

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Thaís Leal Silva

Estruturação populacional e diversidade genética de golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) da Baía de Santos, Atlântico Sul

Florianópolis

2021

Thaís Leal Silva

Estruturação populacional e diversidade genética de golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) da Bacia de Santos, Atlântico Sul

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Ana Paula Borges de C. Costa
Coorientador: Prof. Dr. Paulo César Simões-Lopes

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Thais Leal

Estruturação populacional e diversidade genética de golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) da Bacia de Santos, Atlântico Sul / Thais Leal Silva ; orientador, Ana Paula Borges de C. Costa, coorientador, Paulo César Simões-Lopes, 2021.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Genética de Populações de Cetáceos . 3. Ecologia Molecular. 4. Genética da Conservação . I. Borges de C. Costa, Ana Paula . II. Simões Lopes, Paulo César . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Thaís Leal Silva

Estruturação populacional e diversidade genética de golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) da Baía de Santos, Atlântico Sul

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 16 de setembro de 2021.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Ana Paula Borges de C. Costa
Orientadora
University of Glasgow

Prof. Dr. Paulo César Simões-Lopes
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Ana Lúcia Cypriano de Souza
Avaliadora
Socioambiental Consultores Associados

Profa. Dra. Luisa Damazio Rona Pitaluga
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Norma Machado da Silva
Avaliadora Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha mãe, que assim como o mar,
sempre me fez desejar mergulhos profundos.

AGRADECIMENTOS

Lendo um livro de provocações filosóficas me deparei com um provérbio africano que dizia “Se quiser ir apenas rápido, vá sozinho, se quiser ir longe, vá com alguém”. Este trabalho e minha alegria de viver a UFSC só foi possível porque fui com alguém, alguns tantos (muitos citados ao longo destes agradecimentos, outros nas lembranças do coração). Assim, gratidão à T-O-D-A-S as pessoas que de certa forma me auxiliaram a desenvolver este trabalho, seja em conversas rápidas, escutando desabafos, passando contatos importantes, inspirando ou torcendo por mim. Também agradeço a todos que dividiram comigo a caminhada de ser UFSC, seja uma divisão lado a lado ou só escutando minhas histórias oriundas desse universo. É bom e feliz ir longe e acompanhada.

Agradeço, do fundo do meu coração, a quem dediquei está escrita, minha mãezinha. Gratidão a todo teu esforço, suporte e amor para me fazer grande, capaz e confiante de que eu posso tudo que sonhamos juntas. Todas alegrias, momentos, aprendizados e pessoas que cultivei nessa jornada foi possível porque você forneceu todo suporte que eu precisava para trilhar meus caminhos. Te amo.

Gratidão à minha família de Sarandi, minha Dinda, Michi, Franci, Lu e Rick. É incrível saber que tenho vocês como família e, apesar da distância que minhas escolhas trouxeram a nós, é sempre bom voltar para casa e sentir o conforto e amor de estar do lado de vocês. Sou imensamente feliz pelo apoio de sempre e pelos sentimentos bons que temos uns pelos outros. Gratidão as “crianças” dessa família, Júlia, Lívia, Laís e Gui, vocês são as pessoas que mais tenho desejo de inspirar, ensinar e incentivar a voar, os quatro me motivam ao desafio de novas conquistas e ao desejo de mostrar-lhes como esse mundo é grandão e podemos ir longe! Amo cada um de vocês.

Gratidão ao meu Dindo, que esteve do meu lado na minha primeira mudança a Florianópolis (e outros tantos momentos), e hoje você está comemorando essa conquista dentro do meu coração. Trabalhar com o mar me faz sentir próxima de ti e é com ele que quero trabalhar para o restinho da minha vida. A saudade que sinto tua é do tamanho do oceano e a felicidade que sinto no mar é do tamanho da felicidade que eu via você sentido nele. Obrigada por tantas lembranças, você vive em cada mergulho meu.

Gratidão à minha família Leal e Giovanini, sentir vocês torcendo por mim me alegra e me dá ânimo. Agradeço, em especial, minha Tia Goreti e Tio Zé, que abriram as portas da sua casa para me receber em Floripa, tornando essa experiência de viver a UFSC possível. O apoio e amor que tive de vocês foi importante para eu aprender viver longe das pessoas que eu amava

e fundamental para eu querer mais e mais. Me mostrando que ir longe, conhecer o novo, sonhar grande é bom, mesmo quando se tem amores e raízes firmes.

Gratidão ao meu namorado, Gedi, por se fazer presente mesmo na distância, apoiar meus sonhos, me dar amparo e força, escutar meus desabafos e medos em relação a esta pesquisa e sempre mostrar como eu seria capaz de enfrentar qualquer dilema que aparecesse.

Gratidão à UFSC e seu universo de possibilidades, aprendizados e qualidade de ensino. Eu sempre falo, a Thaís que está saindo da UFSC é muito melhor para o mundo do que a Thaís que entrou. Viver a Universidade Federal foi muito além de conhecimentos e oportunidades acadêmicas, foi político, social e afetuoso. Também foi diverso, foi plural, foi imensa transformação, conexão e autoconhecimento. Gratidão eterna a UFSC e a todos os encontros que tu me proporcionaste.

