

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidade e estruturação genética do
golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*)
no Sudoeste e Norte do Oceano Atlântico e no
Oceano Pacífico**

Fernanda Lopes Teixeira

Vitória, ES

Maio, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidade e estruturação genética do
golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*)
no Sudoeste e Norte do Oceano Atlântico e no
Oceano Pacífico**

Fernanda Lopes Teixeira

Orientadora: Ana Paula Cazerta Farro

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Biologia Animal) da Universidade Federal
do Espírito Santo como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em
Biologia Animal

Vitória, ES

Maio, 2021

Fernanda Lopes Teixeira

**“Diversidade e estruturação genética do golfinho-pintado-
pantropical (*Stenella attenuata*) no Sudoeste e Norte do Oceano
Atlântico e no Oceano Pacífico”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 19 de maio de 2021.

Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Ana Paula Cazerta Farro (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão



Profa. Dra. Larissa Rosa de Oliveira (Unisinos)
Examinadora externa



Prof. Dr. Mario Manoel Rollo Júnior (UNESP)
Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ANA PAULA CAZERTA FARRO DA ROSA - SIAPE 2564748
Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas - DCAB/CEUNES
Em 26/05/2021 às 07:38

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/197509?tipoArquivo=O>

Agradecimentos

A Deus por me abençoar, me conceder saúde, sabedoria, paz, calma e tranquilidade para seguir minha caminhada.

Aos meus amados pais que são minhas inspirações, meus refúgios, meus maiores apoiadores e incentivadores dos meus sonhos. Obrigada por todo amor e carinho que me transmitem diariamente! Vocês são os melhores pais do mundo e sou muito grata por tudo que vocês fazem por mim! Love uus lindos!

A minha família que eu amo tanto: meus avós (in memoriam), Pedro, Paulo, Junia, Paulinho, Paola, Manu, Isa, Sandrinha, Betânia, Zuita, Fabio, Tati, Eva, Raquel, Dirce, Tatiana, Letícia, Felipe, Marcelo, Simone, Sueli, Beth, Ary, Eloi, Lan, André, Darlan, Stela, Junea e Marle.

Ao MJ por ser meu apoio, meu conselheiro e meu aconchego. Obrigada por acreditar em mim! A caminhada da vida é melhor com sua companhia, amor, companheirismo e carinho. Sou grata por ter você ao meu lado. Agradeço à sua família (eterna tia Nízia, Luísa, Cadu, Helena, Ruth e Marcio) por me acolherem como família e torcerem por mim.

A minha querida orientadora, Ana Paula Cazerta Farro, pelos ensinamentos, conselhos, amizade, atenção, paciência, parceria e por sempre estar disposta a ajudar e torcer pelos seus orientados. Ana, sou sua fã!

Agradeço às minhas irmãs do coração (Viviane e Jhéssica) pela amizade de mais de 20 anos que não muda nem mesmo com a distância! Saudades das nossas noites de pijama que agora são encontros anuais, mas com o mesmo carinho.

Agradeço ao meu trio (Gabrielly e Beatriz) por me mostrarem que “Três nunca é demais, mas sim um número perfeito!”

As minhas amigas de GV que me apoiaram na caminhada até aqui: Luiza, Laís, Flávia, Nathalia, Carolina e o “Clubinho” (Ana, Jullie, Lorayne, Gabriela, Jhéssica e Viviane).

A minha “família” de São Mateus: Marcia, Marcelo, Alice e Elisa.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Bruna, Evillin, Pedro Sanders e Rafael (Mathielo).

As minhas geneticisters (Manu e Karla) pela amizade, carinho e apoio.

Aos meus amigos do mestrado, em especial a Paula, Raquel, Ana e Patrícia pelo apoio e carinho durante diversos momentos difíceis e felizes do mestrado. Vocês são mulheres fortes e tenho orgulho de todas!

Aos amigos do GECOM por todo conhecimento compartilhado, apoio e conversas, em especial a Dri por me ajudar nos procedimentos de microsatélite.

A Kelly Bonach pelo carinho, incentivo e pela oportunidade de ser voluntária no projeto TAMAR de Guriri - São Mateus/ES.

As meninas do apto 207 (Fran e Tay) que me acolheram com muito amor nas minhas idas à Vitória com as noites de pizza e coca-cola.

Aos professores do PPGBAN pelo conhecimento compartilhado e pelas contribuições para a minha dissertação durante as disciplinas do curso.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

Aos colaboradores e co-autores deste estudo, que cederam as amostras: Projeto Golfinho Rotador (PGR), Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA), Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), Socioambiental Consultores Associados (SCA) e a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

À FAPES, pela bolsa concedida durante o curso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
MATERIAL E MÉTODOS	5
Coleta de amostras	5
Extração do DNA e sexagem	6
DNA nuclear	7
DNA mitocondrial	9
RESULTADOS	11
Diversidade nuclear	11
Diversidade mitocondrial	13
DISCUSSÃO	20
REFERÊNCIAS	24
ANEXOS	34

Dissertação apresentada em formato de artigo, seguindo as regras de formatação da revista Marine Mammal Science.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nome dos locos microssatélites (Locos) utilizados, sequências dos primers (5'-3'), faixa de tamanho de fragmentos amplificados (pares de bases, bp) e referências.....	8
Tabela 2. Diversidade genética de golfinhos-pintados-pantropicais do litoral brasileiro para dez locos microssatélites. (A: número total de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; PIC: conteúdo de informação polimórfica; Ra: riqueza alélica; Dg: diversidade genética; F _{IS} : coeficiente de endocruzamento; F(Null): estimativa de frequência de alelos nulos; P valor equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	12
Tabela 3. Análise de parentesco entre os golfinhos-pintados-pantropicais. Indivíduos relacionados, categorias de relacionamentos identificadas e ano de coleta.....	12
Tabela 4. Sítios polimórficos e frequências absolutas para os haplótipos da espécie <i>Stenella attenuata</i> no Oceano Atlântico Ocidental.	15
Tabela 5. Valor de FST (diagonal superior) e de P (diagonal inferior) entre as localidades estudadas. Valores em negrito são significativos (FST>0,05 e P<0,05).Localidades: Nor: Nordeste, SS: Sul/Sudeste, AN: Atlântico Norte, CA: América Central, CR: Costa Rica, EC: Equador, NM: Norte do México, OFF: Offshore, 4-IS: Área das 4 ilhas, OH: Oahu, Ha: Havaí, Ka/Ni: Kauai/Niihau, SI: Ilhas Salomão	18
Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as seis unidades amostrais: Nordeste (SWA), Sul/Sudeste (SWA), Oceano Pacífico Tropical, Oceano Atlântico Norte, Ilhas Salomão e Havaí.	19
Tabela 7. Índices de diversidade do golfinho-pintado-pantropical encontrados neste estudo e em estudos do Oceano Pacífico e Atlântico Norte. Número de amostras (N), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π). Os valores em negrito são maiores e os valores com asterisco são menores do que os valores encontrados neste estudo.	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Origem das amostras, número de indivíduos e frequência dos haplótipos encontrados neste estudo. Os losangos representam a localidade dos haplótipos do GenBank. Os triângulos representam as amostras coletadas por meio de biópsia e os círculos as amostras coletadas por meio de encalhe, com os números de indivíduos amostrados por localidade. Círculos com mais de uma cor representam haplótipos compartilhados e a frequência dos haplótipos em cada local amostrado no litoral brasileiro. ... 14
- Figura 2.** Rede de haplótipos das amostras do Oceano Atlântico Ocidental. Cada círculo corresponde a um haplótipo, e seu tamanho é proporcional à sua frequência na população. Círculos pretos indicam haplótipos intermediários potenciais não amostrados. Cada cor representa uma localidade amostrada e cada traço representa o número de passos mutacionais entre os haplótipos. 15
- Figura 3.** Rede de haplótipos de todas as localidades analisadas. Cada círculo corresponde a um haplótipo, e seu tamanho é proporcional à sua frequência na população. Círculos pretos indicam haplótipos intermediários potenciais não amostrados. Cada cor representa uma localidade amostrada e cada traço representa o número de passos mutacionais entre os haplótipos. ... 17
- Figura 4.** Distribuição de Mismatch observada (barra) e esperada (linha) para os golfinhos-pintados-pantropicais do Oceano Atlântico Ocidental. 19

RESUMO

O golfinho-pintado-pantropical, *Stenella attenuata* (Gray 1846), ocorre em águas temperadas e tropicais dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Para avaliar a diversidade e estruturação genética da espécie no litoral brasileiro e comparar esses resultados com aqueles obtidos para outras localidades, foram sequenciados para a região controle do DNA mitocondrial 28 indivíduos e 125 haplótipos do GenBank foram adicionados nas análises, sendo esses de cinco localidades do Oceano Pacífico Tropical (92), quatro localidades do Havaí (12), Ilhas Salomão (14) e para o Oceano Atlântico Norte (7). Além disso, foram avaliados dez locos microssatélites para 20 indivíduos da Baía de Santos no Brasil. No litoral brasileiro, foram verificados nove haplótipos, altos valores de diversidade haplotípica (Nordeste: 0,93 +/- 0,12; Sul/Sudeste: 0,70 +/- 0,06) e de moderada a baixa nucleotídica (Nordeste: 0,027 +/- 0,02; Sul/Sudeste: 0,007 +/- 0,00). Para os locos microssatélites, o valor de heterozigosidade observada variou de 0,450 a 0,950 e heterozigosidade esperada de 0,619 a 0,942. Evidenciou-se que os golfinhos-pintados-pantropicais do Oceano Atlântico Sudoeste apresentam altos índices de diversidade genética e que nessa região existem pelo menos duas populações distintas, com diferenciação entre as outras bacias oceânicas avaliadas. Esse estudo apresenta os primeiros dados genéticos para a espécie no Atlântico Ocidental. A continuidade desse estudo é importante para que a área de distribuição possa ser melhor representada.

PALAVRAS-CHAVE

conservação, Delphinidae, D-loop, microssatélites, variabilidade genética

ABSTRACT

Pantropical-spotted-dolphin, *Stenella attenuata* (Gray 1846) occurs in temperate and tropical waters of the Atlantic, Pacific and Indian oceans. To evaluate the genetic diversity and population structure of the species on the Brazilian coast and to compare these results with those obtained for other locations, 28 specimens were sequenced for the mitochondrial DNA control region and 125 GenBank haplotypes were added in the analyzes from five locations the Eastern Tropical Pacific (92), four locations the Hawaii (12), Solomon Islands (14) and the North Atlantic Ocean (7). In addition, ten microsatellite loci were evaluated for 20 specimens from the Santos Basin in Brazil. In the Brazilian coast, nine haplotypes were found, high values of haplotypic diversity (Northeast: 0.93 +/- 0.12; South / Southeast: 0.70 +/- 0.06) and from moderate to low nucleotide diversity (Northeast: 0.027 +/- 0.02; South / Southeast: 0.007 +/- 0.00). For microsatellite loci, the observed heterozygosity values ranged from 0.450 to 0.950 and expected heterozygosity from 0.619 to 0.942. It was evidenced that the pantropical-spotted-dolphins of the Southwest Atlantic Ocean have high levels of genetic diversity and that in this region there are at least two distinct populations, with differentiation between the other ocean basins evaluated. This study presents the first genetic data for the species in the South Atlantic. The continuity of this study is important so that the area of distribution can be better represented.

