µl de proteinase-K (20 mg/ml) e 48 µl de DTT. Esse material foi homogeneizado e incubado a 56 °C entre 12 e 48 horas. Após esse período, foram adicionados 600 µl de fenol-clorofórmio e o conteúdo foi



homogeneizado por 10 segundos. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 9000 xg e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml. O mesmo volume do sobrenadante transferido (quantidade estimada) foi adicionado de clorofórmio em cada amostra, as quais foram homogeneizadas por 15 segundos e centrifugadas por mais 10 minutos a 9.000 xg.

A solução resultante ficou dividida em duas fases sendo a fase aquosa (sobrenadante) transferida para um novo microtubo de 1,5 ml. A transferência deve ser com muito cuidado para evitar que o sobrenadante se misture com a camada de proteínas localizada entre as fases. Em seguida, 10% do volume do sobrenadante transferido foi adicionado de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) junto com 10% de isopropanol gelado (-4° C). A mistura foi feita por inversão do microtubo, durante 90 segundos. As amostras foram deixadas em repouso por 2 horas a -20 °C, para precipitação do DNA. Em seguida, ocorreu uma centrifugação de 13.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Para a lavagem do precipitado, foram adicionados 350 µl de etanol 70%. A solução foi homogeneizada e centrifugada por 2 minutos a 13.000 xg. O sobrenadante foi removido e novamente foram adicionados 350 µl de etanol 70%, para uma segunda lavagem. Posteriormente o precipitado foi centrifugado nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi descartado e as amostras ficaram em uma estufa a 55 °C por 20 minutos, para eliminar os resíduos do álcool. Por fim, foram adicionados 20 µl de T.E (Tris-HCl a 1 M, pH 8,0 e EDTA a 0.5 M, pH 8,0) nas amostras e armazenadas em temperatura de 4 °C até fase de amplificação do aDNA.

### **2.2.3 Extração de aDNA com Fenol-Clorofórmio (protocolo otimizado pelo Laboratório de Biologia Molecular- UNISINOS)- Método 3**

Foram transferidos 360 mg de pó de osso de baleia-franca-austral para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 600 µl de tampão de lise (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA e SDS 2%), 40 µl de proteinase-K (20 mg/ml) e 48 µl de DTT. Esse material foi homogeneizado e incubado a 56 °C entre 12 a 48 horas. Após esse período, foram adicionados 50 µl de acetato de potássio a 5 M e as amostras ficaram em uma temperatura de - 4 °C por 15 minutos. A solução foi submetida à centrifugação a 13.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo de 1,5 ml. Em seguida, foram adicionados 400 µl de fenol-clorofórmio

e homogeneizado por 5 minutos (primeira limpeza para remover proteínas). Posteriormente foi feita uma nova centrifugação à 13.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 ml. Foram adicionados 400 µl de clorofórmio, a solução foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições anteriores.

Para a segunda etapa de remoção de proteínas, foram adicionados novamente 400 µl de fenol-clorofórmio e homogeneizado por 5 minutos. Após centrifugação a 13.000 xg durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 400 µl de clorofórmio, a solução foi novamente homogeneizada e centrifugada à 13.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foram adicionados 700 µl de isopropanol. A solução foi novamente homogeneizada utilizando-se de “vortex” por 10 segundos e permaneceu 1 hora a - 4 °C, para precipitação dos ácidos nucleicos. Após esse tempo, o material foi centrifugado a 13.000 xg por 30 minutos e houve o descarte do sobrenadante. Foram adicionados ao "pellet" 700 µl de etanol 70%, e logo após a solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 13.000 xg. O etanol foi removido e o microtubo contendo o "pellet" ficou em temperatura de 70 °C por 30 minutos, para a retirada total do álcool. Por fim, o DNA foi resuspenso em 40 µl de água ultrapura. As amostras foram armazenadas a 4 °C até a fase de amplificação do aDNA.

#### **2.2.4 Extração de aDNA com Acetato de Sódio (Cattaneo *et al.*, 1995)- Método 4**

Em um tubo Falcon de 10 ml foram adicionadas 360 mg de pó de osso de baleia-franca-austral, 2 ml de tampão de lise (10 mM Tris-HCL (pH 7,6), 10 mM EDTA e 50 mM de NaCl), 20 µl de proteinase-K (20 mg/ml) e 50 µl de SDS a 10%. Com o objetivo de ocorrer a lise celular, o material ficou incubado entre 24 e 48 horas a temperatura de 42 °C, com agitação.

Após esse período, foi adicionado 1 ml de acetato de sódio saturado (5 M) na solução, homogeneizado por 30 segundos e centrifugado por 10 minutos a 4000 xg. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo tubo Falcon de 15 ml e nele foram adicionados 4 ml de isopropanol 100%. O material foi homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µl de etanol 70% no precipitado. A solução foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugada por 10 minutos a

13.000 xg. O sobrenadante foi novamente descartado, e após 20 minutos em uma estufa a 56 °C, foram adicionados 20 µl de água ultrapura para suspensão do DNA. As amostras foram armazenadas a 4 °C até a fase de amplificação do aDNA.

### **2.2.5 Extração de aDNA com Dextran Blue (Kalmár *et al.*, 2000)- Método 5**

Foram triturados 360 mg de pó de osso de baleia-franca-austral e adicionadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 1 ml de tampão de lise (0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,5% Sarcosina-Na) ou (Tris-HCl 1 M (pH 8,0) 0,5 M EDTA (pH 8,0), SDS 10% e 5 M de NaCl) e 25 µl de proteinase-K (20 mg/ml). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C entre 48 e 72 horas. Após o período de lise celular, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 xg. Em um novo microtubo de 1,5 ml, foram adicionados 350 µl do sobrenadante das amostras, 3,5 µl de Dextran Blue (1 µg/ µl), 700 µl de etanol absoluto e 350 µl de acetato de amônio 4 M. As amostras foram homogeneizadas durante 10 segundos e deixadas em repouso em temperatura de -20 °C durante 30 minutos, para a precipitação do DNA.

Após o tempo necessário, ocorreu uma centrifugação em uma velocidade de 13.000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e as amostras foram submetidas a banho seco por 20 minutos a 56 °C, para eliminar os resíduos do álcool. O DNA foi suspenso em 20 µl de água ultrapura e armazenado em temperatura de 4 °C.

### **2.3 AMPLIFICAÇÃO DO aDNA**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica utilizada em análises moleculares que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA de interesse. Durante esse processo, a fita dupla de DNA é desnaturada e em seguida, duas sequências de nucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, hibridizam com as fitas opostas, flanqueando a região que será amplificada. Com a utilização da enzima *Taq* Polimerase e desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) ocorre a síntese do DNA, complementar a fita molde (Innis *et al.*, 1990).

A amplificação do aDNA foi de um segmento correspondente a região D-loop do genoma mitocondrial. Esta foi selecionada por apresentar características que fazem dela a mais indicada para análises populacionais, inclusive com mamíferos marinhos (Binladen *et al.*, 2006; Morin *et al.*, 2007). A região D-loop não é codificadora, apenas

contém elementos regulatórios para replicação e expressão do genoma mitocondrial (Sbisà *et al.*, 1997). Caracteriza-se por possuir uma grande variabilidade genética e evoluir de forma mais rápida se comparada com as regiões de genes codificantes do genoma mitocondrial e nuclear (Hoelzel *et al.*, 1991).

Para a realização da técnica de PCR e amplificação de 500-pb da região D-loop do mtDNA (DNA mitocondrial), primeiramente utilizamos os *primers*: DLPF10 (5'-CCACAGTACTATGTCCGTATT-3') e DLPR5(5'-CCATCGWGATGTCTTTTAA GRGGAA-3') como *primer* senso e anti-senso respectivamente (Baker *et al.*, 1993). Porém, em decorrência da fragmentação do aDNA obtido pelas extrações foi necessária a construção de novos *primers*. Sendo assim, através do banco de dados GenBank e os programas Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) e Mega 5.1 (<http://www.megasoftware.net/>), foram criados 11 *primers* novos, específicos para a espécie *Eubalaena australis* (Anexo 1). Os iniciadores foram criados com o objetivo de hibridizar em regiões conservadas e amplificar sequências menores e variáveis do DNA alvo, aproximadamente 300 pb, 200 pb, 100 pb e 90 pb.

### 2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amplificações pela PCR da região D-loop do mtDNA foram realizadas utilizando-se dos pares de *primers* construídos (Tabela 1). O objetivo da utilização desse conjunto de *primers* foi de reconstruir uma sequência de aDNA mais longa com a junção dos amplicons obtidos. Para obter os resultados esperados, as reações das amplificações foram conduzidas em volumes variados (25 µl, 40 µl e 50 µl) e foram testados diversos mix de reagentes com concentrações e otimizadores diferentes (Anexo 2).

A amplificação do aDNA ocorreu com a adição de 12,5 µl de PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 2 µl de *primer* senso, 2 µl de *primer* anti-senso (concentração de 10 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM) 0,6 µl de betaina (5 M), 13,4 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA, para um volume final de 40 µl. Utilizamos também a enzima otimizada PWO, com a finalidade de obter melhores resultados. Esta amplificação ocorreu com a adição de 12,5 µl de PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 2 µl de

*primer* senso, 2 µl de *primer* anti-senso, 5 µl de Buffer, 0,2 µl de PWO DNA polimerase, 24,3 µl de água ultrapura e 4 µl de DNA. Volume final de 50 µl.

Além do MgCl<sub>2</sub> e betaína, os reagentes BSA (albumina de soro bovino) e DMSO (dimetil sulfoxido) também foram utilizados para aumentar a especificidade e rendimento de PCR (Tabela 2). A PCR ocorreu com a adição de 12,5µl de PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 1 µl de *primer* senso, 1 µl de *primer* anti-senso (concentração de 20 µM), 1 µl de BSA (10 mg/ml) ou 1 µl de DMSO, 1 µl MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,5 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA, com volume final de 25 µl.

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

<i>Primer</i> senso	<i>Primer</i> anti-senso	Tamanho da amplificação
*DLPF22- 5'-CCACCATCAGCACCCAAAGC-3'	*DLPR186-5'-AGGACCAGTATTGGCCATGT-3'	164-PB
*DLPF169-5'-ATGGCCAATACTGGTCCTGA-3'	*DLPR371-5'-GATCTAATGGAGCGGCCATA-3'	202-PB
*DLPF177- 5'-TTTCACTACGGGAAGTTAAAGCTCG-3'	*DLPR473-5'-GAACGAATGGGCGATTCTAA-3'	296-PB
*DLPF360-5'-GATCCCTCTTCTCGACC-3'	*DLPR473-5'-GAACGAATGGGCGATTCTAA-3'	115-PB
*DLPF164-5'-CGGGAAGTTAAAGCTCGTAT-3'	*DLPR289-5'-ATCTAATGGAGCGGCCATA-3	126-PB
*DLPF337-5'-GGGATCCCTCTTCTCGACC-3	*DLPR427-5'-ATGGCCCTGAAGTAAGAACCAG-3'	91-PB
**DLP5-5'- CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3'	**DLP10-5'- CCACAGTACTATGTCCGTATT-3'	500-PB

\**Primers* desenvolvidos no presente estudo. \*\* *Primers* descritos por Baker *et al.*, (1993).

Tabela 2. Funções dos reagentes otimizadores utilizados na técnica de PCR.

Reagentes	Função
Betaína	Aumenta a amplificação de sequências ricas em GC
DMSO	Impede a formação de estruturas secundárias no DNA
BSA	Liga-se nas impurezas das amostras, diminuindo inibidores de PCR
MgCl <sub>2</sub>	Ativador da enzima <i>Taq</i> polimerase

Devido à grande fragmentação encontrada nas amostras e a baixa concentração de DNA recuperado, as reações de amplificações pela PCR foram realizadas com diferentes quantidades de aDNA (1 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 8 µl e 10 µl). No termociclador, o ciclo de temperatura foi 95 °C por 5 minutos, seguidos de mais 1 minuto e 30 segundos a 94 °C, para a desnaturação da fita molde de DNA, 48 °C por 1 minuto e 20 segundos para o pareamento dos *primers* e 72 °C por 40 segundos para a extensão dos

nucleotídeos, por meio da enzima *Taq* DNA polimerase, seguidos de mais 5 minutos a 72 °C. Temperatura final de 8 °C. Também foi testada PCR com gradiente de temperatura para o anelamento dos *primers* (46 °C, 48 °C, 49 °C e 50 °C) por 1 minuto e 20 segundos. Todas as amplificações ocorreram com 38 ciclos.