E assim, agradeço aos meus amigxs da turma 15.2, Marcos, Renato, Bea, Thaís Assis, Bruno e Rafa Carvalho, sou grata por todas nossas trocas, aprendizados, festas, momentos no corredor do MIP ou café no Labitel. Agradeço especialmente ao Marcos, por ter sido meu grande parceiro para encarar os desafios do final do curso. Gratidão sem tamanho aos meus grandes e principais encontros da 15.2, Ana, Moni e Gabi, vocês coloriram essa minha jornada, torceram por mim, vibraram comigo e me levantaram sempre que necessário, foi incrível viver estes seis anos ao lado de vocês. Amo nossas histórias, nosso companheirismo, nossas evoluções, aprendizados e cada uma de vocês. Sou imensamente grata por dividir e somar ao lado de três pessoas que me inspiram e me ensinam tanto! Amiga Ana, agradeço especialmente a você pelo dia em que tu fizeste minha matrícula no mar. Este trabalho e meu encontro e amor pelas baleias e golfinhos só foi possível porque você me incentivou a estagiar no IBJ, dividindo comigo essa grande paixão. Torço para que a gente ainda viva muitos momentos trabalhando juntas, no mar e com esses bichos lindos.

Gratidão aos amigxs da UFSC e do Interbio, Lary (que também auxiliou na elaboração deste trabalho), Luiz, Isa, Vitória, Fernanda, João (que inclusive muito ajudou a desvendar os mistérios do R durante a execução de todos os mapas que estão por vir), Carol, Raquel e Mayk. Foi um privilégio dividir aprendizados, afetos, torcida mútua e diversos momentos de muita festa e alegria com todos vocês. Gratidão à Moni Morena por todo incentivo, torcida, apoio, trocas, importantes momentos que vive nesta jornada e por sanar dúvidas de genética que tive ao longo deste trabalho.

Gratidão aos amigos da vida, Carol, Liege, Anna, Rafa, Gui e Amanda. Vocês estiveram ao meu lado e torcendo por mim desde sempre. Em especial a Carol e Rafa, que são meus grandes parceiros e sinto muita saudade de tê-los no meu cotidiano.

Gratidão ao Projeto Baleia Jubarte, por ter sido perfeito como cartão-visita para eu querer trabalhar com o mar e os cetáceos. Os momentos que vivi como estagiária estão guardados entre as memórias mais gostosas e os aprendizados mais lindos. Gratidão à Isa e ao Serjão, vocês foram ótimos chefes e incríveis incentivadores. Gratidão as estagiárias da temporada de 2019, foi um privilégio dividir com vocês essa experiência e todos os momentos embarcadas ou na varanda de casa. Gratidão especial a Luíse, que foi meu maior presente deste estágio e com quem vivi os melhores momentos da minha estadia na Bahia. Também esteve comigo durante todo o processo de produção desse trabalho, me escutando, aconselhando, trocando ideias e dando força. Sei que tudo isso é só o começo de muita coisa que ainda viveremos, sou feliz demais pela nossa amizade.

Gratidão ao PET Biologia e aos petianos que tive o privilégio de trabalhar junto, ser petiana possibilitou crescimento profissional, novos conhecimentos e muitos momentos felizes.

Gratidão ao Laboratório de Protozoologia onde fui IC, foi uma época onde adquiri muitos conhecimentos, diversos destes utilizados durante este trabalho, criticidade e curiosidade científica. Agradeço a todos que viveram comigo esta fase e muito me ensinaram, especialmente, a Adri e Abadio.

Gratidão ao Paulinho que vem me inspirando desde que vi sua primeira aula. Seu jeito divertido, leve e perspicaz de ensinar e viver a ciência gerava uma motivação gigante, que diversas vezes foi importante para continuar acreditando na profissão que escolhi. Além disso, com carinho, me escutou em um momento onde decidir o que fazer do TCC era meu maior dilema e me levou até a Ana, que foi o match perfeito de orientadora. Vocês dois foram incríveis orientadores e fundamentais para a produção desse trabalho, eu aprendi muito nessa trajetória e fiquei imensamente grata de poder fazer ciência ao lado de dois cientistas tão humanos, amantes de suas artes científicas, cientificamente coerentes e compreensivos. Um agradecimento especial a Ana, por aceitar a orientação deste trabalho sem nem ter me conhecido pessoalmente e por ter sanado tantas dúvidas da jovem cientista que resolveu mergulhar num universo novo. Você me ajudou a fazer deste trabalho uma semente para eu querer mais da ciência, mais de mim, mais dos cetáceos. Foi ótimo te ter ao lado nessa jornada!

Gratidão ao PMC-BS por disponibilizar os dados para este trabalho.

Gratidão aos Professores e Professoras do Curso de Ciências Biológicas por todos os ensinamentos e inspirações.

Gratidão a Banca Examinadora pela disponibilidade, interesse e colaboração ao trabalho.

Por fim, gratidão a natureza, ao mar e aos cetáceos.