KEYWORDS

conservation, Delphinidae, D-loop, microsatellite, genetic variability

INTRODUÇÃO

O golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*) é um pequeno cetáceo da família Delphinidae e possui distribuição em águas tropicais e subtropicais (Jefferson et al., 2015). Essa espécie ocupa o segundo lugar em abundância entre os cetáceos, atrás apenas do golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (Perrin, 2018).

No Oceano Pacífico Tropical (ETP) os golfinhos-pintados-pantropicais são reconhecidos, com base em diferenças morfológicas (Perrin et al., 1985) e análises genéticas (Escorza-Treviño et al., 2005), como duas subespécies: *S. a. attenuata (offshore)*, que ocorre em águas tropicais oceânicas em todo o mundo; e *S. a. graffmani (inshore)*, que ocorre no ETP em águas rasas a <200 km da costa (Jefferson et al., 2015; Perrin, 2001). A subespécie *offshore*, com base nas diferenças de morfologia, diferenças na sazonalidade de nascimento de filhotes e uma potencial lacuna na distribuição, foram subdivididas em populações do Norte e do Sul (Barlow, 1984; Perrin et al., 1985; Schnell et al., 1986).

No Mar do Caribe, os golfinhos-pintados-pantropicais preferem águas ao redor das ilhas, com maior profundidade (cerca de 1000m), maiores temperaturas e baixa biomassa de fitoplânctons (Barragán-Barrera et al., 2019). No litoral brasileiro a espécie *Stenella attenuata* é considerada oceânica, ocorrendo em profundidades acima de 850-1000 metros para além da quebra da plataforma continental (do Amaral et al., 2015; Moreno et al., 2005), e é encontrada em águas tropicais com um maior número de registros de avistagens na região Nordeste (Moreno et al., 2005), com poucos encalhes e registros para o Sudeste (Di Tullio et al., 2016; Lodi & Borobia, 2013; Zerbini et al., 1998).

A prospecção de hidrocarbonetos no ambiente marinho pode causar diversos impactos nos mamíferos marinhos, pois são fontes poluidoras, aumentam o tráfego marítimo e utilizam da sísmica para identificar fontes de hidrocarbonetos (Martins et al., 2013). Um local muito explorado no Brasil é a Bacia de Santos e, através do Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos (PMC-BS), são avaliados os potenciais impactos das atividades de petróleo e gás natural realizadas pela PETROBRAS sobre os cetáceos (Petrobras, 2020a).

Os estudos de genética populacional já realizados com a espécie *Stenella attenuata* restringem-se ao Oceano Pacífico (Courbis-Sarah, 2011; Escorza-Treviño et al., 2005; Leslie et al., 2019; Leslie & Morin, 2016; Leslie & Morin, 2018; Yao et al., 2004).

Definir a estrutura populacional das espécies é importante porque, além de fornecer informações fundamentais sobre aspectos ecológicos e evolutivos, fornecem informações essenciais para identificar unidades de manejo ou de conservação biologicamente relevantes (Parsons et al., 2006). Uma ferramenta importante para avaliar os níveis de estrutura populacional entre espécies de cetáceos são as análises genéticas moleculares, como as análises com a região controle do DNA mitocondrial (Caballero et al., 2018; Faria et al., 2020; Gariboldi et al., 2016; Nara et al., 2016) e com os marcadores microssatélites (Courbis et al., 2014; de Oliveira et al., 2020; Gopal et al., 2019).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é maternalmente herdado, possui ausência de recombinação, possui poucos genes, uma taxa evolutiva alta e possui uma região não codificadora (D-loop) (Arias et al., 2003). A região controle do mtDNA (D-loop) possui informações genéticas que permitem inferir relações entre táxons próximos e a história de populações através de estudos de fluxo gênico, especiação e da estrutura de populações (Avice, 1994). Os microssatélites são de herança biparental, o que permite inferir fluxo de genes mediado por machos e fêmeas, além de serem altamente variáveis e permitirem a obtenção de elevado conteúdo informativo (Frankham et al., 2008).

A maioria dos cetáceos possui uma alta mobilidade no ambiente marinho, o que permite a conectividade entre regiões distantes (Palumbi et al., 1994; Yao et al., 2004). Porém, estruturação populacional pode ocorrer em distâncias geográficas relativamente curtas devido a fatores evolutivos, ecológicos ou comportamentais, como estrutura social, especialização de recursos e fidelidade ao local (Bowen et al., 2016; Möller et al., 2007).

Nenhum estudo avaliou a genética e estrutura populacional da espécie *Stenella attenuata* no Oceano Atlântico Ocidental. Portanto, faz-se necessário a realização de estudos que enfoquem na variabilidade genética e na existência de diferentes populações de golfinhos-pintados-pantropicais ao longo dessa bacia oceânica para verificar se existem linhagens diferentes no Oceano

Atlântico, como foi a ocupação de *Stenella attenuata* nesta bacia e se a Bacia de Santos é um local importante para a espécie, pois essa área de ocorrência é muito impactada pela prospecção de gás e petróleo, e essa degradação e perturbação do habitat pode afetar as populações de golfinhos-pintados-pantropicais. Além disso, este estudo pode contribuir na determinação do status de conservação da espécie em cada área e, se necessária, na elaboração de estratégias de conservação das populações. Neste estudo utilizamos sequências da região controle do DNA mitocondrial e locos microssatélites para avaliar a diversidade genética e a estruturação dos golfinhos-pintados-pantropicais das regiões Nordeste e Sul/Sudeste do litoral brasileiro e verificar se ocorre estruturação entre as regiões do Brasil com o Oceano Atlântico Norte e o Oceano Pacífico.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Foram avaliadas 28 amostras de golfinhos-pintados-pantropicais, sendo três encontrados no Ceará (CE), três em Fernando de Noronha (FN), uma no Espírito Santo (ES), cinco no Rio de Janeiro (RJ), 15 em São Paulo (SP) e uma no Rio Grande do Sul (RS) (Figura 1). As regiões amostradas por meio de biópsia foram do RJ e SP, e por meio de encalhes foram FN, CE, ES e RS (Figura 1).

Após o recolhimento dos animais encalhados das praias, instituições parceiras (Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos - AQUASIS, Centro Mamíferos Aquáticos - CMA, Grupo de Estudo de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul - GEMARS, Instituto Baleia Jubarte - IBJ e Projeto Golfinho Rotador - PGR) realizaram necropsias para análise da causa da morte e retirada de amostra de tecido muscular ou de fígado. Posteriormente à retirada dos tecidos, estes foram acondicionados e preservados em microtubos contendo álcool 70%. Esse material de encalhe foi encaminhado para o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES-UFES, São Mateus, ES.

Para as análises nucleares foram utilizadas 20 amostras de pele, coletadas através do Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos (PMC-BS), executado pela Socioambiental Consultores Associados para a

PETROBRAS. O PMC-BS é financiado pela PETROBRAS e definido no Licenciamento Ambiental Federal do Pólo Pré-Sal da Bacia de Santos acompanhado pelo IBAMA. Essas amostras foram coletadas por meio de biópsias com balestras (120 e 150 bar de pressão) e dardos flutuantes (corpo de fibra de carbono e flutuador de poliuretano) com ponteiras de aço inoxidável as quais foram desenvolvidas especialmente para amostragem de cetáceos (CETA-DART, Copenhagen, Dinamarca). As amostras de biópsia foram conservadas em álcool 70% e foram mantidas refrigeradas na geladeira/freezer.

Extração do DNA e sexagem

Amostras de biópsia

As amostras de biópsia foram previamente analisadas no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) em Porto Alegre (RS). O DNA foi extraído utilizando o DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

A sexagem molecular foi realizada utilizando os pares de primers Y53-3C e Y53-3D (Fain & Lemay, 1995) para amplificar o gene SRY e P1-5EZ e P2-3EZ (Aasen & Medrano, 1990) para amplificar os genes ZFX/ZFY. As reações de PCR foram: 2,5 Mm de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada primer, 0,3 u da enzima Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen), 1 X o tampão de reação (Invitrogen), e 1 µl de DNA (aproximadamente 20 ng). As condições do termociclador foram: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 72 °C por 10 min. O produto foi visualizado em gel de agarose 1,5% e o sexo das amostras foi identificado como macho (duas bandas) ou fêmea (uma banda).

Amostras de encalhe

Todas as amostras de encalhe foram avaliadas no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus/ ES.

Para a extração do DNA das amostras de encalhe foi utilizado o protocolo de extração solução salina (Bruford et al., 1992, adaptado por David Vieites). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop - ND100, Uniscience), utilizando-se 1 µL das soluções e o DNA foi diluído para 20 ng/µl.

Para as amostras em que não foi possível identificar o sexo morfológicamente, o sexo foi determinado a partir da amplificação dos genes ZFX e SRY utilizando-se os primers ZFX0582 e ZFX0923 (Bérube & Palsboll 1996); PMSRYF (Richard et al., 1994) e TtSRYR (Rosel et al., 2003). As reações de PCR foram realizadas de acordo com Rosel et al. (2003), com as seguintes modificações: tampão de PCR 1× (Invitrogen), 150 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 u de *Taq* polimerase (Invitrogen) e 0,3 µM de cada primer, com exceção do reverse para o SRY (0,06 µM). O volume final da reação foi de 25 µL. As condições no termociclador foram: 30 s a 92 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 51 °C, e 45 s a 72 °C. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 2,5%, corados com GelRed (Biotium) e fotodocumentados.

DNA nuclear

Amostras de biópsia

As amostras de biópsia foram genotipadas com a utilização de dez locos microssatélites marcados com fluorescência (Tabela 1). Foram realizadas duas reações de PCR: a primeira realizada com os locos EV1, EV14, EV37, EV94, MK6, utilizando 10 µM de DNA, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,026 µM do primer *forward* M13, 0,04 µM do primer *reverse* e do primer M13 marcado e 0,5 u de Platinum Taq em um volume final de 10 µL; e a segunda com os locos KWM2a, KWM12a, TexVet5, TexVet7 e D08, utilizando 10 µM de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTP, 0,016 µM do primer *forward* M13, 0,25 µM do primer *reverse* e 0,20 µM do primer M13 marcado e 0,5 u de Platinum Taq em um volume final de 10 µL. As condições do ciclo para os locos EV14, EV37, EV1 e MK6 foram: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, e 72 °C por 30 s, seguido por uma extensão final de 72 °C por 10 min. Já para o loco EV94, as condições do ciclo foram: 94 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, e 72 °C por 40 s, seguido por uma extensão final de 72 °C por 30 min. Para os locos da segunda PCR, as condições do ciclo foram: 94 °C por 2 min, seguido por 10 ciclos em que a cada ciclo era reduzido 1 °C, de 94 °C por 30 s, 60 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min. A eletroforese capilar dos produtos de PCR foi realizada no sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems). Os genótipos do DNA nuclear foram determinados usando o software Peak Scanner v1.0 (Applied

Biosystems) pela coordenação temática de genética do PMC-BS (Petrobras, 2020a). Os tamanhos dos alelos para cada loco foram encaminhados para o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES-UFES, São Mateus, ES para as análises posteriores, conforme descritas abaixo.