A amplificação dos produtos da PCR foi corada com GelRed e verificada em gel de agarose a 1,5 %. A purificação do material seguiu o protocolo de Purificação com Enzimas – FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific, USA) e EXO I (Exonuclease I, Thermo Scientific, USA), onde 10 µl do aDNA amplificado foi adicionado a 2 µl da enzima FastAP e 1 µl da EXO I e foram submetidos ao termociclador em um ciclo de temperatura de 37 °C por 15 minutos, seguidos por mais 15 minutos a 85 °C. As amostras purificadas foram enviadas para a *Advancing through Genomics* MACROGEN na Coréia do Sul para serem sequenciadas.

### 2.3.2 Nested-PCR

A amplificação da região D-loop do mtDNA também ocorreu através da técnica de Nested-PCR. Tal alternativa metodológica foi utilizada com a finalidade de melhorar a sensibilidade e eficácia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pois o alto nível de degradação das amostras afetou as amplificações de fragmentos maiores, como a combinação dos *primers* DLP5 e DLP10 (Baker *et al.*,1993) (Tabela 1). O Nested-PCR foi realizado através de duas etapas de amplificação, sendo que na primeira etapa foram utilizados 2 *primers* homólogos com uma região de aproximadamente 300 pb da sequência de DNA alvo (Tabela 1). Essa primeira amplificação gerou amplicons que serviram como molde para a segunda PCR, que por sua vez utilizou 4 *primers* internos, amplificando aproximadamente 90 e 110 pb.

Para a primeira amplificação do fragmento de DNA foram adicionados 12,5µl de PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 2 µl de *primer* senso, 2 µl de *primer* anti-senso (concentração de 10 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,6 µl de betaína (5 M), 13,4 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA. Os *primers* utilizados foram: DlpF177 e DlpR473, como senso e anti-senso respectivamente. Os reagentes foram levados ao termociclador e submetidos ao seguinte ciclo de temperatura: 95 °C por 5 minutos, seguidos de mais 1 minuto e 30 segundos a 94 °C, 48 °C por 1 minuto e 20 segundos, 72 °C por 40 segundos seguidos de mais 5 minutos a 72 °C e temperatura final de 8 °C.

O volume total da PCR foi de 40 µl. O material amplificado foi corado com GelRed e visualizado em gel de agarose 1,5%. As amostras que apresentaram sinais de DNA foram separadas e utilizadas para a segunda amplificação do Nested-PCR, já as amostras que não apareceram no gel foram descartadas.

A segunda PCR ocorreu com adição de 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 2 µl dos *primers* DlpF360 e DlpR473, 2 µl dos *primers* DlpF337 e DlpR427, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,6 µl de betaína (5 M), 7,4 µl de água ultrapura e 10 µl de produto da primeira PCR. O volume total da amplificação foi de 40 µl e gerou amplicons de aproximadamente 90 e 110 pb. A amplificação deste produto ocorreu nas mesmas condições de programa no termociclador que a primeira PCR.

## 2.4 PRODUÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

Para a produção de células competentes foram plaqueados 75 µl de *Escherichia coli*, linhagem Top 10, em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB sólido. Essa placa ficou em uma estufa a 37 °C *overnight*, para o crescimento das colônias. Com um palito estéril, uma colônia isolada foi coletada e adicionada em um tubo de ensaio contendo 2 ml de LB líquido, esse cultivo foi deixado no agitador (shaker) a 37 °C, 150 rpm *overnight*. Após esse período, foi adicionado 1 ml de cultivo que estava no “shaker” e 100 ml de LB líquido em um Erlenmyer de 500 ml. Esse cultivo voltou para o agitador até a densidade óptica (OD) chegar a 0,25.

Quando o OD chegou a ~0,25, a cultura ficou no gelo por 15 minutos, seguida de uma centrifugação de 10 minutos a 4000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspendidas em 40 ml de 0,1 M de CaCl<sub>2</sub> no gelo, e aí permaneceram por 30 minutos. As células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi resuspendido em 6 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> com 15% glicerol. Foram pipetados 200 µl dessa solução e colocados em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, devidamente identificados como Top 10. As células competentes foram armazenadas em nitrogênio líquido.

## 2.5 CLONAGEM

Após a produção das células competentes, palitos, tubos de ensaio e glicerol foram devidamente esterilizados e meios de cultura foram preparados. Foi preparado 100 ml de meio SOC, utilizando 2 g de triptona; 0,50 g de extrato de levedura; 0,20 ml de NaCl a 1 M; 0,25 ml de KCl a 1M; 1 ml de MgCl<sub>2</sub> a 1 M; 1 ml de MgSO<sub>4</sub> a 1 M, para completar 100 ml foi adicionado água ultrapura. Esse material foi autoclavado e posteriormente, foram adicionados 2 ml de glicose a 1 M.

Para reação de clonagem foi utilizado 1 ml de meio S.O.C. Os meios de cultura LB (Luria Bertani) sólido e LB líquido também foram preparados antes da clonagem. Para fazer 100 ml de meio LB sólido foi adicionada 1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl, 1,5 g de ágar e 96 ml de água destilada ou deionizada. Este material foi esterilizado por 20 minutos a 121 °C, após isso, o meio foi distribuído em placas de Petri, cerca de 20 ml por placa. O meio ficou 15 minutos em capela de exaustão, com a finalidade de esfriar e polimerizar. Depois de prontas, um mix contendo 8 µl de IPTG (solução a 8 µg/ml), 35 µl de X-Gal (solução a 35 µg/ml) e 30 µl de ampicilina (solução a 75 µg/ml) foi aplicado nas placas e espalhado com alça de Drigalsky. Para o preparo de 100 ml de meio LB líquido foi utilizada 1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl, 97,5 ml de água destilada e 200 µl de ampicilina a 50 mg/ml.

Após a preparação dos meios de cultura, foi necessário adicionar uma cauda poli-A no produto de amplificação obtido pela técnica de Nested- PCR. A cauda poli-A é fundamental para a inserção do fragmento no vetor plasmidial, e para isso, foram adicionados 2 µl de dATP (1 mM), 1µl de tampão 10x, 1µl de taq 5U (Ludwing), 0,3 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,7 µl água ultrapura e 4 µl de produto de Nested-PCR, totalizando uma reação de 10 µl. A reação ficou 20 minutos a 72 °C no termociclador. A ligação do fragmento de DNA com o vetor de clonagem ocorreu com a adição de 5 µl de Buffer 2x, 1 µl de vetor pGem-T Easy (Promega, Madison, USA), 1 µl de enzima T4 DNA ligase e 3 µl de produto de Nested-PCR com cauda poli-A. Este material foi incubado no termociclador por 1 hora a 22 °C e *overnight* a 4 °C.

A transformação das bactérias foi realizada com choque térmico. As células competentes de *E. coli* (linhagem Top 10) foram retiradas do nitrogênio líquido com uma pinça e colocadas em uma caixa de isopor com gelo. Em um microtubo de 1,5 ml foram adicionados 10 µl de reação de ligação (vetor com fragmento de DNA) e 50 µl de células competentes. Esse procedimento foi realizado dentro da caixa de isopor com gelo e a mistura dos reagentes foi feita com cuidado, pois as células são sensíveis a



estresse mecânico. A mistura (célula e ligação) permaneceu 20 minutos no gelo, seguido por 45 segundos a 42 °C e voltou para o gelo por mais dois minutos.

Para a recuperação das células, 1 ml de meio SOC foi adicionado à mistura, transferido para um tubo de ensaio e incubado por 1 h 30 min em agitador (shaker) a 37 °C e 150 rpm. Após esse tempo, 100 µl do cultivo em meio SOC foram aplicados na placa de Petri contendo o LB sólido com ampicilina, X-Gal e IPTG e espalhados com alça de Drigalsky. O restante do cultivo foi centrifugado a 10.000 rpm por dois minutos e em seguida 50 µl do sobrenadante com sedimento foram aplicados a uma nova placa de Petri. As placas foram colocadas em uma estufa a 37 °C por 16 horas.

Com o crescimento das colônias, as placas foram armazenadas a 4 °C por 3 horas, pois isso facilita a identificação das colônias brancas (clones) das colônias azuis (células que não transformaram de forma correta). As colônias brancas selecionadas (2 clones de cada amostra) foram coletadas com a utilização de palitos esterilizados e transferidas para um microtubo de 0,5 ml contendo 10 µl de água estéril. Para estocagem deste material e uso posterior, os palitos utilizados nas coletas foram transferidos para tubos de ensaios contendo 1 ml de LB líquido com ampicilina e incubados no agitador a 37 °C por 24 horas.

Para verificar o sucesso da clonagem foi realizado um PCR para amplificar o fragmento clonado. Os *primers* utilizados na técnica foram os *primers* do vetor, T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3' e SP6: 5'-ATTTAGGTGACACTATAG- 3' (Promega, Madison, USA). A reação para a PCR foi de 25 µl, sendo 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 1 µl dos *primers* T7 e SP6 (a 10 µM) (Promega, Madison, USA) 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 7,5 µl de água ultrapura e 2 µl da colônia diluída em água estéril. O programa no termociclador foi de 35 ciclos, onde a desnaturação do DNA ocorreu a 94 °C por cinco minutos, seguido por mais um minuto a 94 °C. O anelamento dos *primers* ocorreu a 50°C por 40 segundos e a extensão 1 minuto e 30 segundos a 72 °C, seguido por mais um ciclo de 5 minutos na mesma condição.

A amplificação dos produtos da PCR foi verificada em gel de agarose 1,5% e a purificação seguiu o protocolo de Purificação com Enzimas – FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific, USA) e EXO (Exonuclease I, Thermo Scientific, USA). Os clones amplificados foram enviados para o *Advancing through Genomics* MACROGEN na Coréia do Sul para o sequenciamento.

Os eletroferogramas das sequências foram analisados com o auxílio do programa Chromas Lite v.2.4 (Technelysium, 2012). As sequências foram alinhadas automaticamente no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) e posteriormente corrigidas e editadas uma a uma manualmente, com o auxílio do programa BioEdit v.7.1.3 (Hall, 1999).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os melhores resultados obtidos foram quando da amplificação por Nested-PCR e o método de extração utilizado foi o que continha o Dextran Blue (Tabela 3). Foram realizados 20 Nested-PCRs, sendo que 9 destes (45%) apresentaram amplificações. Além disso, foram realizados 25 PCRs convencionais, com o mesmo método de extração, porém não apresentaram nenhuma banda íntegra, somente arraste de aDNA.

O método de extração de aDNA com acetato de sódio não apresentou resultados na amplificação pela PCR e nem pela Nested-PCR. No total foram realizados 10 PCRs convencionais e 13 Nested-PCR, destes 1 Nested-PCR apresentou 2 bandas inespecíficas, que foram descartadas após sequenciamento por não serem o DNA de interesse. Com método de extração fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001), foram realizados 5 PCRs e 3 Nested-PCR, destes ocorreu apenas uma amplificação que foi por meio da técnica de Nested-PCR porém seu rendimento foi insuficiente para ser sequenciado. As adaptações do método tradicional com fenol-clorofórmio realizada durante o estudo também não geraram DNA suficiente para ser amplificado, pois das 3 PCRs convencionais e 2 Nested-PCR foram obtidos somente arrastes de aDNA.