Tabela 1. Nome dos locos microssatélites (Locos) utilizados, sequências dos primers (5'-3'), faixa de tamanho de fragmentos amplificados (pares de bases, bp) e referências.

Locos	Sequência 5'-3'	bp	Referência
EV1	F: CCCTGCTCCCCATTCCTC R: ATAAACTCTAATACACTTCCTCCAAC	115-197	Valsecchi & Amos, 1996
EV14	F: TAAACATCAAAGCAGACCCC R: CCAGAGCCAAGGTCAAGAG	123-159	Valsecchi & Amos, 1996
EV37	F: AGCTTGATTTGGAAGTCATGA R: TAGTAGAGCCGTGATAAAGTGC	178-235	Valsecchi & Amos, 1996
EV94	F: ATCCTATTGGTCCTTTTCTGC R: AATAGATAGTGATGATGATTCACACC	198-261	Valsecchi & Amos, 1996
KWM2a	F: GCTGTGAAAATTAAATGT R: CACTGTGGACAAATGTAA	200-400	Hoelzel et al. 1998
KWM12a	F: CCATACAATCCAGCAGTC R: CACTGCAGAATGATGACC	200-400	Hoelzel et al. 1998
TexVet5	F: GATTGTGCAAATGGAGACA R: TTGAGATGACTCCTGTGGG	236-260	Rooney et al. 1999
TexVet7	F: TGCACTGTAGGGTGTTCAGCAG R: CTTAATTGGGGGCGATTTAC	155-163	Rooney et al. 1999
MK6	F: GTCCTCTTTCCAGGTGTAGCC R: GCCCACTAAGTATGTTGCAGC	145-189	Krützen et al. 2001
D08	F: GATCCATCATATTGTCAAGTT R: TCCTGGGTGATGAGTCTTC	103	Shinohara et al. 1997

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos foi estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al., 2007) e potenciais amostras duplicadas foram pesquisadas comparando seus genótipos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram avaliados utilizando o *GENEPOP on the Web* (Rousset, 2008; Raymond & Rousset, 1995). Os locos também foram testados quanto à presença de alelos nulos e/ou erros de genotipagem utilizando-se o software Microchecker v.2.2.0.3 (Van Oosterhout et al., 2004), com correção de Bonferroni.

Somente os locos polimórficos foram utilizados nas análises de diversidade genética. Para as análises intrapopulacionais foram calculados: o

número total de alelos (A); número médio de alelos; média da riqueza alélica (número de alelos independente do tamanho da amostra (R_a); heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e); diversidade genética (D_g) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) com os software Fstat v.2.9.4 (Goudet, 2003) e Arlequin v.3.5 (Excoffier et al., 2010). O software Fstat v2.9.4 (Goudet, 2003) também foi utilizado para calcular o valor de F_{ST} , F_{IS} , $mAlc$ e $vAlc$ entre os machos e as fêmeas para avaliar a hipótese de diferenciação por filopatria.

O tamanho populacional efetivo contemporâneo (N_e) foi estimado utilizando um método baseado no desequilíbrio de ligação (Waples, 1989; Waples & Do., 2010) como implementado no NeEstimator 2.0 (Do et al., 2014). Um valor de P_{crit} de 0,02 e 95% intervalos de confiança foi escolhido para reduzir o viés de potencial para baixa frequência de alelos (Waples & Do., 2010). Um teste para eventos de efeito gargalo passados ou recentes com base nas frequências alélicas foram realizadas usando o software Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart., 1996). A classificação unilateral dos sinais do teste de Wilcoxon para o excesso de heterozigoto foi utilizado sob o modelo de mutação gradual (SMM) e o modelo bifásico mutacional (TPM; 30 variações, modelo mutacional 70 gradual, 10000 interações). Um nível de probabilidade de 0,05 foi considerado significativo (Piry et al., 1999). A análise de parentesco entre os indivíduos foi realizada no software ML Relate (Kalinowski et al., 2006).

DNA mitocondrial

Amostras de biópsia

A região controle do DNA mitocondrial (D-loop) para as amostras de biópsia foi amplificada utilizando os primers Dlp1.5 (Baker et al., 1998) e Dlp8G (Pichler et al., 2001) para gerar um fragmento de aproximadamente 600 bp. Foram utilizados 2,5 Mm de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μM de cada primer, 0,3 u da enzima Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen), 1 X o tampão de reação (Invitrogen), e 1 μl de DNA (aproximadamente 20 ng). As condições do termociclador foram: 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 40 s e 72 °C por 10 min. O produto foi visualizado em gel de agarose 1,5%. As reações foram encaminhadas a um laboratório terceirizado para realizar o sequenciamento automático. As sequências de mtDNA foram analisadas através do software SEQUENCHER 5.4.6 (Gene Codes Corporation). As sequências da região controle foram encaminhadas para

o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES-UFES, São Mateus, ES, no qual foram desenvolvidas as análises posteriores a serem descritas abaixo.

Amostras de encalhe

A região controle do DNA mitocondrial (D-loop) para as amostras de encalhe foi amplificada utilizando os primers Dlp1.5 (Baker et al., 1998) e Dlp8G (Pichler et al., 2001) para gerar um fragmento de aproximadamente 600 bp. Para as amostras de encalhe, o volume final da solução foi de 20 µl contendo 20 ng de DNA, tampão de PCR 10× (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato), 2,5 mM de MgCl₂, 0,035 u *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 0,4 µM de cada primer. As condições no termociclador foram: 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, e 40 s a 72 °C, e 10 min a 72 °C. Foi utilizada uma amostra controle que já foi amplificada anteriormente e um controle negativo (branco) para verificar se ocorreu contaminação. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gelred (Biotium) e fotodocumentados.

A purificação das bandas amplificadas foi realizada com 1 µL da enzima ExoSap-IT (USB Corporation). As reações foram encaminhadas a um laboratório terceirizado para realizar o sequenciamento automático.

As sequências obtidas, tanto das amostras de encalhe quanto das de biópsia, foram alinhadas e editadas no software MEGA X (Kumar et al., 2018). Além disso, com a ferramenta BLAST do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), as sequências foram comparadas com sequências previamente publicadas nesse site e foram comparadas no DNA Surveillance (Ross et al., 2003) para confirmação da espécie.

Além das sequências geradas, foram adicionadas às análises 125 haplótipos previamente depositados no GenBank, que também foram avaliados no DNA Surveillance para confirmação da espécie (Figura 1). A maioria dos haplótipos utilizados possuía no artigo a frequência em que cada um deles foram encontrados, exceto para duas localidades: Atlântico Norte e Ilhas Salomão.

O software Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2010) foi utilizado para calcular o número de haplótipos, os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica, o cálculo de distribuição *Mismatch* e os índices de neutralidade (Fs de Fu e D de Tajima), a análise de variância molecular (AMOVA) em três níveis e o índice de

fixação (F_{ST}). Foram realizados testes para dividir as amostras do litoral brasileiro para o teste de estruturação em duas regiões: Nordeste (Fernando de Noronha - FN e Ceará - CE) e Sul/Sudeste (Espírito Santo - ES, Rio de Janeiro - RJ, São Paulo - SP e Rio Grande do Sul - RS). O teste de F_{ST} foi realizado entre as regiões dos Oceanos Atlântico e Pacífico e entre as regiões do Brasil (Nordeste e Sul/Sudeste).

As redes de haplótipos foram construídas por meio dos cálculos Median-Joining através do software Network (Bandelt et al., 1999). O software Inkscape (Bah, 2009) foi utilizado para editar a rede de haplótipos.

RESULTADOS

Diversidade nuclear

Todos os 10 locos testados foram genotipados para as amostras de biópsia coletadas na Bacia de Santos. Nas análises de presença de alelos nulos e erros de genotipagem, foi verificada a presença de alelos nulos para o loco D08 ($p < 0,05$), porém as análises incluindo o loco não obtiveram diferenças significativas das análises quando esse loco foi excluído, portanto o loco foi mantido nas análises seguintes.

No teste de desequilíbrio de ligação verificou-se que nenhum dos dez marcadores avaliados apresentaram-se ligados. A probabilidade média de não-exclusão para identidade dos indivíduos foi de $2,29 \times 10^{-14}$. Não foram verificados indivíduos ou genótipos idênticos. Na análise do desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg os locos EV37 e D08 desviaram significativamente ($p < 0,05$) (Tabela 2). Todos os locos foram altamente informativos, PIC acima de 0,5 (Tabela 2).

Os resultados do FSTAT não indicaram diferença significativa entre valores de F_{ST} entre fêmeas e machos, sendo o valor de F_{ST} para as fêmeas menores do que para os machos (fêmeas: $F_{ST} = -0,002$; machos: $F_{ST} = 0,002$; $P = 0,933$). O valor de F_{IS} foi maior para as fêmeas ($F_{IS} = 0,12$) do que para os machos ($F_{IS} = 0,05$), enquanto que o valor médio de índice de atribuição e a variação nos valores do índice de atribuição foram menores para as fêmeas ($mA/c = -1,12$; $vA/c = 3,60$) do que para os machos ($mA/c = 1,91$; $vA/c = 10,53$).

Tabela 2. Diversidade genética de golfinhos-pintados-pantropicais do litoral brasileiro para dez locos microssatélites. (A: número total de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; PIC: conteúdo de informação polimórfica; Ra: riqueza alélica; Dg: diversidade genética; F_{IS}: coeficiente de endocruzamento; F(Null): estimativa de frequência de alelos nulos; P valor equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Locos	A	Ho	He	PIC	Ra	Dg	F _{IS}	F(Null)	P (EHW)
EV1	10	0,800	0,830	0,785	10	0,832	0,038	0,0011	0,5095
EV14	13	0,850	0,912	0,880	13	0,914	0,071	0,0214	0,1808
EV37	14	0,750	0,910	0,878	14	0,914	0,180	0,0881	0,0202*
EV94	16	0,850	0,942	0,913	16	0,945	0,100	0,0409	0,3318
KWM2a	11	0,800	0,771	0,733	11	0,771	-0,038	-0,0457	0,6564
KWM12a	10	0,750	0,811	0,765	10	0,813	0,078	0,0282	0,8834
TexVet5	8	0,750	0,797	0,750	8	0,799	0,061	0,0291	0,1268
TexVet7	4	0,450	0,619	0,558	4	0,624	0,278	0,1518	0,1744
MK6	14	0,950	0,910	0,877	14	0,909	-0,045	-0,0358	0,9097
D08	12	0,700	0,892	0,857	12	0,897	0,220	0,1053	0,0170*
Média/Total	11,2	0,765	0,839	0,799	11,2	0,841	0,094	0,03844	0,318

(*) Valores estatisticamente significativos para EHW $P < 0,05$.

O tamanho populacional efetivo contemporâneo (N_e) para a população de golfinhos-pintados-pantropicais na área amostrada foi estimado em 192,4 (IC 95% 73,4 - ∞ ; tamanho médio da amostra harmônica: 20). A classificação unilateral dos sinais do teste de Wilcoxon para o excesso de heterozigoto não foi significativa para ambos os modelos (TPM= 0,312; SMM= 0,958), o que indica que os golfinhos-pintados-pantropicais da área amostrada não passaram por um possível evento de efeito gargalo passado ou recente. Nas análises de parentesco, foi possível verificar a presença de seis meios-irmãos, sendo três coletados em anos distintos (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de parentesco entre os golfinhos-pintados-pantropicais. Indivíduos relacionados, categorias de relacionamentos identificadas e ano de coleta.

Indivíduos relacionados	Possível parentesco	Ano de coleta
Sat 17 e Sat 19	Meios-irmãos	2017 e 2017
Sat 19 e Sat 12	Meios-irmãos	2017 e 2018
Sat 11 e Sat 12	Meios-irmãos	2018 e 2018
Sat 12 e Sat 28	Meios-irmãos	2018 e 2021
Sat 13 e Sat 27	Meios-irmãos	2018 e 2020
Sat 26 e Sat 27	Meios-irmãos	2020 e 2020

Diversidade mitocondrial

Entre as 28 amostras, foram identificadas 13 fêmeas e 15 machos. Foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 600 bp para as 28 amostras. Posteriormente a edição e ao alinhamento, foi gerado um fragmento de 476 bp para as amostras do litoral brasileiro e um fragmento de 328 bp quando todas as sequências D-loop foram agrupadas (do litoral brasileiro e do GenBank). Para as amostras do Oceano Atlântico Ocidental (SWA), foram encontrados nove haplótipos, sendo somente um haplótipo compartilhado entre a região Nordeste e Sul/Sudeste (H8) (Figura 1 e 2). Os haplótipos foram caracterizados por 28 sítios polimórficos (Tabela 4). Foi verificada uma alta diversidade haplotípica (Nordeste: 0,93 +/- 0,12; Sul/Sudeste: 0,70 +/- 0,06) e de moderada a baixa diversidade nucleotídica (Nordeste: 0,027 +/- 0,02; Sul/Sudeste: 0,007 +/- 0,00). O padrão de distribuição e o número de passos mutacionais entre os haplótipos demonstraram a existência de pelo menos dois haplogrupos no litoral brasileiro (Figura 1 e 2). Além disso, a análise de divergência genética (F_{ST}) entre as duas regiões do Brasil (Nordeste e Sul/Sudeste) foi significativa com valor de moderado a alto de F_{ST} (0,39; $p < 0,05$).

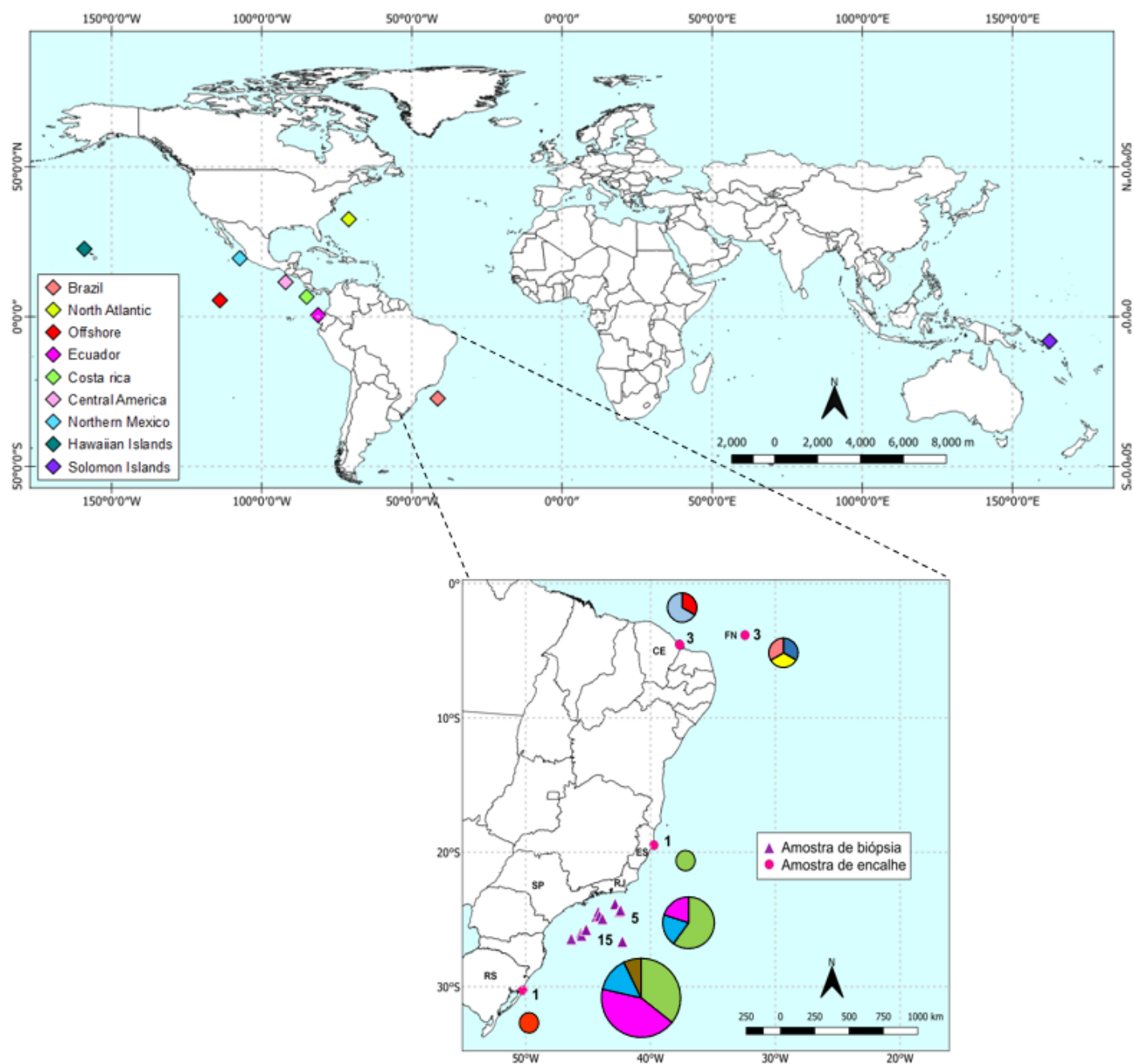


Figura 1. Origem das amostras, número de indivíduos e frequência dos haplótipos encontrados neste estudo. Os losangos representam a localidade dos haplótipos do GenBank. Os triângulos representam as amostras coletadas por meio de biópsia e os círculos as amostras coletadas por meio de encalhe, com os números de indivíduos amostrados por localidade. Círculos com mais de uma cor representam haplótipos compartilhados e a frequência dos haplótipos em cada local amostrado no litoral brasileiro.

a mutação deve ter sido cortado, e por isso, na rede de haplótipos, alguns haplótipos estão com frequência maior do que um e foram compartilhados com outros haplótipos, sendo que dois haplótipos do SWA não foram evidenciados na rede de haplótipos em que o haplótipo H8 foi compartilhado com o H2 e o haplótipo H9 com o H3 (Figura 3). Quando comparados os haplótipos encontrados no SWA com os outros haplótipos depositados no GenBank, alguns haplótipos demonstraram padrão do tipo estrela, houve o compartilhamento de um haplótipo entre a região Nordeste e o Oceano Atlântico Norte (H6), um haplótipo entre as duas regiões do Brasil e o Atlântico Norte (H2), um haplótipo entre as regiões do Oceano Pacífico e a região Nordeste (H5) e um haplótipo entre a América Central e as regiões do Brasil (H3). Um haplótipo foi exclusivo da região Sul/Sudeste (H7) e um haplótipo da região Nordeste (H4) (Figura 3).