Os resultados da extração com o kit *Qiagen DNA Investigator [QIAGEN®]* sugerem que esta técnica também não foi suficiente para extrair aDNA de ossos de *E. australis*. Durante o estudo, utilizando este método de extração, foram realizados 23 PCRs convencionais e 4 Nested-PCR e, em ambos os casos, nenhuma amplificação de material genético foi conseguida. Os resultados revelaram um fraco arraste de aDNA e nenhuma banda específica ou íntegra, independente dos *primers* utilizados (Figura 3A). Muitos autores recomendam a utilização de kits de extração, por serem eficazes na remoção de inibidores de PCR e pela segurança durante o manuseio dos reagentes (Davoren *et al.*, 2007; Amory *et al.*, 2012). Contudo, neste caso a utilização de kit não foi exitosa, possivelmente devido ao nível de degradação das amostras.

Com os métodos de extração com acetato de sódio e fenol-clorofórmio foi possível recuperar aDNA. Porém, a visualização em gel agarose 1,5% revelou poucas bandas com material genético íntegro (Figura 3B) e na maioria das vezes, o aDNA era apresentado por um forte arraste no gel, revelando assim a sua fragmentação. Segundo Cattaneo (1997) o método de extração com acetato de sódio e isopropanol é mais eficaz que os outros métodos e quando comparado com o protocolo de fenol-clorofórmio, apresenta um aumento de três vezes na quantidade de DNA extraído. Por outro lado, a extração com acetato de sódio, é uma técnica que não requer muitas lavagens e homogeneizações, ela apenas solubiliza as impurezas. Em nossas análises, mesmo com a descalcificação prévia, quando as amostras eram submetidas à extração com acetato de sódio, o “pellet” apresentava coloração marrom. Como consequência, os extratos existentes junto com o material genético afetaram tanto na amplificação, provavelmente inibindo a PCR, quanto na técnica de eletroforese, pois as impurezas provocaram um aumento no peso molecular do aDNA, afetando a sua migração no gel de agarose (Figura 3C).

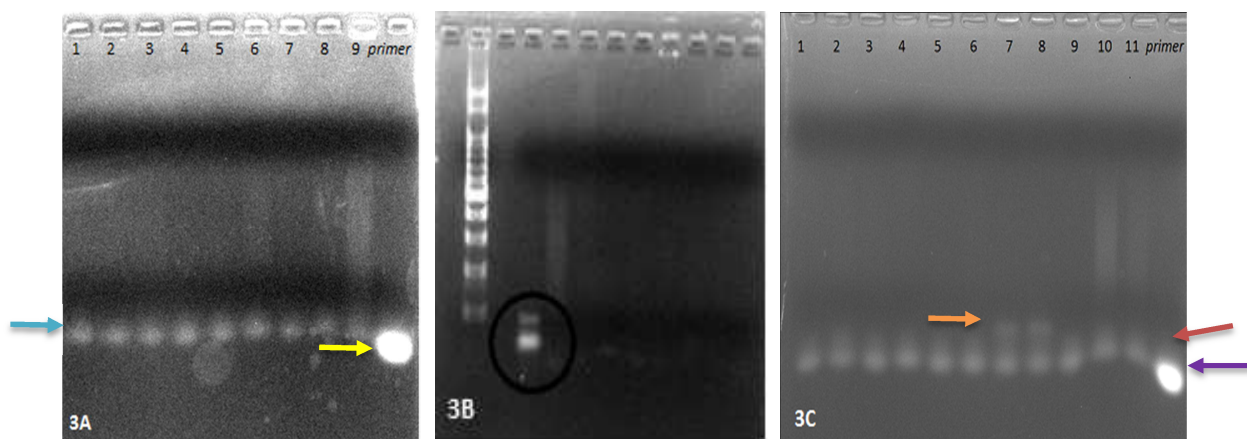


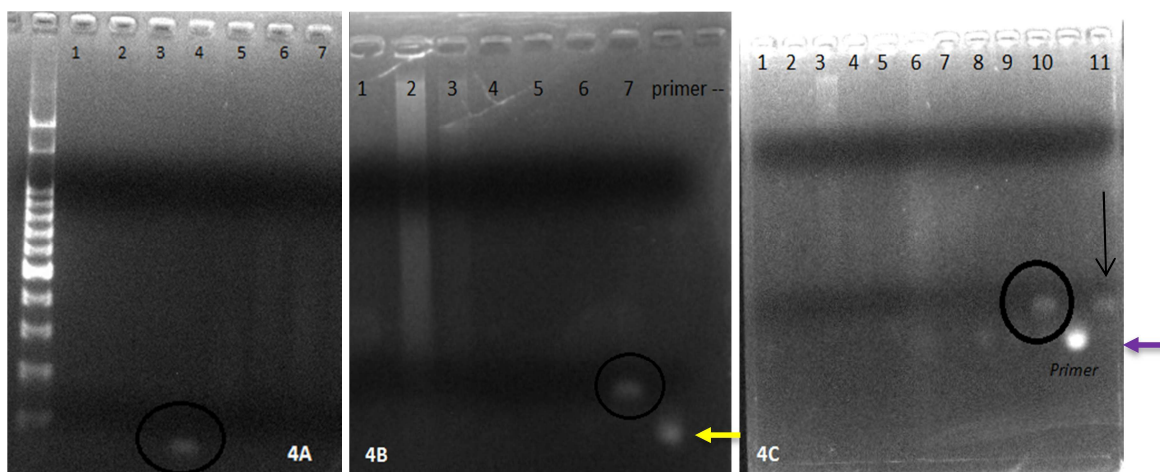
Figura 3A. Eletroforese em gel de agarose para a amplificação de aDNA obtido da extração com o kit *Qiagen DNA Investigator [QIAGEN]* (1-9). Nota-se alguns arrastes fracos de aDNA amplificado; *primers* não utilizados durante a PCR (seta verde) e nenhuma banda íntegra de material genético. *Primer*: foi utilizado como marcador de tamanho em pares de base (20-27 pb) (seta amarela). Figura 3B. Eletroforese em gel de agarose para amplificação com aDNA extraído com fenol-clorofórmio. Nota-se uma banda de aDNA íntegra, acima uma inespecífica (círculo) e arraste de aDNA. Figura 3C. Eletroforese em gel de agarose para amplificação de aDNA obtido pelo protocolo com acetato de sódio (1-11). Nota-se *primers* não utilizados, bandas fracas inespecíficas (seta laranja) e a migração não simétrica dos *primers* (seta vermelha), devido as impurezas no aDNA. *Primer*: foi utilizado como marcador de tamanho em pares de base (20-27 pb) (seta roxa).

Mesmo com a utilização de diversos pares de *primers*, mix de PCR, reagentes e enzimas otimizadoras, a amplificação pela PCR convencional não gerou cópias suficientes de moldes (*template*) para um bom sequenciamento. Frente a este baixo

rendimento, utilizou-se a Nested-PCR que foi mais eficaz e aumentou a quantidade do produto final amplificado. Segundo Schaefer (2006), a dupla amplificação que ocorre no Nested-PCR torna a técnica mais sensível, reduzindo ou eliminando produtos indesejados e inespecíficos. Os melhores ativadores da PCR e Nested-PCR utilizados para amplificação de aDNA foram a betaína e  $MgCl_2$ , enquanto o DMSO e BSA não apontaram diferenças no gel de agarose, nem a enzima PWO polimerase.

Com o método de extração de aDNA com Dextran Blue e a técnica de Nested-PCR, foi possível à amplificação de fragmentos 110 e 90 pb da região D-loop do mtDNA de 11 amostras (14,6%) de ossos de *E. australis*, das 75 amostras testadas. A Dextrana Blue (comercializado como Dextran Blue) é uma molécula com peso molecular de 2000 daltons que facilmente se precipita em meios líquidos (Staat *et al.*, 1973; Kalmár *et al.*, 2000) e é extraída dos micro-organismos *Leuconostoc mesenteroides* e *Streptococcus mutans*. Durante a extração de DNA com este método, o acetato de amônio que possui carga positiva, neutraliza a carga negativa do DNA, enquanto o Dextran Blue se liga ao DNA fragmentado, deixando-o mais concentrado, facilitando sua precipitação. A extração de aDNA com a utilização do método Dextran Blue, mostrou ser a maneira mais rápida e eficaz de obter material genético em amostras degradadas. Resultado similar ao apontado por Kalmár *et al.* (2000) quando trabalhou com aDNA de ossos humanos de 700-1200 anos atrás.

Mesmo com esta metodologia, as bandas apresentadas no gel de agarose revelaram baixa quantidade de aDNA (Figuras 4A, 4B e 4C), porém íntegras e menos arrastes, o que possibilitou a clonagem dos mesmos.



Eletroforese em gel de agarose para amplificação de aDNA extraído com a utilização de Dextran Blue. Figura 4A. (1-7) Nota-se uma banda com de tamanho em pares de bases menor que 100-pb (4) (círculo) e arrastes fracos de aDNA. Figura 4B. (1-7). Nota-se uma banda de aDNA fraca (círculo) (7), mas suficiente para a técnica de clonagem e arraste de material genético (2-3). *Primer*: foi utilizado como

marcador de tamanho em pares de base (20-27 pb) (seta amarela). Figura 4C. (1-11). Pode-se observar duas bandas fracas de aDNA (10-11) (círculo e seta), também suficientes para a clonagem. *Primer*: foi utilizado como marcador de tamanho em pares de base (20-27 pb) (seta roxa).

Com base na clonagem de diversos fragmentos de DNA sobrepostos, conseguimos sequenciar pequenos fragmentos de aDNA de ossos de *E. australis* (Tabela 4) e começar a montar as sequências referentes a região D-Loop de 11 amostras (Figura 5).

Tabela 3. PCRs convencionais e Nested-PCR, para amplificação do aDNA.

<b>Método de extração</b>	<b>PCR</b>	<b>Amplificações</b>	<b>Nested-PCR</b>	<b>Amplificações</b>	<b>Sequenciamentos</b>
Dextran Blue	25	0	20	9	11 amostras
Acetato de Sódio	10	0	13	1	0
Fenol-clorofórmio	5	0	3	1	0
Fenol-clorofórmio adaptado	3	0	2	0	0
Kit [QIAGEN®]	23	0	4	0	0

Tabela 4. Fragmentos de aDNA de ossos de *E. australis* recuperados durante a técnica de clonagem.

<b>Código da amostra</b>	<b>Nº de fragmentos sequenciados</b>	<b>Pares de bases recuperados</b>
CMA 23	2	18 e 21 pb
CMA 46	1	59 pb
EAARG 34	1	42 pb
EAARG 35	2	20 e 19 pb
EAARG 40	2	21 e 22 pb
EAARG 43	3	19, 21 e 21 pb
EAARG 45	2	7 e 9 pb
EAARG 47	2	18 e 25 pb
SCBR 15	2	22 e 21 pb
SCBR 17	1	18 pb
SCBR 18	2	19 e 19 pb



Finalmente, ressaltamos que a amplificação de pequenos fragmentos, característica geral de aDNA, devem estar associados a técnica de clonagem. Somente assim foi possível reconstruir uma sequência de aDNA mais longa sem que haja dúvida da autenticidade dos resultados obtidos.

## ANEXOS:

**Anexo 1.** Lista de *primers* desenhados no presente estudo para região D-loop do mtDNA da espécie *Eubalaena australis*:

- 1- DLPF22- 5'-CCACCATCAGCACCCAAAGC-3'
- 2- DLPR186- 5'-AGGACCAGTATTGGCCATGT-3'
- 3- DLPF169-5' ATGGCCAATACTGGTCCTGA-3'
- 4- DLPR371-5'-GATCTAATGGAGGCGGCCATA-3'
- 5- DLPF177- 5'-TTTCACTACGGGAAGTTAAAGCTCG-3'
- 6- DLPR473- 5'-GAACGAATGGGCGATTCTAA-3'
- 7- DLPF360- 5'-GATCCCTCTTCTCGCACC-3'
- 8- DLPF337-5'-GGGATCCCTCTTCTCGCACC-3
- 9- DLPR427-5'- ATGGCCCTGAAGTAAGAACCAG-3'
- 10-DLPF164- 5'-CGGGAAGTTAAAGCTCGTAT-3'
- 11-DLPR289-5'-ATCTAATGGAGGCGGCCATA-3

**Anexo 2.** Lista dos diversos mix de reagentes utilizados para amplificação do aDNA pela PCR.

- 1- **Mix PCR:** Para a realização da PCR foram adicionados 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2,5 µl de *primer* DLP5, 2,5 µl de DLP10, 6,5 µl de água ultrapura e 1 µl de DNA. Volume final de 25 µl.
- 2- **Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2,5 µl de *primer* DLP5, 2,5 µl de *primer* DLP10, 2,5 µl de água ultrapura e 5 µl de DNA. Volume final de 25 µl.