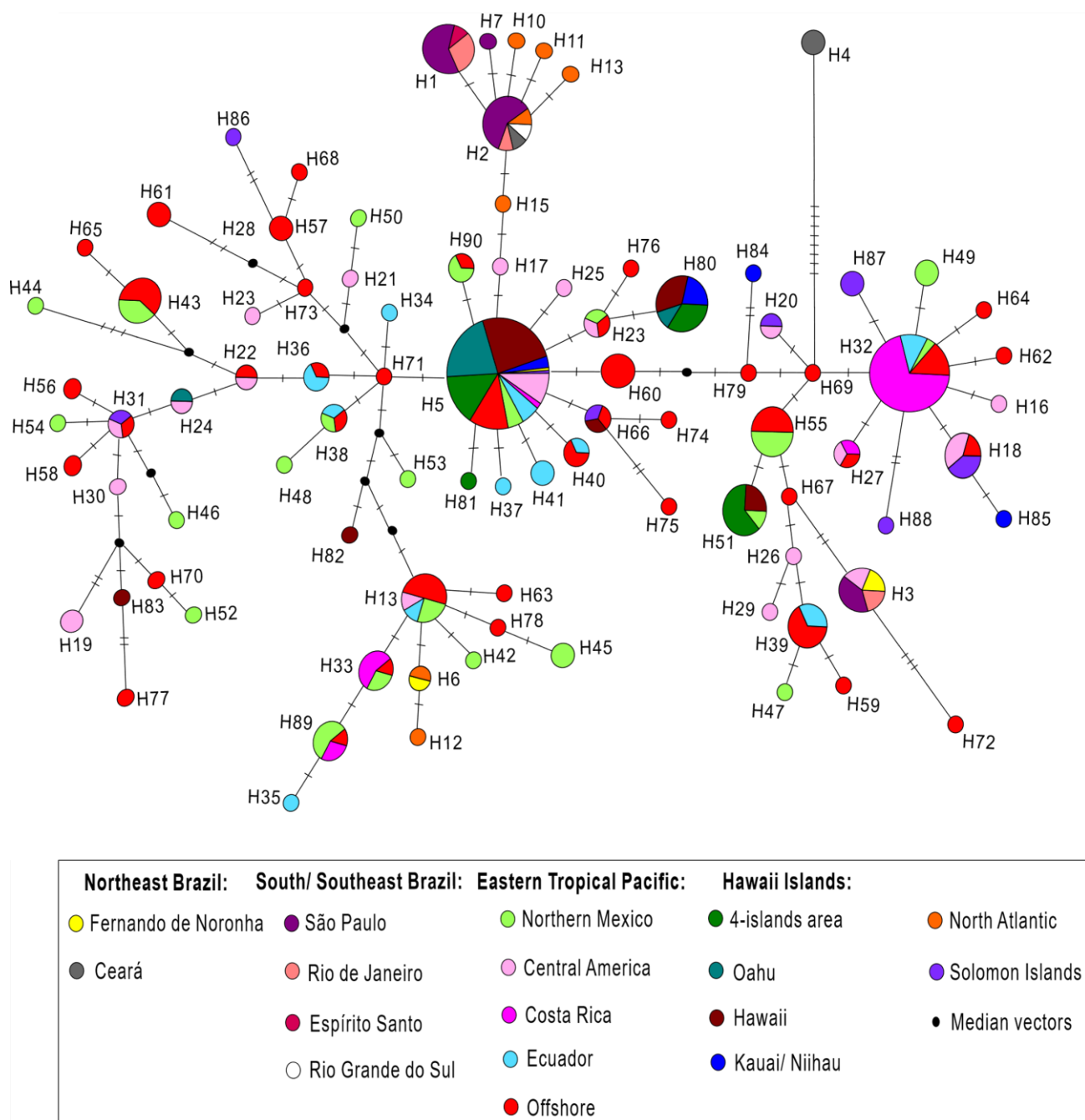


Figura 3. Rede de haplótipos de todas as localidades analisadas. Cada círculo corresponde a um haplótipo, e seu tamanho é proporcional à sua frequência na população. Círculos pretos indicam haplótipos intermediários potenciais não amostrados. Cada cor representa uma localidade amostrada e cada traço representa o número de passos mutacionais entre os haplótipos.

Na análise de divergência genética (F_{ST}) entre os oceanos e as regiões do litoral brasileiro foi possível verificar diferença significativa entre a região Sul/Sudeste e as localidades do Oceano Pacífico com altos valores de F_{ST} e entre o Atlântico Norte com moderado valor de F_{ST} (Tabela 5). Para a região Nordeste, os valores de F_{ST} foram altos em comparação com a Costa Rica, Equador, Área das 4 ilhas, Ohau e Havaí e moderado em comparação com

América Central, Norte do México, Offshore e Kauai/Niihau. O valor de p não foi significativo entre a região Nordeste e o Atlântico Norte e as Ilhas Salomão (Tabela 5). Acredita-se que com o aumento do número amostral seja possível confirmar essa estruturação genética entre os indivíduos amostrados na região Nordeste e as outras duas localidades.

Tabela 5. Valor de F_{ST} (diagonal superior) e de P (diagonal inferior) entre as localidades estudadas. Valores em negrito são significativos ($F_{ST} > 0,05$ e $P < 0,05$). Localidades: Nor: Nordeste, SS: Sul/Sudeste, AN: Atlântico Norte, CA: América Central, CR: Costa Rica, EC: Equador, NM: Norte do México, OFF: Offshore, 4-IS: Área das 4 ilhas, OH: Oahu, Ha: Havaí, Ka/Ni: Kauai/Niihau, SI: Ilhas Salomão

	Nor	SS	AN	CA	CR	EC	NM	OFF	4-IS	OH	Ha	Ka/Ni	SI
Nor	*	0,39	0,15	0,16	0,26	0,21	0,11	0,15	0,24	0,51	0,39	0,13	0,11
SS	0,00	*	0,13	0,40	0,56	0,45	0,39	0,38	0,48	0,63	0,55	0,45	0,46
AN	0,07	0,04	*	0,28	0,47	0,30	0,25	0,27	0,40	0,66	0,50	0,33	0,33
CA	0,01	0,00	0,00	*	0,16	0,05	0,02	0,01	0,03	0,13	0,06	0,02	0,02
CR	0,00	0,00	0,00	0,00	*	0,14	0,11	0,12	0,30	0,53	0,41	0,27	0,04
EC	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	*	0,04	0,03	0,12	0,22	0,16	0,07	0,09
NM	0,02	0,00	0,00	0,10	0,00	0,03	*	-0,00	0,06	0,20	0,13	0,05	0,02
OFF	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,01	0,78	*	0,04	0,14	0,08	0,03	0,02
4-IS	0,01	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,01	0,02	*	0,11	0,02	-0,01	0,14
OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	*	0,01	0,18	0,44
Ha	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,24	*	0,02	0,27
Ka/Ni	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,04	0,11	0,13	0,45	0,02	0,21	*	0,11
SI	0,06	0,00	0,00	0,18	0,12	0,01	0,16	0,14	0,01	0,00	0,00	0,05	*

Na AMOVA, o valor de F_{ST} (0,27) evidenciou diferenciação entre as populações ($p = 0,00$) em um nível de significância de 0,05 e a porcentagem de variação entre os grupos foi de 21,17%, entre as populações dentro dos grupos foi de 6,46% e dentro das populações foi de 72,38% (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as seis unidades amostrais: Nordeste (SWA), Sul/Sudeste (SWA), Oceano Pacífico Tropical, Oceano Atlântico Norte, Ilhas Salomão e Havaí.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagens de variação
Entre os grupos	1	45,93	0,78	21,17%
Entre as populações dentro dos grupos	3	8,10	0,01	6,46%
Dentro das populações	165	391,55	2,37	72,38%
Índice de fixação	$F_{ST} = 0,27$; $p = 0,00$	-	-	-

O gráfico de distribuição de *Mismatch* e os testes de neutralidade, considerando as regiões brasileiras como uma ou duas populações, foram similares, portanto, os resultados a seguir consideram as regiões brasileiras como uma população. O gráfico de distribuição de *Mismatch* dos golfinhos-pintados-pantropicais do SWA apresentou uma curva multimodal (Figura 4). Os testes de neutralidade FS de Fu ($F = 2,93688$; $p = 0,92000$) e D de Tajima ($D = -0,12960$; $p = 0,51600$) não foram significativos.

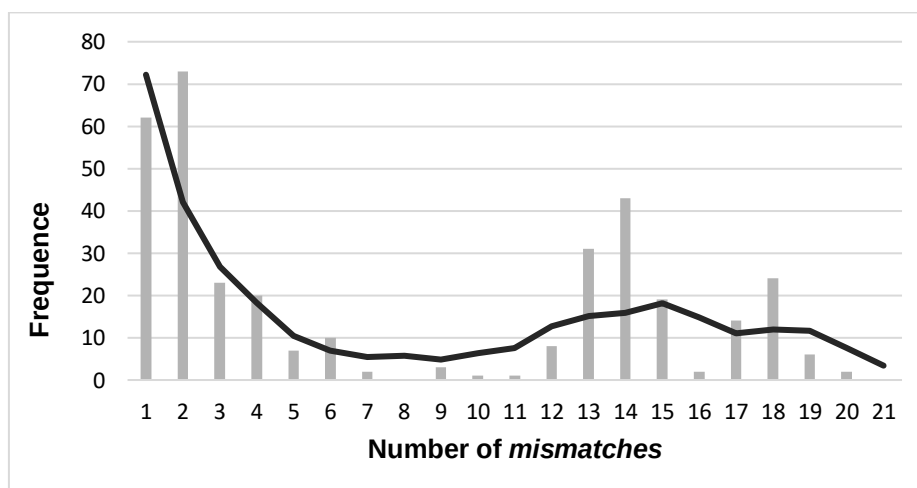


Figura 4. Distribuição de *Mismatch* observada (barra) e esperada (linha) para os golfinhos-pintados-pantropicais do Oceano Atlântico Ocidental.

Ao comparar os índices de diversidade da espécie em outras localidades, a partir do mtDNA, os golfinhos-pintados-pantropicais do Havaí apresentaram os menores valores de índices de diversidade e os do ETP e *S. a. attenuata* (ETP) apresentaram valores maiores de diversidade haplotípica e os da região

Nordeste do Brasil apresentaram o maior valor de diversidade nucleotídica (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de diversidade do golfinho-pintado-pantropical encontrados neste estudo e em estudos do Oceano Pacífico e Atlântico Norte. Número de amostras (N), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π). Os valores em negrito são maiores e os valores com asterisco são menores do que os valores encontrados neste estudo.

Localidade	N	H	h	π	Referência
Nordeste	6	5	0,93 +/- 0,12	0,027 +/- 0,02	Este estudo
Sul/Sudeste	22	5	0,70 +/- 0,06	0,007 +/- 0,00	Este estudo
Oceano Atlântico Norte	34	7	-	-	Kingston et al., 2009
Havaí	100	10	0,45 +/- 0,25*	0,005 +/- 0,00*	Courbis, et al., 2014
Águas de Taiwan	30	10	0,79 +/- 0,06*	0,007 +/- 0,00*	Yao et al., 2004
Mar da China Meridional	4	3	0,83 +/- 0,22*	0,007 +/- 0,00*	Yao et al., 2004
Oceano Pacífico Tropical	225	112	0,98 +/- 0,00	0,013 +/- 0,00*	Escorza-Trevino et al., 2005
Oceano Pacífico Tropical	6	6	-	-	Kingston et al., 2009
<i>S. a. graffmani</i> (ETP)	24	16	0,9529	0,0162*	Leslie et al., 2019
<i>S. a. attenuata</i> (ETP)	47	43	0,9804	0,0198*	Leslie et al., 2019

DISCUSSÃO

Stenella attenuata do SWA apresentaram altos valores de diversidade haplotípica e moderada a baixa diversidade nucleotídica nas análises com mtDNA. Apesar da região Nordeste apresentar um menor número amostral, ela apresentou maiores índices de diversidade, o que evidencia uma provável fundação a partir de um maior número de linhagens, como observado nas redes de haplótipos. Os golfinhos-pintados-pantropicais de Fernando de Noronha apresentaram três haplótipos distantes entre si e os do Ceará dois distantes entre si. Para Noronha foi evidenciado compartilhamento de haplótipos com indivíduos do Oceano Atlântico Norte, Pacífico e Sul/Sudeste do Brasil. O padrão de distribuição e o número de passos mutacionais entre os haplótipos demonstraram a existência de pelo menos dois haplogrupos no litoral brasileiro. Além disso, o valor de F_{ST} foi significativo entre o Nordeste e o Sul/Sudeste indicando a existência de pelo menos duas populações no Brasil.

Outro estudo com o golfinho-nariz-de-garrafa demonstrou a diferenciação de duas unidades biológicas para a espécie, o Norte e o Sul do Brasil, sendo que a população do Sul é consistente com descrições anteriores para *Tursiops gephyreus*, o qual ainda não possui status taxonômico definido (Oliveira et al., 2019). Do Amaral et al. (2015) evidenciaram que as áreas com alta adequabilidade de habitat para a ocorrência dos golfinhos-pintados-pantropicais do SWA são encontradas na região Nordeste do Brasil, onde a profundidade é maior que 1000 m, a temperatura da água de superfície é elevada ($>27^{\circ}\text{C}$) e alteração de temperatura é baixa, variando em torno de $2,5^{\circ}\text{C}$ e, a partir do sul da Cadeia Vitória-Trindade, no Sudeste do Brasil, a adequabilidade de habitat é reduzida. Portanto, é provável que, a partir da Cadeia Vitória – Trindade, os golfinhos-pintados-pantropicais do Sul/Sudeste do Brasil ocorram em regiões com condições ambientais diferentes da população do Nordeste. Esse fato pode explicar a existência de duas populações nessas regiões, pois sabe-se que a temperatura da superfície do mar e a profundidade desempenham papel importante na biogeografia das espécies de grandes vertebrados marinhos (Viricel et al., 2014). Outra possibilidade seria o isolamento genético entre o Nordeste e o Sul/Sudeste do Brasil ocorrer devido à zona de ressurgência presente na Bacia de Campos e de Santos, que afeta diretamente a estrutura trófica e a composição de espécies (Valentin, 2001).

Nas duas redes, alguns haplótipos apresentaram o padrão do tipo estrela que sugere expansão populacional (Amaral et al., 2007; Cunha et al., 2014). Porém, os valores de F_S de F_u e D de Tajima e o gráfico de distribuição de *Mismatch* não demonstraram que a população de golfinhos-pintados-pantropicais do SWA está em expansão.

Os valores de F_{ST} , de F_{IS} e de vA/c entre machos e fêmeas demonstraram que não há suporte para a hipótese de diferenciação por filopatria de fêmeas, assim como foi verificado para os golfinhos-pintados-pantropicais do Havaí (Courbis et al., 2014). Para que a hipótese de diferenciação por filopatria seja aceita, o F_{ST} para o sexo mais filopátrico deve ser maior do que o do sexo mais dispersivo, pois as frequências alélicas para indivíduos do sexo que mais se dispersam devem ser mais homogêneas do que para indivíduos do sexo mais filopátrico. O F_{IS} dos machos deve ser mais alto do que o das fêmeas, pois os machos seriam uma mistura de duas populações, residentes e imigrantes e,

devido ao efeito Wahlund, deve mostrar um F_{IS} positivo e um déficit de heterozigotos (Goudet, 2003). Além disso, se a dispersão enviesada por sexo ocorre, os imigrantes tendem a ter valores de A_{IC} mais baixos do que os residentes, por isso espera-se que o valor de mA_{IC} do sexo que mais se dispersa seja menor do que para o sexo mais filopátrico, enquanto o valor de vA_{IC} para o sexo que mais se dispersa deve ser maior, pois os membros do sexo em dispersão incluirão tanto os residentes quanto os imigrantes (Goudet, 2003).

Apesar de não ter sido evidenciada diferenciação por filopatria, foi possível verificar que três golfinhos-pintados-pantropicais amostrados por meio de biópsia na Bacia de Santos em anos diferentes possuem relação de parentesco. Isso indica que essa região deve ser frequentemente utilizada pela espécie, e que indivíduos de um mesmo grupo social podem permanecer ou buscar essa região mais vezes ou por um maior período, assim como foi apresentado no relatório anual do Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS) em que os golfinhos-pintados-pantropicais foram vistos ao longo de todo o ano de amostragem e foram considerados frequentes na região (Petrobras, 2020a). A temperatura de superfície da água nessa região varia entre 20 °C e 25 °C (Petrobras, 2020a) e os golfinhos-pintados-pantropicais foram avistados em uma profundidade média de 3.450 metros e encontrados principalmente nas regiões do talude e oceânicas (Petrobras, 2020b). Outros cetáceos do gênero *Stenella* também são frequentemente observados em outras regiões, como *Stenella frontalis* nas Bahamas (Green et al., 2015), *Stenella longirostris* em Fernando de Noronha (Silva & Da Silva Jr, 2009) e *Stenella coeruleoalba* no Mediterrâneo (Archer & Perrin, 1999).

De acordo com Courbis et al. (2014) o baixo valor de índice de diversidade apresentado pelos golfinhos-pintados-pantropicais do Havaí pode ser devido a existência de uma pequena população reprodutiva neste local. Para os golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*) também foram verificados valores baixos de índices de diversidade para o Havaí e para Fernando de Noronha (Andrews et al., 2010; Faria et al., 2020). Entretanto, ao contrário das populações de golfinhos-pintados-pantropicais e golfinhos-rotadores do Havaí, Fernando de Noronha abrange muitos indivíduos que são estimados diariamente (Silva & Da Silva Jr, 2009). Uma explicação para a baixa diversidade mitocondrial dos golfinhos-rotadores em FN pode ser devido ao gargalo demográfico recente ou

os baixos níveis de imigração impulsionados por forças sociais ou demográficas que levam ao fluxo gênico restrito (promovido principalmente por fêmeas) entre os golfinhos de FN e do restante do litoral brasileiro (Faria et al., 2020).

Foi possível verificar diferenças significativas entre a região Sul/Sudeste e todas as localidades do Oceano Pacífico e entre a região Nordeste e as localidades do ETP e das Ilhas do Havaí. Isso demonstra que a estruturação genética entre o OP e essas regiões pode ocorrer mesmo com o compartilhamento de haplótipos entre as localidades. Os resultados devem ser interpretados com cautela devido ao baixo número amostral.

O haplótipo H3, o qual está distante dos demais haplótipos do Brasil, é compartilhado entre a região Sul/Sudeste, Nordeste e OP e o haplótipo H5, o qual apresenta padrão do tipo estrela, é compartilhado entre a região Nordeste e o OP. É provável que esses compartilhamentos ocorreram antes do fechamento do Istmo do Panamá, sugerindo que esses haplótipos possam ser ancestrais. Portanto, ocorre o indício da presença de pelo menos duas linhagens no SWA, uma antes do fechamento do Istmo do Panamá e outra após o fechamento, sendo provável que a ocupação de *Stenella attenuata* no litoral brasileiro tenha ocorrido do Norte para o Sul e que a região Sul/Sudeste tenha se originado após o fechamento. Após esse evento, o qual ocorreu no início do Plioceno a 3.1-3.5 Ma (Coates et al., 2004), a rota para a dispersão e fluxo gênico entre o Atlântico e o Pacífico foi fechada e o sul da África se tornou a única porta de entrada para o Oceano Atlântico disponível para as biotas tropicais (do Amaral et al., 2018; Jones & Hasson 1985). Esse fato reforça a ideia de que as populações do OP e das regiões do Brasil são estruturadas, assim como já foi evidenciado para outros cetáceos (Huijser et al., 2018; Rosenbaum et al., 2000).

O isolamento genético entre o Oceano Atlântico Norte e a região Sul/Sudeste do Brasil e o provável isolamento entre o Atlântico Norte e a região Nordeste do Brasil podem ocorrer devido ao comportamento adaptado a diferentes tipos de habitat e nichos e ao comportamento das suas presas em virtude dos padrões de movimento de acordo com as condições oceanográficas, como já foi verificado para outros cetáceos (Amaral et al., 2012; Courbis et al., 2014; Genoves et al., 2020). O haplótipo H2 pode ser evidenciado como um haplótipo ancestral do Oceano Atlântico e o compartilhamento do haplótipo H6 e

a distância dos haplótipos H3, H4, H5 e H6 dos demais haplótipos do Oceano Atlântico, indica a presença de pelo menos duas linhagens no Oceano Atlântico.

Evidenciamos que os golfinhos-pintados-pantropicais do SWA possuem alta diversidade genética e que ocorrem ao menos duas populações no litoral brasileiro. Na Baía de Santos, foi evidenciado que os golfinhos-pintados-pantropicais procuram essa área com frequência. Além disso, que os golfinhos do Sul/Sudeste são geneticamente diferentes dos encontrados no Oceano Pacífico e Atlântico Norte e os golfinhos do Nordeste diferentes dos Oceano Pacífico, exceto das Ilhas Salomão e que, com maior número amostral, possa ser confirmada a diferenciação entre o Nordeste do Brasil e as Ilhas Salomão e Atlântico Norte.

REFERÊNCIAS

Aasen, E., & Medrano, J. F. (1990). Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/technology*, 8(12), 1279-1281.

Amaral, A. R., Beheregaray, L. B., Bilgmann, K., Boutov, D., Freitas, L., Robertson, K. M., ... & Möller, L. M. (2012). Seascape genetics of a globally distributed, highly mobile marine mammal: the short-beaked common dolphin (genus *Delphinus*). *PLoS One*, 7(2), e31482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031482>

Amaral, A. R., Sequeira, M., Martínez-Cedeira, J., & Coelho, M. M. (2007). New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers. *Marine Biology*, 151(5), 1967-1976. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0635-y>

Andrews KR, Karczmarski L, Au WWL, Rickards SH, Vanderlip CA, Bowen BW, et al. Rolling stones and stable homes: social structure, habitat diversity and population genetics of the Hawaiian spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Mol Ecol*. 2010; 19: 732–748. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04521.x>

Archer, F. I., & Perrin, W. F. (1999). *Stenella coeruleoalba*. *Mammalian Species*, (603), 1-9.

Arias, M. C., Francisco, F. D. O., & Silvestre, D. (2003). O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica* (GAR Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 305-309.

Avice, J. C. (1994). Conservation genetics. In *Molecular Markers, Natural History and Evolution* (pp. 361-398). Springer, Boston, MA.

Bah, T. (2009). *Inkscape: guide to a vector drawing program* (Digital Short Cut). Pearson Education.

Baker, C. S., Flórez-González, L., Abernethy, B., Rosenbaum, H. C., Slade, R. W., Capella, J., & Bannister, J. L. (1998). Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Marine Mammal Science*, 14(4), 721-737. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1998.tb00758.x>

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Barlow, J. (1984). Reproductive seasonality in pelagic dolphins (*Stenella* spp.): implications for measuring rates. Report of the International Whaling Commission (Special Issue 6), 191-198.

Barragán-Barrera, D. C., Do Amaral, K. B., Chávez-Carreño, P. A., Farías-Curtidor, N., Lancheros-Neva, R., Botero-Acosta, N., ... & Palacios, D. M. (2019). Ecological niche modeling of three species of *Stenella* dolphins in the Caribbean Basin, with application to the Seaflower Biosphere Reserve. *Frontiers in Marine Science*, 6, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00010>

Bérubé, M., & Palsbøll, P. (1996). Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, 5(2), 283-287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00072.x>

Bowen, B. W., Gaither, M. R., DiBattista, J. D., Iacchei, M., Andrews, K. R., Grant, W. S., ... & Briggs, J. C. (2016). Comparative phylogeography of the ocean planet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), 7962-7969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602404113>

Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y., & Burke, T. (1992). Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. Molecular genetic analysis of populations: a practical approach., 225-269.