- 3- **Mix PCR:** Para realização da PCR 24 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl de *primer* DLP5, 2,5 µl de *primer* DLP10, 9 µl de água ultrapura e 9 µl de DNA. Volume final de 50 µl.
- 4- **Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2,5 µl de *primer* DLP5, 2,5 µl de *primer* DLP10, 1,5µl de água ultrapura e 6 µl de DNA. Volume final de 25 µl.
- 5- **Mix PCR:** 24 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2,5 µl de *primer* DLP5 e DLP10, 2 µl de água ultrapura, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> e 10 µl de DNA. Volume total 50 µl.
- 6- **Mix PCR:** 13 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF22, 2 µl de *primer* DLPR186, 2 µl de água ultrapura e 6µl de DNA. Volume de 25µl.
- 7- **Mix PCR:** 13 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF169, 2 µl de *primer* DLPR371, 2 µl de água ultrapura e 6 µl de DNA. Volume final de 25 µl.
- 8- **Mix PCR:** 2 µl de *Primer* DLPF22, 2 µl de *primer* DLPR186, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTP, 0,25 µl de *Taq* DNA Polymerase , 2,5 µl de Buffer 10x., 9,75 µl de água ultrapura e 6 µl de DNA. Volume final de 25 µl.
- 9- **Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF169, 2 µl de *primer* DLPR371, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl de água ultrapura e 4 µl de DNA. Volume final de 25 µl.
- 10- **Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF22, 2 µl de *primer* DLPR186, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> e 8 µl de DNA. Volume total de 25 µl.
- 11- **Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs),



2 µl de *primers* DLPF177 e DlpR473, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µl de betaina, 13,4 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA. Volume final de 40 µl.

**12-Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primers* DLPF360 e DlpR473, 2 µl de *primers* DlpF337 e DlpR427, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µl de betaina, 7,4 µl de água ultrapura e 10 µl de produto de PCR. Volume final de 40 µl.

**13- Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 1 µl de *primer* DLPF169, 1 µl de *primer* DLPR371, 1 µl de BSA (albumina de soro bovino), 1 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA. Volume final de 25µl.

**14-Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 1 µl de *primer* DLPF169, 1 µl de *primer* DLPR371, 1 µl de DMSO (dimetil sulfóxido), 1 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA. Volume final de 25 µl.

**15- Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF337, 2 µl de *primer* DLPR427, 0,5 µl de betaina e 8 µl de DNA. Volume final de 25 µl.

**16-Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 1,5 µl de *primer* DLPF337, 1,5 µl de *primer* DLPR427, 0,5 µl de betaína, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> e 8 µl de DNA. Volume final de 25 µl.

**17- Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF337, 2 µl de *primer* DLPR427, 2 µl de *primer* DLPF164, 2 µl de *primer* DLPR289, 0,4 µl de betaina, 2,2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 12,9 de água ultrapura e 4 µl de DNA. Volume final de 40 µl.

**18- Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 1 µl de *primer* DLPF337, 1µl de *primer* DLPR427, 1µl de *primer* DLPF164, 1µl de *primer* DLPR289, 0,6 µl de betaina, 2,2µl de MgCl<sub>2</sub>, 13,7µl de água ultrapura e 7 µl de DNA. Volume final de 40 µl.

- 19- Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* s DLPF337, 2 µl de *primer* DLPR427, 5 µl de Buffer, 0,2 µl enzima otimizadora PWO DNA polymerase, 24,3 µl de água ultrapura e 4 µl de DNA. Volume final de 50 µl.
- 20- Mix PCR:** 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primer* DLPF337, 2 µl de *primer* DLPR427, 2 µl de *primer* DLPF164, 2 µl de *primer* DLPR289, 5 µl de Buffer, 0,2 µl enzima otimizadora PWO, 16,3 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA. Volume final de 50 µl.

**Análise da diversidade genética da baleia-franca-austral, *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822) (Mysticeti, Cetartiodactyla) durante e pós caça no Atlântico Sul Ocidental.**

## **1 INTRODUÇÃO**

A baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*) foi alvo de grande exploração comercial durante os séculos XVII a XX no Hemisfério Sul (IWC, 2001). Sua população, que foi estimada entre 55.000 e 70.000 indivíduos no período pré-caça (IWC 2001), foi drasticamente reduzida nestes 400 anos de exploração e segundo Tormosov *et al.* (1998) no ano de 1920 a população era composta por apenas 300 indivíduos. Estima-se que durante este período foram capturadas aproximadamente 48.000 baleias-franca no Oceano Atlântico, 37.200 no Oceano Pacífico e 12.500 no Oceano Índico (Dawbin 1986; Du Pasquier 1986; Best 1987).

Avaliações recentes, feitas através de modelos de dinâmica populacional e reconstrução histórica, indicam que a população mundial de *E. australis* é de aproximadamente 12.000 indivíduos (IWC, 2012). Apesar de apresentar sinais de recuperação, segundo Frankham *et al.* (2008) quando uma espécie sofre um declínio drástico no número populacional, decorrente de fatores estocásticos ou da atividade da caça, pode gerar altos níveis de endogamia, baixa capacidade reprodutiva e perda de variabilidade genética, comprometendo seu potencial adaptativo (Allendorf & Luikart, 2007; Frankham *et al.*, 2008). Em adição, dados moleculares sugerem que a espécie sofreu um grande declínio populacional durante o final do Pleistoceno e início do Holoceno, (22 e 6 mil anos atrás) (Oliveira *et al.*, 2011). Portanto, além da redução numérica registrada durante cerca de 400 anos de captura, *E. australis* preteritamente teve seu tamanho efetivo afetado.

Para compreender melhor a variabilidade genética existente nas populações, muitos estudos têm utilizado a região D-Loop ou controladora do DNA mitocondrial (mtDNA) para analisar DNA antigo (aDNA) de uma espécie. Desta forma, amostras mineralizadas como ossos e tecidos estão fornecendo informações essenciais para a

reconstrução histórica de uma população (Foote *et al.*, 2012). A análise do aDNA permite uma comparação de dados atuais com antigos, sendo possível compreender diversos parâmetros populacionais como a perda de variabilidade genética, fluxo gênico, tamanho efetivo da população e divergência populacional (Hoelzel, 1994; Roman & Palumbi, 2003).

Apesar da variabilidade genética da população de baleia-franca-austral já ser conhecida e investigada nos quatro “stocks” reprodutivos da espécie no Hemisfério Sul: costa da África do Sul, Austrália, regiões subantárticas da Nova Zelândia e América do Sul: Argentina e Brasil (Baker *et al.*, 1999; Malik *et al.*, 2000; Patenaude *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2011; Ott *et al.*, 2011), não há informações sobre a variabilidade genética da espécie durante o período de caça no Atlântico Sul Ocidental. Neste contexto, este estudo teve como objetivo: I. caracterizar geneticamente segmentos da região D-loop a partir de ossos de espécimes de *E. australis* coletados na Península Valdés na Argentina e em Santa Catarina no Brasil e, II. comparar as sequências nucleotídicas dessa região mitocondrial recuperadas nas amostras de aDNA com as populações atuais descritas por Valenzuela *et al.*, (2009) e Carroll *et al.*, (2011).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de ossos de *Eubalaena australis* (n=75) foram previamente coletadas pelo Dr. Enrique Alberto Crespo do *Laboratorio de Mamíferos Marinos* (LAMAMA) do *Centro Nacional Patagónico* (CENPAT), pela Dra. Larissa Rosa de Oliveira do Laboratório de Ecologia de Mamíferos (LEM) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) e pelo Dr. Paulo A. C. Flores do Centro Mamíferos Aquáticos do Instituto Chico Mendes de Santa Catarina (CMA-ICMBio), nas duas principais áreas de reprodução da espécie no Oceano Atlântico Sul Ocidental: Península Valdés (42°30'S; 64°30'W), Argentina (n=35) e Santa Catarina, Brasil (n=40) (entre 29°30'S; 49°41'W e 25°56'S; 48°28'W) (Anexo 1). Na Península Valdés não houve registros de atividade de caça a baleia-franca, portanto as amostras foram coletadas a partir de encalhes na região entre as décadas de 1960 e 1970. Já em Santa Catarina, as amostras foram coletadas em sítios de caça existentes em diversas cidades do Estado, como Florianópolis, Garopaba, Imbituba e Governador Celso Ramos.

A extração do aDNA ocorreu com a utilização do regente Dextran Blue e o protocolo foi baseado no método descrito por Kalmár *et al.* (2000). Foram triturados

360 mg de pó de osso de baleia-franca-austral e adicionadas em um microtubo de 1,5 ml, contendo 1 ml de tampão de lise (0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,5% Sarcosina-Na) e 25 µl de proteinase K (20 mg/ml). As amostras foram incubadas a 37 °C entre 48 a 72 horas. Após o período de lise celular, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm. Em um novo tubo de 1,5 ml, foram adicionados 350 µl do sobrenadante da solução, 3,5 µl de Dextran Blue (1 µg/ µl), 700 µl de etanol absoluto gelado (100%) e 350 µl de acetato de amônio 4 M. Para a precipitação do aDNA, o tubo permaneceu a -20 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi submetido a banho seco por 20 minutos a 70 °C, para eliminar os resíduos do álcool. O aDNA foi suspenso em 20 µl de água ultrapura e armazenado a -4 °C.

A amplificação da região D-loop do mtDNA ocorreu através da técnica de Nested-PCR. Os *primers* específicos utilizados foram criados a partir de sequências nucleotídicas da referida região de espécimes de *Eubalaena australis* depositadas no GenBank e utilizando-se os programas Primer3 e Mega 5.1 (Tabela 1).

O Nested-PCR foi realizado em duas etapas de amplificação. A primeira PCR ocorreu com um volume final de 40 µl, destes, 12,5 µl de PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 de cada dNTPs), 2 µl de *primers* DLPF177 e DLPR473 (ambos na concentração 10 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,6 µl de betaína (5 M), 13,4 µl de água ultrapura e 8 µl de DNA. Após a mistura, os reagentes foram levados ao termociclador e submetidos ao seguinte ciclo de temperatura: 95 °C por 5 minutos, seguidos de mais 1 minuto e 30 segundos a 94 °C, 48 °C por 1 minuto e 20 segundos, 72 °C por 40 segundos, seguidos de mais 5 minutos a 72 °C e finalizando com 8 °C. Os amplicons gerados de aproximadamente 300 pb serviram como molde para a próxima PCR.

A segunda amplificação do aDNA ocorreu com um mix contendo 12,5 µl de PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 2 µl dos *primers* DlpF360 e DlpR473, 2 µl dos *primers* DlpF337 e DlpR427 (ambos os *primers* na concentração de 10 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,6 µl de betaína (5 M), 7,4 µl de água ultrapura e 10 µl de produto da primeira amplificação. A solução foi levada ao termociclador com o mesmo programa de temperatura que a primeira PCR. O aDNA amplificado (aproximadamente 90 e 100-pb) foi corado com GelRed e visualizado em um transiluminador UV com gel de agarose a 1,5%.

Tabela 1. Pares de *primers* gerados neste estudo e utilizados na técnica de Nested-PCR.

<i>Primer senso</i>	<i>Primer anti-senso</i>	Tamanho da amplificação
DLPF177- 5'-TTTCACTACGGGAAGTTAAAGCTCG-3'	DLPR473-5'-GAACGAATGGGCGATTCTAA-3'	296 PB
DLPF360- 5'-GATCCCTCTTCTCGCACC-3'	DLPR473-5'-GAACGAATGGGCGATTCTAA-3'	115 PB
DLPF337-5'-GGGATCCCTCTTCTCGCACC-3'	DLPR427-5'-ATGGCCCTGAAGTAAGAACCAG-3'	91 PB

O material genético amplificado foi submetido à técnica de clonagem. Para inserção da cauda poli-A no amplicon foi utilizado um mix contendo 2 µl de dATP (1mM), 1 µl de tampão 10x, 1 µl de *Taq* polimerase 5U (Ludwing), 0,3 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,7 µl água ultrapura e 4 µl de produto de Nested-PCR, totalizando uma reação de 10 µl. A reação ficou 20 minutos a 72 °C no termociclador. A ligação do fragmento de DNA com o vetor de clonagem ocorreu com a adição de 5 µl de Buffer 2x, 1 µl de vetor pGem-T Easy (Promega, Madison, USA), 1 µl de enzima T4 DNA ligase e 3 µl de produto de Nested-PCR (com cauda poli-A). A solução ficou incubada no termociclador por 1 hora a 22 °C e overnight a 4 °C.

A transformação das bactérias foi realizada com choque térmico, após a mistura de 10 µl da ligação (aDNA e vetor plasmidial) e 50 µl de células competentes *Escherichia coli*, linhagem Top 10. Para a recuperação das células, 1 ml de meio SOC foi adicionado à mistura e incubado por 1 h 30 min em uma incubadora com “shaker” a 37 °C e 150 rpm. Em seguida, 100 µl do cultivo em meio SOC foram aplicados em placa de Petri contendo o LB sólido e um mix de 8 µl de IPTG (200 mg/ml), 35 µl de X-Gal (20 mg/ml) e 30 µl de ampicilina (50 mg/ml). Com o crescimento das colônias, clones foram selecionados para a amplificação pela PCR com os *primers* do vetor (T7- 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3' e SP6- 5'-ATTTAGGTGACACTATAG- 3').

As reações da PCR ocorreram com adição de 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Fermentas, Lithuania) (0,05 U/ µl *Taq* DNA polimerase, 10x buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de cada dNTPs), 1 µl de *primer* T7, 1 µl de *primer* SP6 (a 10 µM) (Promega, Madison, USA) 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 7,5 µl de água ultrapura e 2 µl da colônia diluída em água estéril. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 50 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, seguido por mais um ciclo de 5 minutos nas mesmas condições.

A amplificação dos produtos da PCR foi verificada em gel de agarose 1,5% e a purificação seguiu o protocolo com Enzimas – FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific, USA) e EXO (Exonuclease I, Thermo Scientific,

USA). Os clones amplificados foram enviados para o *Advancing through Genomics* MACROGEN na Coréia do Sul para o sequenciamento.

Os eletroferogramas das sequências foram analisados com o auxílio do programa Chromas Lite v.2.4 (Technelysium, 2012). As sequências das leituras de cada clonagem foram cortadas das sequências do vetor, bem como, as sequências de baixa qualidade utilizando-se os programas preGap4 (versão 1.6) e Trev (versão 1.9) e, em seguida montadas (*sequence assembly*) usando o programa GAP4 (versão 4.11.2), do pacote de Staden (<http://staden.sourceforge.net/>) (Staden *et al.*, 2000). Após as montagens, as sequências dos aDNA foram alinhadas no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997), juntamente com um conjunto de sequências da região D-Loop do mtDNA de *Eubalaena australis* depositadas no GenBank (Valenzuela *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2011). Para a construção da sequência consenso o referido conjunto de dados foi alinhado no MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), utilizando as premissas do *default*. Cabe salientar que os alinhamentos são cruciais, pois, caso o mesmo não seja confiável, as homologias implicitamente propostas nas relações entre as bases do conjunto de dados também não serão e, conseqüentemente, as relações entre as sequências alinhadas não representaram o real relacionamento filogenético (Phillips *et al.*, 2000). O problema ainda é maior quando o conjunto de dados é representado por sequências não codificantes e fragmentadas. A utilização das diferentes ferramentas acima destacadas, a inspeção manualmente via BioEdit v.7.1.3 (Hall, 1999), somente das sequências clonadas e processadas no pacote do Staden, foram estratégia utilizadas com intuito de maximizar a qualidade e confiabilidade dos alinhamentos.

A rede haplotípica foi gerada pelo método *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999), no Network 4.6 (Polzin & Daneshmand, 2003) a partir dos haplótipos definidos no programa DnaSP v.5 (Librado *et al.*, 2009). A matriz de dados utilizada para a definição dos haplótipos foi gerada a partir do alinhamento entre as sequências nucleotídicas recuperadas de aDNA com as depositadas no GenBank, sendo 78 de baleias-franca da Argentina (Valenzuela *et al.*, 2009) e 13 sequências que correspondem a indivíduos da Nova Zelândia e Austrália (Carroll *et al.*, 2011) (Anexo 2). Após o alinhamento, foram cortadas as regiões *upstream* e *downstream* aos alinhamentos com os fragmentos recuperados de aDNA. Noventa e seis pares de bases (96 pb) foi o tamanho do segmento correspondentes a região de alinhamento da região de D-Loop do mtDNA de *Eubalaena australis* com os aDNA resultante deste corte. As bases nucleotídicas, de

cada um dos espécimes de aDNA, que não foram recuperadas nos sequenciamentos, foram substituídas pela informação “N” de posição não definida. Tal procedimento possibilitou as inferências dos relacionamentos haplotípicos entre amostras de aDNA e de espécimes atuais. Contudo, sabe-se que o número de Ns diminui a confiabilidade das relações filogenéticas resultantes e, no caso específico, dos haplótipos obtidos (Polzin & Daneshmand, 2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Aproximadamente 20 fragmentos de aDNA da região D-Loop do mtDNA foram recuperados de 11 amostras de *E. australis* (Tabela 2) destas, 5 amostras oriundas de Santa Catarina- Brasil (CMA 23, CMA46, SCBR 15, SCBR 17 e SCBR 18) e 6 amostras oriundas da Península Valdés-Argentina (EAARG 34, EAARG 35, EAARG 40, EAARG 43, EAARG 45 e EAARG 47). Esses fragmentos variaram de tamanho de 7 a 59-pb. A Figura 1 mostra a localização dos fragmentos recuperados de aDNA que correspondem as posições 338 e 453 *upstream* da região D-Loop do mtDNA de *E. australis*. O alinhamento foi feito com 102 amostras, representando espécimes coletadas na Argentina (Valenzuela *et al.*, 2009) (n=78), Nova Zelândia/Austrália (Carroll *et al.*, 2011) (n=102) e as amostras de aDNA recuperadas neste estudo, demonstraram serem 96,7% similares. A região recuperada de aDNA é mais rica em G+C (52, 6%) quando comparada com toda a região D-Loop que apresenta percentuais acima de 60% de A+T.

Tabela 2. Fragmentos de aDNA de ossos de *E. australis* recuperados durante o estudo.

<b>Código da amostra</b>	<b>Nº de fragmentos sequenciados</b>	<b>Pares de bases recuperados</b>
CMA 23	2	18 e 21 pb
CMA 46	1	59 pb
EAARG 34	1	42 pb
EAARG 35	2	20 e 19 pb
EAARG 40	2	21 e 22 pb
EAARG 43	3	19, 21 e 21 pb
EAARG 45	2	7 e 9 pb
EAARG 47	2	18 e 25 pb
SCBR 15	2	22 e 21 pb
SCBR 17	1	18 pb
SCBR 18	2	19 e 19 pb



Ao analisar as sequências do aDNA recuperado no estudo com dados atuais de Valenzuela *et al.* (2009) e Carroll *et al.* (2011), o programa Network 4.6 (Polzin & Daneshmand, 2003), gerou uma rede contendo 19 haplótipos (Figura 2). Esta análise revelou que apenas três haplótipos dos 19 amostrados, são compartilhados entre os grupos de espécimes atuais de *E. australis* da Argentina e Nova Zelândia/ Austrália (H\_1, H\_4, H\_13).

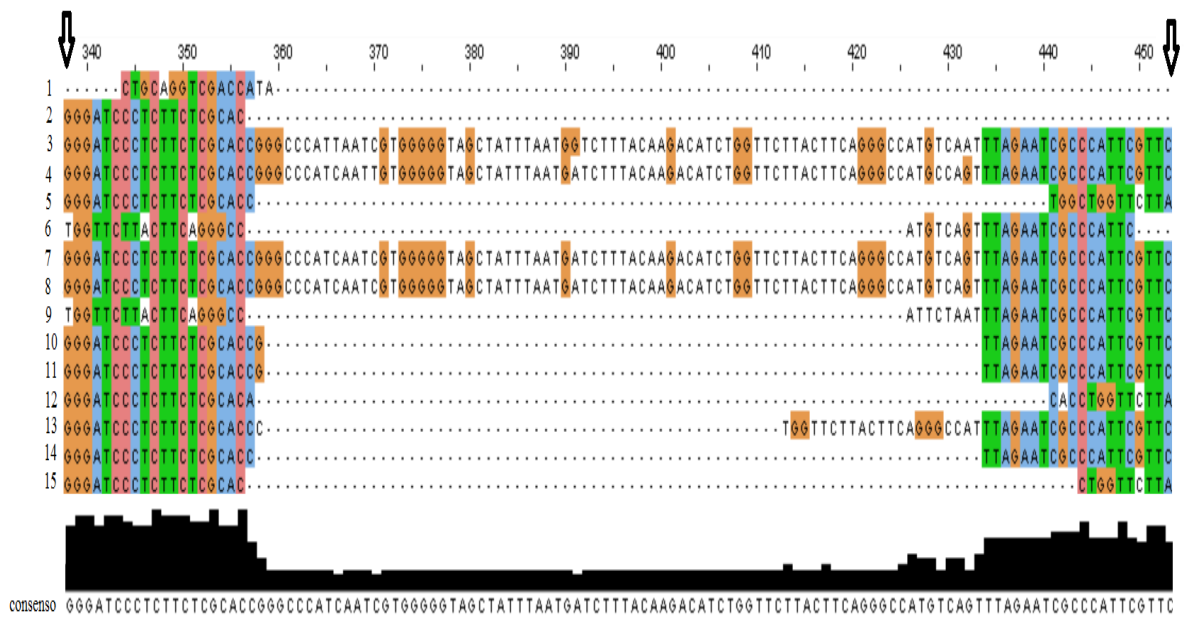


Figura 1. Alinhamento dos fragmentos de aDNA recuperados a partir de ossos de *E. australis*, da região D-Loop do mtDNA, com amostras de espécimes depositados no GenBank. O alinhamento e a sequência consenso foram obtidos com a utilização da ferramenta on line Muscle com os 102 espécimes e demonstrando somente 15. As setas sinalizam a primeira e última base recuperada nos fragmentos de aDNA, correspondente as posições 338 e 453. Os pontos são bases não recuperadas. Os números representam as amostras: (1) Península Valdés-Argentina (EAARG 45); (2) Santa Catarina- Brasil (SCBR 17); (3) \_Argentina (Genbank EU290538.1); (4) Nova Zelandia/Australia (Genbank JN097601.1); (5) Santa Catarina- Brasil (SCBR 15); (6) Península Valdés-Argentina (EAARG 34); (7) Argentina (Genbank EU290517.1); (8) Nova Zelandia/Australia (Genbank JN097602.1); (9) Santa Catarina- Brasil (CMA 46); (10) Península Valdés-Argentina (EAARG 40); (11) Península Valdés-Argentina (EAARG 35); (12) Península Valdés-Argentina (EAARG 47); (13) Península Valdés-Argentina (EAARG 43); (14) Santa Catarina- Brasil (SCBR 18); (15) Santa Catarina- Brasil (CMA 23).