Caballero, S., Marcos, C. D. O., Sanches, A., & Mignucci-Giannoni, A. A. (2013). Initial description of the phylogeography, population structure and genetic diversity of Atlantic spotted dolphins from Brazil and the Caribbean, inferred from analyses of mitochondrial and nuclear DNA. Biochemical Systematics and Ecology, 48, 263-270.<https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.12.016>

Coates, A. G., Collins, L. S., Aubry, M. P., & Berggren, W. A. (2004). The geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern South America. GSA Bulletin, 116(11-12), 1327-1344. <https://doi.org/10.1130/B25275.1>

Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics, 144(4), 2001-2014.

Courbis, S., Baird, R. W., Cipriano, F., & Duffield, D. (2014). Multiple populations of pantropical spotted dolphins in Hawaiian waters. Journal of Heredity, 105(5), 627-641. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu046>

Cunha, H. A., Medeiros, B. V., Barbosa, L. A., Cremer, M. J., Marigo, J., Lailson-Brito, J., ... & Solé-Cava, A. M. (2014). Population structure of the endangered franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*): reassessing management units. PloS one, 9(1), e85633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085633>

de Oliveira, V. K., Faria, D. M., Cunha, H. A., dos Santos, T. E., Colosio, A. C., Barbosa, L. A., ... & Farro, A. P. C. (2020). Low genetic diversity of the endangered franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in its northernmost, isolated population (FMAIa, Espírito Santo, Brazil). Frontiers in Marine Science. DOI:10.3389/fmars.2020.608276

Di Tullio, J. C., Gandra, T. B., Zerbini, A. N., & Secchi, E. R. (2016). Diversity and distribution patterns of cetaceans in the subtropical southwestern

Atlantic outer continental shelf and slope. PLoS One, 11(5), e0155841.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155841>

do Amaral, K. B., Alvares, D. J., Heinzemann, L., Borges-Martins, M., Siciliano, S., & Moreno, I. B. (2015). Ecological niche modeling of *Stenella* dolphins (Cetartiodactyla: Delphinidae) in the southwestern Atlantic Ocean. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 472, 166-179.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.07.013>

do Amaral, K. B., Amaral, A. R., Fordyce, R. E., & Moreno, I. B. (2018). Historical biogeography of delphininae dolphins and related taxa (Artiodactyla: Delphinidae). Journal of Mammalian Evolution, 25(2), 241-259.
<https://doi.org/10.1007/s10914-016-9376-3>

Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. Molecular ecology resources, 14(1), 209-214. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157>

Escorza-Trevino, S., Archer, F. I., Rosales, M., Lang, A., & Dizon, A. E. (2005). Genetic differentiation and intraspecific structure of Eastern Tropical Pacific spotted dolphins, *Stenella attenuata*, revealed by DNA analyses. Conservation Genetics, 6(4), 587-600.<https://doi.org/10.1007/s10592-005-9013-9>

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources, 10(3), 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

Fain, S. R., & LeMay, J. P. (1995). Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex linked genes. Proc Am Acad Forensic Sci, 1, 34.

Faria, D. M., da Silva Jr, J. M., Pires Costa, L., Rezende Paiva, S., Marino, C. L., Rollo Jr, M. M., ... & Cazerta Farro, A. P. (2020). Low mtDNA diversity in a highly differentiated population of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) from the

Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. PloS one, 15(4), e0230660.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230660>

Frankham, R. I. C. H. A. R. D., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2008). Fundamentos de genética da conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.

Gariboldi, M. C., Túnez, J. I., Failla, M., Hevia, M., Panebianco, M. V., Paso Viola, M. N., ... & Cappozzo, H. L. (2016). Patterns of population structure at microsatellite and mitochondrial DNA markers in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). Ecology and evolution, 6(24), 8764-8776. <https://doi.org/10.1002/ece3.2596>

Genoves, R. C., Fruet, P. F., Botta, S., Beheregaray, L. B., Möller, L. M., & Secchi, E. R. (2020). Fine-scale genetic structure in Lahille's bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus gephyreus*) is associated with social structure and feeding ecology. Marine Biology, 167(3), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3638-6>

Gopal, K., Karczmarski, L., & Tolley, K. A. (2019). Patterns of geographic variation between mitochondrial and nuclear markers in Heaviside's (Benguela) dolphins (*Cephalorhynchus heavisidii*). Integrative zoology, 14(5), 506-526. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12380>

Goudet J (2003) FSTAT version 2. 9. 4: a program to estimate and test population genetics parameters. Updated from Goudet [1995]. Disponível em: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

Green, M. L., Herzing, D. L., & Baldwin, J. D. (2015). Molecular assessment of mating strategies in a population of Atlantic spotted dolphins. Plos one, 10(2), e0118227.

Hoelzel, A. R., Dahlheim, M., & Stern, S. J. (1998). Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. Journal of Heredity, 89(2), 121-128. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.2.121>

Huijser, L. A., Bérubé, M., Cabrera, A. A., Prieto, R., Silva, M. A., Robbins, J., ... & Palsbøll, P. J. (2018). Population structure of North Atlantic and North Pacific sei whales (*Balaenoptera borealis*) inferred from mitochondrial control region DNA sequences and microsatellite genotypes. *Conservation Genetics*, 19(4), 1007-1024. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1076-5>

Jefferson, T. A., Webber, M. A., & Pitman, R. L. (2015). *Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification*, 2nd edn San Diego.

Jones, D. S., & Hasson, P. F. (1985). History and development of the marine invertebrate faunas separated by the Central American Isthmus. In *The great American biotic interchange* (pp. 325-355). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9181-4_13

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>

Kingston, S. E., Adams, L. D., & Rosel, P. E. (2009). Testing mitochondrial sequences and anonymous nuclear markers for phylogeny reconstruction in a rapidly radiating group: molecular systematics of the Delphininae (Cetacea: Odontoceti: Delphinidae). *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-245>

Krützen, M., Valsecchi, E., Connor, R. C., & Sherwin, W. B. (2001). Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. *Molecular Ecology Notes*, 1(3), 170-172. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00065.x>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Leslie, M. S., & Morin, P. A. (2016). Using genome-wide SNPs to detect structure in high-diversity and low-divergence populations of severely impacted eastern tropical Pacific spinner (*Stenella longirostris*) and pantropical spotted dolphins (*S. attenuata*). *Frontiers in Marine Science*, 3, 253. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00253>

Leslie, M. S., & Morin, P. A. (2018). Structure and phylogeography of two tropical predators, spinner (*Stenella longirostris*) and pantropical spotted (*S. attenuata*) dolphins, from SNP data. *Royal Society open science*, 5(4), 171615. <https://doi.org/10.1098/rsos.171615>

Leslie, M. S., Archer, F. I., & Morin, P. A. (2019). Mitogenomic differentiation in spinner (*Stenella longirostris*) and pantropical spotted dolphins (*S. attenuata*) from the eastern tropical Pacific Ocean. *Marine Mammal Science*, 35(2), 522-551. <https://doi.org/10.1111/mms.12545>

Lodi, L., & Borobia, M. (2013). Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação. Technical Books Editora.

Martins, C. C. A., Andriolo, A., Engel, M. H., Kinas, P. G., & Saito, C. H. (2013). Identifying priority areas for humpback whale conservation at Eastern Brazilian Coast. *Ocean & Coastal Management*, 75, 63-71.

Möller, L. M., Wiszniewski, J., Allen, S. J., & Beheregaray, L. B. (2007). Habitat type promotes rapid and extremely localised genetic differentiation in dolphins. *Marine and Freshwater Research*, 58(7), 640-648. <https://doi.org/10.1071/MF06218>

Moreno, I. B., Zerbini, A. N., Danilewicz, D., de Oliveira Santos, M. C., Simões-Lopes, P. C., Lailson-Brito Jr, J., & Azevedo, A. F. (2005). Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 300, 229-240. <https://doi.org/10.3354/meps300229>

Nara, L., de Meirelles, A. C. O., Souto, L. R. A., Silva-Jr, J. M., & Farro, A. P. C. (2017). An Initial Population Structure and Genetic Diversity Analysis for *Stenella clymene* (Gray, 1850): Evidence of Differentiation Between the North and South Atlantic Ocean. *Aquatic Mammals*, 43(5). <https://doi.org/10.1578/AM.43.5.2017.507>

Oliveira, L. R. D., Fraga, L. D., Ott, P. H., Siciliano, S., Lopes, F., Almeida, R., ... & Bonatto, S. L. (2019). Population structure, phylogeography, and genetic diversity of the common bottlenose dolphin in the tropical and subtropical

southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Mammalogy*, 100(2), 564-577.
<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz065>

Oremus, M., Leqata, J., & Baker, C. S. (2015). Resumption of traditional drive hunting of dolphins in the Solomon Islands in 2013. *Royal Society open science*, 2(5), 140524. <https://doi.org/10.1098/rsos.140524>

PALUMBI, S. R.; BAKER, C. S. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, v. 11, n. 3, p. 426-435, 1994.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040115>

Parsons, K. M., Durban, J. W., Claridge, D. E., Herzing, D. L., Balcomb, K. C., & Noble, L. R. (2006). Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Bahamas. *Marine Mammal Science*, 22(2), 276-298. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2006.00019.x>

Perrin, W. F. (2001). *Stenella attenuata*. *Mammalian species*, 2001(683), 1-8.

Perrin, W. F. (2009). Pantropical spotted dolphin: *Stenella attenuata*. In *Encyclopedia of marine mammals* (pp. 819-821). Academic Press.

Perrin, W. F., Scott, M. D., Walker, G. J., & Cass, V. L. (1984). Review of geographical stocks of tropical dolphins (*Stenella* spp. and *Delphinus delphis*) in the eastern Pacific.

PETROBRAS. (2020a) Projeto de monitoramento de cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS: 5º relatório anual – Ciclos 1 a 10. E&P, Volume I: Apresentação e Discussão de Resultados Orientados aos Objetivos.

PETROBRAS. (2020b) Projeto de monitoramento de cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS: 5º relatório anual – Ciclos 1 a 10. E&P, Volume II: Guia de identificação e síntese do conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos.

Pichler, F. B., Dalebout, M. L., & Baker, C. S. (2001). Nondestructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw. *Molecular Ecology Notes*, 1(1-2), 106-109. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00027.x>

Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of heredity*, 90(4), 502-503. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>

Raymond, M. (1995). GENEPOP (vers 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity.*, 86, 248-249.

Rooney, A. P., Merritt, D. B., & Derr, J. N. (1999). Brief communication. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Heredity*, 90(1), 228-231.

Rosel, P. E. (2003). PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation Genetics*, 4(5), 647-649.

Rosenbaum, H. C., Brownell Jr, R. L., Brown, M. W., Schaeff, C., Portway, V., White, B. N., ... & DeSalle, R. (2000). World-wide genetic differentiation of Eubalaena: questioning the number of right whale species. *Molecular Ecology*, 9(11), 1793-1802. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01066.x>

Ross, H. A., Lento, G. M., Dalebout, M. L., Goode, M., Ewing, G., McLaren, P., ... & Baker, C. S. (2003). DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. *Journal of Heredity*, 94(2), 111-114. <https://doi.org/10.1093/jhered/esg027>

Schnell, G. D., Douglas, M. E., & Hough, D. (1986). Geographic patterns of variation in offshore spotted dolphins (*Stenella attenuata*) of the eastern tropical Pacific Ocean. *Marine Mammal Science*, 2(3), 186-213. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1986.tb00040.x>

Shinohara, M. (1997). Microsatellites in the bottlenose dolphin *Trusiops truncatus*. *Molecular Ecology*, 6, 695-696. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00231.x>

Silva, F. J. D. L., & Da Silva Jr, J. M. (2009). Circadian and seasonal rhythms in the behavior of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). *Marine Mammal Science*, 25(1), 176-186.

Valentin J.L. (2001). The Cabo Frio Upwelling System, Brazil. In: Seeliger U., Kjerfve B. (eds) *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Ecological

Studies (Analysis and Synthesis), vol 144. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-04482-7_8

Valsecchi, E., & Amos, W. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*, 5(1), 151-156.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00301.x>

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

Viricel, A., & Rosel, P. E. (2014). Hierarchical population structure and habitat differences in a highly mobile marine species: the Atlantic spotted dolphin. *Molecular ecology*, 23(20), 5018-5035. <https://doi.org/10.1111/mec.12923>

Waples, R. S. (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 121(2), 379-391. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.2.379>

Waples, R. S., & Do, C. H. I. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary applications*, 3(3), 244-262. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00104.x>

Yao, C. J., Chou, L. S., & Yang, Y. J. (2004). Population genetic structure of pantropical spotted dolphin, *Stenella attenuata*, in waters of Taiwan and South China Sea based on mitochondrial DNA control region sequences. *TAIWANIA-TAIPEI*, 49, 80-94. [https://doi.org/10.6165/tai.2004.49\(2\).80](https://doi.org/10.6165/tai.2004.49(2).80)

Zerbini, A. N., & Kotas, J. E. (1998). A note on cetacean bycatch in pelagic driftnetting off southern Brazil. *Report of the International Whaling Commission*, 48, 519-524.

ANEXOS

Anexo 1. Nome dado aos haplótipos neste estudo, nomenclatura dos háplótipos nos outros estudos, código de acesso e referências das sequências D-loop obtidas no GenBank da espécie *Stenella attenuata*.

Numeração haplótipos neste estudo	Nomenclatura dos haplotípos nos outros estudos	Acesso no Genbank	Referências
HAP2	HAP 06; HAP 15; HAP 21; HAP 41; HAP 58; HAP 91; HAP 94; HAP 104; HAP 106 Hap3 SI13001; SI13007; SI13014	DQ150139.1; DQ150148.1; DQ150154.1; DQ150174.1; DQ150191.1; DQ150224.1; DQ150227.1; DQ150237.1; DQ150239.1; GQ852569.1; KP756634.1; KP756632.1; KP756631.1	Escorza-Treviño et al., 2005 Coubis et al., 2014 Oremus et al., 2015
HAP3	SA2	GQ504120.1	Kingston et al., 2009
HAP4	HAP 17	DQ150150.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP5	SA4	GQ504122.1	Kingston et al., 2009
HAP8	SA1	DQ845442.1	Kingston et al., 2009
HAP9	SA3	GQ504121.1	Kingston et al., 2009
HAP10	SA5	DQ845443.1	Kingston et al., 2009
HAP11	SA6	GQ504123.1	Kingston et al., 2009
HAP12	SA7	GQ504124.1	Kingston et al., 2009
HAP13	HAP 12; HAP 47; HAP 62	DQ150145.1; DQ150180.1; DQ150195.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP14	HAP 22	DQ150155.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 15	HAP 23	DQ150156.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 16	HAP 25; HAP 64 SI13011; SI13005	DQ150158.1; DQ150197.1 KP756638.1; KP756637.1	Escorza-Treviño et al., 2005 Oremus et al., 2015
HAP 17	HAP 26	DQ150159.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 18	HAP 27 SI13006	DQ150160.1 KP756635.1	Escorza-Treviño et al., 2005 Oremus et al., 2015
HAP 19	HAP 32	DQ150165.1	
HAP 20	HAP 33 Hap 11	DQ150166.1 GQ852577.1	Escorza-Treviño et al., 2005 Coubis et al., 2014
HAP 21	HAP 02; HAP 34; HAP 95	DQ150167.1; DQ150167.1; DQ150228.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 22	HAP 35	DQ150168.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 23	HAP 43; HAP 93	DQ150176.1; DQ150226.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 24	HAP 51	DQ150184.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 25	HAP 52	DQ150185.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 26	HAP 53	DQ150186.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 27	HAP 54 SI13003	DQ150187.1 KP756634.1	Escorza-Treviño et al., 2005 Oremus et al., 2015
HAP 28	HAP 109	DQ150242.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 29	HAP 111	DQ150244.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 30	HAP 31; HAP 39; HAP 48; HAP 90	DQ150164.1; DQ150172.1; DQ150181.1; DQ150223.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 31	HAP 36	DQ150169.1	Escorza-Treviño et al., 2005

HAP 32	HAP 37	DQ150170.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 33	HAP 38	DQ150171.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 34	HAP 42	DQ150175.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 35	HAP 45	DQ150178.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 36	HAP 46	DQ150179.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 37	HAP 56	DQ150189.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 38	HAP 19; HAP 57; HAP 88	DQ150152.1; DQ150190.1; DQ150221.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 39	HAP 59	DQ150192.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 40	HAP 77; HAP 107	DQ150210.1; DQ150240.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 41	HAP 108	DQ150241.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 42	HAP 01	DQ150134.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 43	HAP 04; HAP 05; HAP 82;	DQ150137.1; DQ150138.1; DQ150215.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 44	HAP 07	DQ150140.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 45	HAP 108; HAP 10	DQ150141.1; DQ150143.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 46	HAP 9	DQ150142.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 47	HAP 11	DQ150144.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 48	HAP 13	DQ150146.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 49	HAP 14	DQ150147.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 50	HAP 16	DQ150149.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 51	HAP 18	DQ150151.1	Escorza-Treviño et al., 2005
	Hap5	GQ852571.1	Courbis et al., 2014
HAP 52	HAP 28	DQ150161.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 53	HAP 29	DQ150162.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 54	HAP 30	DQ150163.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 55	HAP 03	DQ150136.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 56	HAP 60	DQ150193.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 57	HAP 65	DQ150198.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 58	HAP 66	DQ150199.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 59	HAP 67	DQ150200.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 60	HAP 68; HAP 99	DQ150201.1; DQ150232.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 61	HAP 71	DQ150204.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 62	HAP 72	DQ150205.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 63	HAP 73	DQ150206.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 64	HAP 74	DQ150207.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 65	HAP 75	DQ150208.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 66	HAP 76	DQ150209.1	Escorza-Treviño et al., 2005
	Hap9	GQ852575.1	Courbis et al., 2014
	SI13013	KP756627.1	Oremus et al., 2015
HAP 67	HAP 78	DQ150211.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 68	HAP 79	DQ150212.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 69	HAP 83	DQ150216.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 70	HAP 85	DQ150218.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 71	HAP 86	DQ150219.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 72	HAP 87	DQ150220.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 73	HAP 89	DQ150222.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 74	HAP 92	DQ150225.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 75	HAP 96	DQ150229.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 76	HAP 98	DQ150231.1	Escorza-Treviño et al., 2005

HAP 77	HAP 100	DQ150233.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 78	HAP 101	DQ150234.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 79	HAP 105	DQ150238.1	Escorza-Treviño et al., 2005
HAP 80	Hap1	GQ852567.1	Courbis et al., 2014
HAP 81	Hap7	GQ852573.1	Courbis et al., 2014
HAP 82	Hap4	GQ852570.1	Courbis et al., 2014
HAP 83	Hap12	GQ852578.1	Courbis et al., 2014
HAP 84	Hap2	GQ852568.1	Courbis et al., 2014
HAP 85	Hap6	GQ852572.1	Courbis et al., 2014
HAP 86	SI13009	KP756630.1	Oremus et al., 2015
HAP 87	SI13012; SI13010	KP756640.1; KP756639.1	Oremus et al., 2015
HAP 88	SI13004	KP756636.1	Oremus et al., 2015

Anexo 2. Lista com a identificação, localidade, tipo de coleta, tecido coletado, sexo e colaboradores dos indivíduos da espécie *S. attenuata* amostrados no litoral brasileiro.

Identificação	Espécie	Localidade	Coleta	Tecido	Sexo	Colaboradores
Sat 1	<i>S.attenuata</i>	Fernando de Noronha (FN)	Encalhe	Fígado	Macho	CMA
Sat 2	<i>S.attenuata</i>	Fernando de Noronha (FN)	Encalhe	Músculo	Macho	PGR
Sat 3	<i>S.attenuata</i>	Rio Grande do Sul (RS)	Encalhe	Músculo	Macho	GEMARS
Sat 4	<i>S.attenuata</i>	Ceará (CE)	Encalhe	Músculo	Macho	AQUASIS
Sat 5	<i>S.attenuata</i>	Fernando de Noronha (FN)	Encalhe	Músculo	Macho	PGR
Sat 6	<i>S.attenuata</i>	Cacimbas, Linhares (ES)	Encalhe	Músculo	Macho	IBJ
Sat 7	<i>S.attenuata</i>	Quixaba, Aracati (CE)	Encalhe	Pele	Fêmea	AQUASIS
Sat 8	<i>S.attenuata</i>	Praia dos Estevão, Aracati (CE)	Encalhe	Pele	Macho	AQUASIS
Sat 9	<i>S.attenuata</i>	Rio de Janeiro (RJ)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 10	<i>S.attenuata</i>	Rio de Janeiro (RJ)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 11	<i>S.attenuata</i>	Rio de Janeiro (RJ)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 12	<i>S.attenuata</i>	Rio de Janeiro (RJ)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 13	<i>S.attenuata</i>	Rio de Janeiro (RJ)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 14	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 15	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 16	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 17	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 18	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 19	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 20	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 21	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 22	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 23	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 24	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Fêmea	PMC-BS
Sat 25	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 26	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 27	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS
Sat 28	<i>S.attenuata</i>	São Paulo (SP)	Biópsia	Pele	Macho	PMC-BS