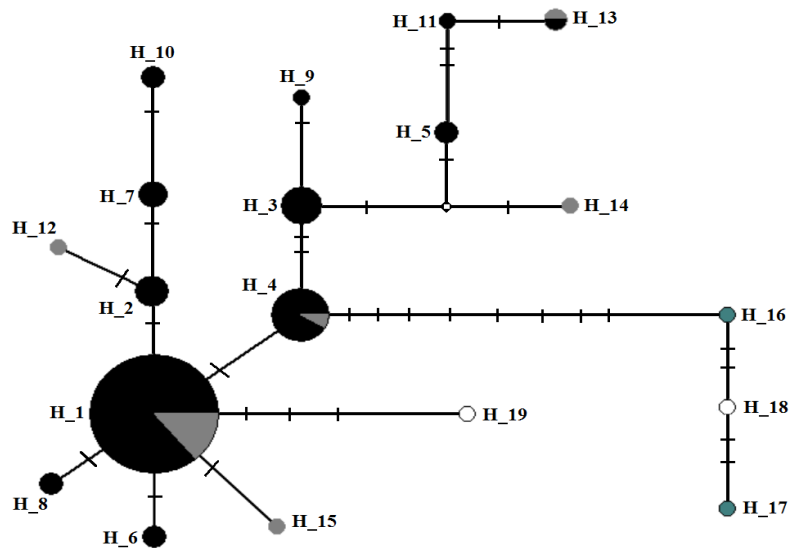


Figura 2. Rede haplotípica gerada pelo programa Network 4.6 para os 102 espécimes de *Eubalaena australis*. Os tamanhos dos círculos representam a frequência dos haplótipos. Os traços representam em passos mutacionais a distância entre um haplótipo e outro. O vetor médio está representado pelo triângulo. As cores dos haplótipos representam suas respectivas populações e datação: Preto= Amostras atuais da Argentina; Cinza= Amostras atuais da Nova Zelândia/ Austrália; Branco: aDNAs das amostras da Argentina; Verde: aDNAs das amostras de Santa Catarina.

O haplótipo H\_1 foi registrado nas amostras contemporâneas da Argentina e Nova Zelândia/Austrália e observado em um dos espécimes analisados de aDNA da Península Valdés- Argentina. Além disso, ele é o haplótipo mais frequente e os demais derivam dele na rede, o que sugere sua condição de ancestral em relação aos demais haplótipos registrados para as populações atuais, bem como, até o momento, para o aDNA. É importante salientar que as sequências recuperadas neste estudo não foram alinhadas e nem comparadas com as do estudo de Ott (2002), único trabalho realizado com a amostras de baleia-franca do Brasil até o momento, em função do tamanho e da localização do fragmento de mtDNA ser diferente deste autor.

Os resultados também revelam quatro novos haplótipos ainda não registrados nas populações atuais, considerando os trabalhos de Valenzuela *et al.* (2009) e Carroll *et al.* (2011). O haplótipo H\_19, que representa o aDNA de um espécime da Argentina teria surgido a partir de três passos mutacionais do haplótipo mais frequente H\_1, enquanto o H\_16, um aDNA de Santa Catarina, teria surgido a partir de oito passos mutacionais do H\_4 que foi encontrado tanto em amostras atuais da Argentina como da Nova Zelândia/ Austrália. Os haplótipos H\_18 (aDNA Argentina) e H\_17 (aDNA Santa Catarina) teriam se derivado do haplótipo H\_16. Cabe salientar que este é um resultado preliminar no qual os resultados e seus significados devem ser avaliados com muita

cautela. Além dos relacionamentos entre os haplótipos, destacado inicialmente, salienta-se que o número de passos mutacionais entre os haplótipos pode estar subestimado, pois, estão sendo considerados somente os pequenos fragmentos de DNA recuperados nas amostras de aDNA.

Apesar da extração do material genético e sequenciamento de genes específicos oriundos de amostras antigas como ossos serem procedimentos rotineiros nos últimos anos, nossos resultados ratificam as dificuldades descritas por diversos autores na obtenção de material genético íntegro de amostras expostas e degradadas. Rosenbaum *et al.* (1997) sugeriram que espécimes de Mysticetos conservados em museus poderiam ser utilizados em análises genéticas para uma reconstrução histórica das populações de grandes baleias. Durante este estudo, realizado com amostras antigas de *Eubalaena glacialis*, os autores apontaram a dificuldade de extração e amplificação de material genético conservado. O método de extração de aDNA utilizado no trabalho de Rosenbaum *et al.* (1997) foi descrito por Sambrook *et al.* (1989) e para a amplificação de 545 pb da região D-Loop do mtDNA os autores precisaram utilizar *primers* internos, devido ao alto nível de degradação das amostras. Somente por meio de fragmentos menores (150 - 200 pb) e sobrepostos de aDNA conseguiram reconstruir a região de interesse. Alter *et al.* (2012) utilizaram amostras de ossos para investigar a diversidade genética das baleias cinzentas (*Eschrichtius robustus*) do Pacífico Oriental comparando dados de sequências de DNA antigos e atuais. Durante o estudo, a extração de aDNA foi realizada com o kit *DNA Qiaquick (QIAGEN)* e para a amplificação de 383 pb da região D-Loop do mtDNA, foi necessária a junção de quatro fragmentos de aDNA recuperados de aproximadamente 180 - 250 pb. Os autores relatam também que 20% dos produtos de amplificação foram clonados utilizando-se do kit ABI Topo com o objetivo de descartar contaminações de DNA exógeno, estratégia similar adotada no presente trabalho.

Apesar das dificuldades documentadas, o estudo do aDNA de mamíferos marinhos tem sido de extrema importância para compreender parâmetros populacionais e vários estudos tem documentado a alteração da variabilidade genética de espécies durante o período de exploração comercial (Hoelzel, 1999; Weber *et al.*, 2004). Infelizmente, assim como a maioria dos espécimes antigos, as amostras utilizadas neste estudo apresentaram-se pouco conservadas, com baixa quantidade de aDNA. Por diversas vezes os fragmentos recuperados eram muito pequenos ou não continham as informações de interesse, o que dificultou muito o trabalho e reduziu o poder

explicativo. Apesar dos esforços e aperfeiçoamentos nas metodologias, apenas 20 fragmentos de aDNA da região D-Loop do mtDNA foram recuperados de 11 amostras de *E. australis*. Estes fragmentos apresentaram tamanhos que variaram entre 7 a 59 pb, o que impossibilitou muitas inferências populacionais importantes destacadas inicialmente. Contudo, mesmo com poucos pares de bases amplificadas foi possível verificar quatro novos haplótipos encontrados em populações antigas, o que podem sustentar a hipótese de uma maior diversidade haplotípica em *E. australis* quando a mesma era livremente caçada. Tal hipótese deve ser considerada com cautela, neste momento, frente todas as restrições mencionadas. Novas extrações e amplificação de aDNA devem ser realizadas, com o intuito de reconstruir uma sequência da região D-Loop maior, pois a recuperação de fragmentos mais longos e o aumento de espécimes de aDNA devem ratificar ou não tal hipótese.

## CONCLUSÃO GERAL

Traçar o perfil histórico das espécies que sofreram um grande declínio populacional, seja por fatores estocásticos ou exploração comercial, como o caso da *Eubalaena australis*, é fundamental para o entendimento do status atual desta espécie. Somente com dados obtidos através da análise do aDNA é possível compreender os parâmetros populacionais atuais, através da comparação das informações genéticas temporais. O conhecimento sobre a genética de uma população antes e após eventos como a caça torna possível uma avaliação a respeito dos danos causados por tal atividade em uma determinada espécie. A endogamia e baixos níveis de variabilidade genética podem ser algumas das consequências.

Apensar da dificuldade ao trabalhar com o aDNA é possível afirmar que é possível recuperar material genético, contudo, deve-se reconhecer previamente os problemas envolvidos para estruturar os procedimentos experimentais adequados. Quando se trata de aDNA é fundamental buscar a reconstrução das regiões alvo recuperando-se pequenos fragmentos em suas ampliações por PCR, ou mesmo, em sequenciamentos diretos de última geração. Outro ponto importante a ser salientado é que mesmo com a disponibilidade de diversos protocolos de extração de ácidos nucleicos e ampliações via PCR para amostras degradadas, haverá a necessidade de ajustes, alterações considerando as amostras que utilizará. No presente trabalho, a

metodologia que se mostrou mais apropriada foi com a utilização do reagente Dextran Blue para a recuperação de uma maior quantidade de DNA nas extrações e, para a amplificação com produto suficiente, recomenda-se a Nested-PCR. A clonagem dos fragmentos resultantes das amplificações é fundamental para garantir qualidade e correspondência das bases nucleotídicas do referido gene ou região genômica alvo quando sequenciadas.

Mesmo frente às dificuldades expostas, foi possível recuperar fragmentos de aDNA de 11 espécimes representado amostras de Santa Catarina (Brasil) e Península Valdez (Argentina). Contudo, se reconhece que o número de espécimes e o tamanho dos fragmentos são, ainda, restritivos para sugerir o quanto a caça comercial no Sul do Brasil afetou a variabilidade genética da população de baleia- franca do Atlântico Sul Ocidental. Porém, a existência de quatro novos haplótipos nas populações ancestrais e não descritos para as populações atuais da espécie sugere a existência de uma maior diversidade genética durante o referido período. Este fato ressalta a importância da continuidade deste estudo para que se possa avaliar a real diversidade genética representada nos aDNA e o quão as populações atuais de *Eubalaena australis* foram afetadas nestes intensos anos de ação antrópica.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Informações sobre locais de coletas das amostras de ossos de *Eubalaena australis* que foram utilizadas nas técnicas de extração e amplificação de aDNA.

<b>Espécime</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Latitude (S)</b>	<b>Longitude (W)</b>
CMA1	Gov. Celso Ramos	27°18'56,88"	48°33'31,90"
CMA2	Canasvieiras	27°26'24,14"	48°27'53,33"
CMA3	Canasvieiras	27°26'24,14"	48°27'53,33"
CMA4	Canasvieiras	27°26'24,14"	48°27'53,33"
CMA5	-		
CMA6	Jurerê Internacional	27°26'38,84"	48°30'05,08"
CMA7	Jurerê Internacional	27°26'38,84"	48°30'05,08"
CMA8	Jurerê Internacional	27°26'38,84"	48°30'05,08"
CMA9	Costão- Ponta Grossa	28°17'24,41"	48°45'48,52"
CMA10	Costão- Ponta Grossa	28°17'24,41"	48°45'48,52"
CMA11	Praia do Forte/ Daniela	27°25'59,46"	48°31'10,15"
CMA12	Cachoeira Bom Jesus	27°24'52,68"	48°25'25,60"
CMA14	Barra da Laguna	28°30'	48°45'
CMA15	Barra da Laguna	28°30'	48°45'
CMA16	Barra da Laguna	28°30'	48°45'
CMA17	Barra da Laguna	28°30'	48°45'
CMA18	Barra da Laguna	28°30'	48°45'
CMA19	Barra da Laguna	28°30'	48°45'
CMA21	Gov. Celso Ramos	27°18'56,88"	48°33'31,90"
CMA22	Gov. Celso Ramos	27°18'56,88"	48°33'31,90"
<u>CMA23</u>	Gov. Celso Ramos	27°18'56,88"	48°33'31,90"
CMA24	Gov. Celso Ramos	27°18'56,88"	48°33'31,90"
CMA25	Gov. Celso Ramos	27°18'56,88"	48°33'31,90"
CMA26	Ilha de Anhatomirim	27°25'37	48°33'54
CMA27	Ilha de Anhatomirim	27°25'37	48°33'54
CMA28	Caiera	27°24'05,98"	48°36'08,38"
CMA29	Canasvieiras	27°26'24,14"	48°27'53,33"
CMA30	Canasvieiras	27°26'24,14"	48°27'53,33"
CMA31	Canasvieiras	27°26'24,14"	48°27'53,33"
CMA32	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA33	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA34	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA35	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA36	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA37	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA38	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA39	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA40	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA41	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA42	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA43	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"

CMA44	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA45	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
<u>CMA46</u>	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA47	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA48	Praia da Armação	27°42'14,91"	48°30'13,85"
CMA49	Pântano do Sul	27°46'50,77"	48°31'43,89"
CMA50	Pântano do Sul	27°46'50,77"	48°31'43,89"
CMA51	Pântano do Sul	27°46'50,77"	48°31'43,89"
CMA52	Pântano do Sul	27°46'50,77"	48°31'43,89"
CMA53	-		
CMA54	Caiera	27°24'05,98"	48°36'08,38"
CMA55	Caiera	27°24'05,98"	48°36'08,38"
Ea02	El Doradillo	42°40'	64°59'
Ea04	El Doradillo	42°40'	64°59'
Ea05	Playa Villarino	43°18'32,82"	65°02'25,93"
Ea06	Punta Ninfas	42°59'12,31"	64°20'29,15"
Ea07	Coleção LAMAMA	42°30'	60°30'
Ea08	Coleção LAMAMA	42°30'	60°30'
Ea09	Coleção LAMAMA	42°30'	60°30'
Ea11	Puerto Madryn	42°45'15,83"	65°02'57,51"
Ea12	Golfo Nuevo	42°44'15,07"	64°28'43,63"
Ea14	Pta Cormoranes	46°25'27,12"	67°31'24,06"
Ea15	Playa Colombo		
Ea16	-		
Ea17	Playa Fracasso	42°26'14,78"	64°06'28,90"
Ea18	-		
Ea19	Playa Colombo		
Ea20	-		
Ea21	Playa Fracasso	42°26'14,78"	64°06'28,90"
Ea22	-		
Ea23	-		
Ea24	-		
Ea25	Playa Fracasso	42°26'14,78"	64°06'28,90"
Ea26	-		
Ea27	-		
Ea28	Punta Alta- Argentina	38°52'33,82"	62°04'26,72"
<u>Ea34</u>	Bajo de Mazarredo		
<u>Ea35</u>	Bajo de Mazarredo		
Ea38	Golfo San Matías	41°37'41,36"	64°31'35,92"
Ea39	Golfo San Matías	41°37'41,36"	64°31'35,92"
<u>Ea40</u>	Playa Fracasso	42°26'14,78"	64°06'28,90"
<u>Ea43</u>	San Antonio Este	40°49'	64°45'
<u>Ea45</u>	Camaronos	44°47'38,44"	65°43'22,66"
Ea46	Puerto Madryn	42°45'15,83"	65°02'57,51"
<u>Ea47</u>	Puerto Madryn	42°45'15,83"	65°02'57,51"
Ea-sc02	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc03	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc04	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc05	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc06	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc07	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc08	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc09	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc10	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"
Ea-sc11	Garopaba	28°01'25,83"	48°36'51,36"

Ea-sc12	Garopaba	28°01'25,83''	48°36'51,36''
<u>SCBR15</u>	Garopaba	28°01'25,83''	48°36'51,36''
<u>SCBR17</u>	Garopaba	28°01'25,83''	48°36'51,36''
<u>SCBR18</u>	Garopaba	28°01'25,83''	48°36'51,36''

---

**Anexo 2.** Informações sobre as sequências da região D-Loop do DNA mitocondrial da espécie *E. australis*, obtidas a partir do banco de dados GenBank e utilizadas neste estudo.

<b>Espécime</b>	<b>Acesso GenBank</b>	<b>Autor</b>
<i>Eubalaena australis</i>	EU290592.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290591.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290590.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290589.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290588.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290587.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290586.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290585.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290584.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290583.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290582.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290581.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290580.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290579.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290578.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290577.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290576.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290575.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290574.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290573.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290572.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290571.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290570.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290569.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290568.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290567.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290566.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290565.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290564.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009
<i>Eubalaena australis</i>	EU290563.1	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009





<i>Eubalaena australis</i>	GQ389690.1	Dados não publicados
<i>Eubalaena australis</i>	GQ389689.1	Dados não publicados
<i>Eubalaena australis</i>	GQ389688.1	Dados não publicados
<i>Eubalaena australis</i>	JN097605.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097604.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097603.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097602.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097601.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097600.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097599.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097598.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097597.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097596.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097595.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097594.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011
<i>Eubalaena australis</i>	JN097593.1	Carroll <i>et al.</i> , 2011

## Referência Bibliográfica

ALAEDDINI, Reza (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics* **6** (3): 297–305.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of population**. Blackwell Publishing, 2007.

ALTER, S. E.; NEWSOME, S. D.; & PALUMBI, S. R. (2012). Pre-whaling genetic diversity and population ecology in eastern Pacific gray whales: insights from ancient DNA and stable isotopes. *PloS one*, 7(5), e35039.

AMORY,S.; HUEL,R.; BILIC, A.; LOREILLE, O.; PARSONS, T.J. 2012. Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 6:398-406.

AVISE, J.C.; BALL, M.; ARNOLD, J. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial

- DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. **Molecular Biology and Evolution**, 5(4): 331-344.
- AVISE, John C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution: Natural History and Evolution**. Springer, 1994.
- BAKER, C. S.; PATENAUDE, N. J.; BANNISTER, J. L.; ROBINS, J.; KATO, H. 1999. Distribution and diversity of mtDNA lineages among southern right whales (*Eubalaena australis*) from Australia and New Zealand. *Mar Biol.* 134:1–7.
- BANDEL, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.
- BARNETT, R., & LARSON, G. (2012). A Phenol–Chloroform Protocol for Extracting DNA from Ancient Samples. In *Ancient DNA* (pp. 13-19). Humana Press.
- BESSETTI, Joseph. An Introduction to PCR Inhibitors. *Profiles in DNA*, v. 10, n. 1, p.9-10, 2007.
- BEST, P.B. 1994. Seasonality of reproduction and the length of gestation in southern right whales *Eubalaena australis*. **J.Zool.** **232**: 175-189.
- BEST, P.B. 1987. Estimates of landed catch of right (and other whalebone) whales in the American fishery, 1805–1909. *Fish Bull.* 85:403–418.
- BINLADEN, J.; WIUF, C; GILBERT, M.T.P.; BUNCE, M.; BARNETT, R.; LARSON,G.;GREENWOOD, A.D.;HAILE, J.; HO, S.Y.W.; HANSEN, A.J; WILLERSLEV, E. 2006. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. **Genetics**, 172, pp. 733–741.
- BOOM, R. *et al.* A rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495–503 (1990).
- BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of molecular evolution**, **18(4)**: 225-239.

- CÂMARA, I.G. & J.T. PALAZZO, 1986. Novas informações sobre a presença de *Eubalaena australis* no sul do Brasil. Actas... Primera Reunion de Trabajo de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. Buenos Aires, 1986, pp. 35-41.
- CAMPOS, P. F.; CRAIG, O. E.; TURNER-WALKER, G.; PEACOCK, E., WILLERSLEV, E.; GILBERT, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone—Where is it located and how should we extract it?. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 7-16.
- CARROLL, E.; PATENAUDE, N.; ALEXANDER, A.; STEEL, D.; HARCOURT, R.; CHILDHOUSE, S.; & BAKER, C. S. (2011). Population structure and individual movement of southern right whales around New Zealand and Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 432, 257-268.
- CATTANEO, Cristina *et al.* A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Science International*, v. 74, p. 167-174, 1995.
- CLAPHAM, P.J.; YOUNG, S.B.; BROWNELL JR., R.L. 1999. Baleen whales: conservation issues and the status of the most endangered population. *Mammal Rev.*, 29 (1): 35-60.
- CLAPHAM, P.J. 1999. Predicting right whale distribution. Report of the workshop held on October in Woods Hole, Massachusetts. Northeast Fisheries Science Center, Woods Hole, MA.
- COOPER, A.; POINAR, H. N. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, v. 289, n. 5482, p. 1139-1139, 2000.
- CUMMINGS, W.C. Right whales, *Eubalaena glacialis* (Muller, 1776) and *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822). In: **Handbook of Marine Mammals**. Volume 3: The Sirenians and Baleen Whales. Sam. H. Ridway and Sir Richard Harrison, eds. p. 275-304. 1985.
- DAVOREN, J.; VANEK, D.; KONJHODZIC, R.; CREWS, J.; EDWIN, H.; PARSONS, T.J. (2007). Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short

- Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J.* 48:478-85.
- DAWBIN, W.H. 1986. Right whales caught in waters around south eastern Australia and New Zealand during the nineteenth and early twentieth centuries. *Rep Int Whaling Comm Spec Issue.* 10:261–267.
- De BRUYN, M.; HALL, B. L.; CHAUKE, L. F., BARONI, C.; KOCK, P. L.; HOELZEL, A. R. (2009). Rapid response of a marine mammal species to Holocene climate and habitat change. *PLoS genetics*, 5(7).
- DER SARKISSIAN, C., BALANOVSKY, O., BRANDT, G., KHARTANOVICH, V., BUZHILOVA, A., Koshel, S., ... & Genographic Consortium. (2013). Ancient DNA reveals prehistoric gene-flow from Siberia in the complex human population history of North East Europe. *PLoS genetics*, 9(2), e1003296.
- DONOVAN, G. P. 1992. The International Whaling Commission: given its past, does it have a future? In: In: Symoens J. J., editor. *Whales: Biology–Threats–Conservation.* Brussels, Belgium: **Royal Academy of Overseas Sciences**; pp. 23-44.
- DRUMMOND, A. *et al.* 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969-1973.
- DU PASQUIER T. 1986. Catch history of French right whaling mainly in the South Atlantic. *Rep Int Whaling Comm Spec Issue.* 10:269–274.
- ELLIS, Miriam. **A baleia no Brasil Colonial.** São Paulo: Melhoramentos, 1969.
- EVANS, P.G.H. 1987. *The natural history of whales and dolphins.* New York: Facts On File, Inc. xiv+ 343pp.
- FRANKHAM, R; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. *Fundamentos de genética da conservação.* Ribeirão Preto: SBG, 2008.
- FOOTE, A.D.; HOFREITER, M.; MORIN, P.A. 2012. Ancient DNA from marine mammals: Studying long-lived species over ecological and evolutionary timescales' *Annals of anatomy-Anatomischer anzeiger*, vol 194, no. 1, pp. 112-120.

- GAINES, C. A.; HARE, M. P.; BECK, S. E.; ROSENBAUM, H.C. 2005. Nuclear markers confirm taxonomic status and relationships among highly endangered and closely related right whale species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272(1562)**: 533-542.
- GEIGL, E.-M. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* 44, 337–342 (2002).
- GOODALL, R.N.P.; GALEAZZI, A.R. 1986. Recent sightings and standings of southern right whales off subantartic South America and the Antarctic Peninsula. *Rep. Int. Whal. Comm. (Special Issue 10)*:173-176.
- GROCH, K.R. 2005. **Biologia Populacional e Ecologia Comportamental da Baleia Franca Austral, *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822), CETACEA, MYSTICETI, no litoral sul do Brasil**. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 168pp.
- GROCH, K.R.; PALAZZO JR. J.T.; FLORES, P.A.C.; ADLER, F.R.; FABIAN, M.E. 2005. Recent rapid increases in the Brazilian right whale population. *LAJAM* 4(1): 41-47.
- HAGELBERG, E.; CLEGG, J. B. (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. Royal Society London*, v. 244, p.45-50.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*v, 41: 95-98.
- HAMILTON, P. K.; KNOWLTON, A. R.; MARX, M. K., KRAUS, S. D. 1998. Age structure and longevity in North Atlantic right whales *Eubalaena glacialis* and their relation to reproduction. *Marine Ecology Progress Series*, **171**: 285-292.
- HOELZEL, A.R. 1991. Killer whale predation on marine mammals at Punta Norte, Argentina: food sharing, provisioning and foraging strategy. *Behav Ecol Sociobiol* 29:197–204.
- HOELZEL, A. R. 1994. Genetics and ecology of whales and dolphins. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 377-399.

- HOFREITER, M.; SERRE, D.; POINAR, H.N.; KUNCK, M.; PÄÄBO, S. 2001. Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2:353–59.
- HOLLAND, M.M.; CAVE, C.A.; HOLLAND, C.A.; BILLE, T.W. (2003). Development of a Quality, High Throughput DNA Analysis Procedure for Skeletal Samples to Assist with the Identification of Victims from the World Trade Center Attacks. *Croat Med J.* 44:264-72.
- IMAIZUMI, Kazuhiko et al. (2005). DNA typing of bone specimens – the potential use of the profiler test as a tool for bone identification. *Legal Medicine*, v. 7, p. 31-41.
- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic press. 1990.
- International Whaling Commission. 2001. Report of the Workshop on the Comprehensive Assessment of Right Whales: A worldwide comparison. *J Cetacean Res Manage (Special Issue)* 2:1-60.
- International Wildlife Coalition- IWC/Brasil. 1999. Plano de ação para a conservação da baleia-franca (*Eubalaena australis*) no estado de Santa Catarina. Projeto Baleia Franca. Florianópolis- SC.
- JACKSON, J. A.; BAKER, C. S.; VANT, M.; STEEL, D. J.; MEDRANO-GONZALEZ, L.; PALUMBI, S. R. 2009. Big and slow: phylogenetic estimates of molecular evolution in baleen whales (Suborder Mysticeti). *Molecular biology and evolution*, 26(11), 2427-2440.
- KALMÁR, T.; BACHRATI, C.Z.; MARCSIK, A.; RASKÓ, I. 2000. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 12, p.e67-e71.
- KENNEY, R.D. 2008. Right Whales (*E. glacialis*, *E. japonica* and *E. australis*). In (ed. Perrin; Wursing and Thewissen). *Encyclopedia of Marine Mammals*, p.962-971.
- KRINGS, M.; STONE, A.; SCHMITZ, R.W.; KRAINITZK, H.; STONEKING, M.; PÄÄBO, S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997, 90:19–30.

- LACY, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. **Journal of Mammalogy**, **78** (2):320-335.
- LINDAHL, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-15.
- MALIK, S.; BROWN, M. W.; KRAUS, S.D.; WHITE, B. N. 2000. Analysis of mitochondrial DNA diversity within and between North and South Atlantic right whales. *Mar Mamm Sci.* 16:545–558.
- MILLER, C.A.; REEB, D.; BEST, P.B.; KNOWLTON, A.R.; BROWN, M.W.; MOORE, M.J. 2011. Blubber thickness in right whales *Eubalaena glacialis* and *Eubalaena australis* related with reproduction, life history status and prey abundance. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, **438**: 267–283.
- MILLER, C.A.; BEST, P.B.; PERRYMAN, W.L.; BAUMGARTNER, M.F.; MORRE, M.J. 2012. Body shape changes associated with reproductive status, nutritive condition and growth in right whales *Eubalaena glacialis* and *E. australis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 459: 135–156.
- MOORE, M. J.; BERROW, S. D.; JENSEN, B. A.; CARR, P.; SEARS, R.; ROWNTREE, V. J.; HAMILTON, P. K. 1999. Relative abundance of large whales around South Georgia (1979–1998) 1. **Marine Mammal Science**, **15** (4): 1287-1302.
- MOREIRA, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*, 26(13), 3309-3310.
- MORIN, P.A.; McCARTHY, M. 2007. Highly accurate SNP genotyping from historical and low-quality samples. **Mol. Ecol. Res.**, 7: 937–946.
- OLIVEIRA, L. R.; OTT, P. H.; GRAZZIOTIN, F. G.; WHITE, B., & BONATTO, S. Effective population size and bottleneck signals in the Atlantic population of the southern right whale. SC/S11/RW26 report to the International Whaling Commission, Sept 2011. [Available from the IWC Office].7pp.
- OTT, P.H. 2002. **Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de cetáceos do Atlântico Sul Ocidental: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena***



*australis*. Tese (Doutorado Genética Molecular), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

OTT, P.H.; FLORES, P.A.; WHITE, T.R. 2011. Genetic diversity and population structure of southern right whales, *E. australis*, from the Atlantic Coast of South America. SC/S11/RW25 **report to the International Whaling Commission**, Sept 2011. [Available from the IWC Office].7pp.

PALAZZO JR., J.T.; CARTER, L.A. 1983. **A caça de Baleias no Brasil**. Porto Alegre: AGAPAN. 25pp.

PATENAUDE, N. J.; PORTWAY, V. A.; SCHAEFF, C. M.; BANNISTER, J. L.; BEST, P. B.; PAYNE, R. S.; BAKER, C. S. (2007). Mitochondrial DNA diversity and population structure among southern right whales (*Eubalaena australis*). *Journal of Heredity*, 98(2), 147-157.

PAYNE, R.; DORSEY, E.M. 1983. Sexual dimorphism and aggressive use of callosities in right whales (*Eubalaena australis*). In *Communication and behavior of whales: 295- 328*. Payne, R. (Ed.). AAS Selected Symposium No. 76. Boulder, Colorado: Westview Press.

PAYNE, R. 1986. Long term behavioral studies of the Southern right whale (*Eubalaena australis*). **Reports of the International Whaling Commission, Special Issue, Vol.10:** 161-167.

PAYNE, R.; ROWNTREE, V.; PERKINGS, J. S.; COOKE, J. G.; LANKESTER, K. 1990. Population size, trends and reproductive parameters of right whales (*Eubalaena australis*) off Peninsula Valdes, Argentina. **Report of the International Whaling Commission, (Special Issue 12)**, 271-278.

PESQUERO, M.D.; ASCASO, C.; ALCALÁ, L; FERNÁNDEZ-JALVO, Y. 2010. A new taphonomic bioerosion in a Miocene lakeshore environment. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 295, 192–198.

POLZIN, T. & DANESCHMAND, S. V. (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Res Let* **31**,12–20.

- PONTALTI, M.; DANIELSKI, M. 2011. Registros de enredamentos de baleias-franca, *Eubalaena australis* (CETACEA, MISTICETI), na temporada reprodutiva de 2010, em Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 24.2: 109-112.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. 2009. **Tracer v1.5 README**. Disponível com arquivos de instalação em <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>.
- RICE, D.W. 1998. Marine Mammals of the world: Systematic and Distribution. Allen Press- The Society of Marine Mammal, Lawrence, Kansas.
- RICHARDS, R. 1998. Southern right whales: original global stocks. SC/M98/ RW37. Paper submetido à Reunião Especial do Comitê Científico da Comissão Internacional da Baleia-CIB- Cape Town, África do Sul, março de 1998.
- RIZZI, E.; LARI, M.; GIGLI, E.; DE BELLIS, G.; CARAMELLI, D. 2012. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel Evol*, 44, 21.
- RODRIGUES, G.R.; CORRÊA, A.A.; GROCH, K. 2010. Registro de molestante em baleias- franca (*Eubalaena australis*) por gaivotões (*Larus dominicanus*) na área de reprodução do sul do Brasil, 2009. XIV Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul (RT). 8º Congresso da Sociedade Latinoamericana de Especialistas em Mamíferos Aquáticos (SOLAMAC). Florianópolis (SC), 24 a 28 de outubro de 2010.
- ROHLAND, N.; HOFREITER, M. 2007. Ancient DNA extraction from bones and teeth. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1756-1762.
- ROMAN, J.; PALUMBI, J.R. 2003. Whales before whaling in the North Atlantic. **Science** 301(5632): 508-510.
- ROSENBAUM, H. C.; EGAN, M. G.; CLAPHAM, P. J.; BROWNELL, R. L., & DESALLE, R. (1997). An effective method for isolating DNA from historical specimens of baleen. *Molecular Ecology*, 6(7), 677-681.
- ROSENBAUM, H. C.; BROWNELL Jr., R.L.; SHAEFF, C.; PORTWAY, V.; WHITE, B.N; MALIK, S.; PASTENE, L.A.; PATENAUDE, N.J.; BAKER, S.C.; GOTO, M.; BEST, P.B.; CLAPHAM, P.J; HAMILTON, P.; MOORE, M.; PAYNE, R.; ROWNTREE, V.; TYNAN, C.T.; BANNISTER, J.L.; DESALLE, R. 2000. World-

- wide genetic differentiation of Eubalaena: questioning the number of right whale species. **Molecular Ecology**. **9**: 1793-1802.
- ROWNTREE, V.J. 1993. Cyamids: the louse that moores. *Whalewatcher*. **J. Am. Cetacean Soc.****17**:14-17.
- SAINT-HILAIRE, Auguste. **Viagem a Curitiba e Província de Santa Catarina**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1978.
- SAMBROOK, Joseph; RUSSEL, David W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3 v.
- SBISÀ, E.; TANZARIELLO, F.; REYES, A.; PESOLE, G.; SACCONI, C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, **205**:125-140.
- SEPP, R.; SZABO, I.; UDA, H.; SAKAMOTO, H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **J Clin Pathol**, **47**, pp. 318–323, 1994.
- SIRONI, M.; ROWNTREE, V.J.; Di MARTINO, M.; CHIRIFE, A.; BANDIERI, L., *et al.* (2012) Southern right whale mortalities at Península Valdés, Argentina: updated information for 2010–2011. *Journal of Cetacean Research and management*. (unpublished document SC/64/BRG12, [Available at the International Whaling Commission Office, <http://iwc.int/home>. Accessed June 2014].
- SOLÉ-CAVA, A.M. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos, Editora Ltda, 2004.
- STAAT, R. H.; GAWRONSKI, T. H.; SCHACHTELE, C. F. Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. **Infection and immunity**, v. 8, n. 6, p. 1009-1016, 1973.
- STADEN R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* **132**:115–130

- TECHNELYSIUM. Disponível em <<http://www.technelysium.com.au/chromas>>. Acesso em 10 março 2013. Software capturado ao solicitar o programa Chromas v.2.4.
- THOMPSON, J.D et al. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, n. 24, p. 4876-4882.
- THOMAS, R. H., SCHAFFNER, W., WILSON, A. C., & PÄÄBO, S. (1989). DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 340(6233), 465-467.
- TORMOSOV, D.; MIKHALIEV, Y.; BEST, P.; ZEMSKY, V.; SEKIGUCHI K, *et al.* (1998) Soviet catches of southern right whales *Eubalaena australis*, 1951–1971. Biological data and conservation implications. *Biological Conservation*, 86: 185–197. (doi:10.1016/S0006-3207(98)00008-1).
- VALENTINE, K.; DUFFIELD, D. A.; PATRICK, L. E.; HATCH, D. R., BUTLER, V. L.; HALL, R. L.; LEHMAN, N. (2008). Ancient DNA reveals genotypic relationships among Oregon populations of the sea otter (*Enhydra lutris*). *Conservation Genetics*, 9(4), 933-938.
- VALENZUELA, L. O.; SIRONI, M.; ROWNTREE, V. J.; & SEGER, J. (2009). Isotopic and genetic evidence for culturally inherited site fidelity to feeding grounds in southern right whales (*Eubalaena australis*). *Molecular Ecology*, 18(5), 782-791.
- VIGHI, M.; BORRELL, A.; CRESPO, E. A.; OLIVEIRA, L.R.; SIMÕES-LOPES, P.C., *et al.* (2014) Stable Isotopes Indicate Population Structuring in the Southwest Atlantic Population of Right Whales (*Eubalaena australis*). *PLoS ONE* 9(3): e90489
- WALKER, M.R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999. 334p.
- WHITEHEAD, H.; PAYNE, R. 1981. New techniques for measuring whales from the air. **Report to the US Marine Mammal Commission**, MMC-76/22. 36pp.
- YANG, D. Y., ENG, B., WAYE, J. S., DUDAR, J. C., & SAUNDERS, S. R. (1998). Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American journal of physical anthropology*, 105(4), 539-543.