“Entrei num mar inédito, fui ao fundo para que pudesse aguentar a trolha que se anunciava. Ondas maiores vieram, passei pela primeira sem sacode. Um homem surge ao meu lado e, enquanto uma mais gigante ainda se aproxima, diz: É só mergulhar fundo menina!”

(LETRUX, 2020)

RESUMO

Conceito de genética de populações, biologia molecular e ecologia, são utilizados pela genética conservacionista e fornecem estimativas da diversidade genética e estruturação populacional, auxiliando a criação de políticas conservacionistas. A genética da conservação tem sido comumente aplicada a estudos populacionais de cetáceos. Por apresentarem dependência total do ambiente aquático, alta capacidade de deslocamento, e permanecerem submersos por períodos longos, cetáceos são animais de difícil estudo. Assim, ainda há muitas questões em aberto para esse táxon, em especial para as populações do Oceano Atlântico Sul, incluindo diversidade genética e estruturação populacional. O golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) é um exemplo de cetáceo que tem suas características genéticas pouco estudadas para o Atlântico Sul. Esta espécie apresenta distribuição pantropical, geralmente associada a águas pelágicas e ilhas oceânicas. No Brasil, ela é conhecida pela sua grande população no Arquipélago de Fernando de Noronha, apesar de estar distribuída ao longo de toda costa leste da América do Sul. O alto índice de filopatria, a baixa diversidade genética, e a alta diferenciação da população de *S. longirostris* de Noronha em relação a outras regiões do globo indicam a vulnerabilidade desta população insular. Contudo, pouco se sabe sobre a diversidade genética dos golfinhos-rotadores não-insulares da costa brasileira e quais suas relações genéticas com as populações de Fernando de Noronha e do Atlântico Norte Ocidental. Dessa forma, este estudo avaliou a diversidade e estruturação genética de *S. longirostris* (i.e., não-insulares) da Bacia de Santos (Atlântico Sul) e avaliou a relação genética entre este grupo-de-estudo e o de Fernando de Noronha e Atlântico Norte Ocidental, por meio de nove loci de microssatélites e região controle do DNA mitocondrial. Os resultados mostraram ausência de estruturação populacional e alta diversidade genética para os golfinho-rotadores da Bacia de Santos. Observou-se também alta diferenciação entre a população não-insular (Bacia de Santos) e a insular (Fernando de Noronha) no Atlântico Sul Ocidental, além de alta proximidade genética entre os golfinhos-rotadores da Bacia de Santos e os do Atlântico Norte Ocidental.

Palavras-chave: microssatélites, DNA mitocondrial, conservação, cetáceos

ABSTRACT

The concepts of population genetics, molecular biology, and ecology are employed by conservation genetics and indicate genetic diversity and population structure, assisting in the creation of conservation policies. Commonly, conservation genetics have been applied to population studies of cetaceans. Cetaceans are difficult to study since they totally dependent on the aquatic environment, are highly mobile and remain submerged for long periods. Thus, there are still many questions about this taxon, particularly for the populations from South Atlantic Ocean, including genetic diversity and population structure. The spinner dolphin (*Stenella longirostris*) is an example of cetacean that has its genetic features unknown in the South Atlantic. This species has a pantropical distribution, normally associated with pelagic waters and oceanic islands. In Brazil, *S. longirostris* is known for its huge population at Fernando de Noronha Archipelago, although it is distributed along the entire east coast in the South America. The high philopatry, low genetic diversity, and high population differentiation of *S. longirostris* from Noronha in relation to other worldwide regions indicate the vulnerability of this insular population. However, little is known about the genetic diversity of the non-insular spinner dolphins of the Brazilian coast and its genetic relationship with the Fernando de Noronha and northwestern Atlantic populations. Therefore, this study evaluated the genetic diversity and structure of *S. longirostris* (i.e., non-insular) from Bacia de Santos (South Atlantic) and evaluated the genetic relationship between this study group and the Fernando de Noronha and northwestern Atlantic populations, through the use of nine microsatellite loci and the mitochondrial DNA control region. The results showed the lack of population structure and high genetic diversity for the spinner dolphins from Bacia de Santos. There was also high differentiation between the non-insular population (Bacia de Santos) and the insular population (Fernando de Noronha) in the South Atlantic, as well as a higher genetic proximity between the spinner dolphins from Bacia de Santos and the northwestern Atlantic.

Keywords: Microsatellite. Mitochondrial DNA. Conservation. Cetaceans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Stenella longirostris</i> (golfinho-rotador).....	21
Figura 2 - Bacia de Santos.....	24
Figura 3 - Local da amostragem.....	25
Figura 4 - Estimativa do melhor K pelo método estatístico L(K).....	31
Figura 5 - Estimativa do melhor K pelo método estatístico ΔK	33
Figura 6 - Análise Bayesiana dos golfinhos-rotadores da Bacia de Santos.....	34
Figura 7 - Rede haplotípica pelo método median-joining network para os 29 haplótipos de golfinhos-rotadores da Bacia de Santos.....	35
Figura 8 - Rede haplotípica pelo método median-joining network para os 30 haplótipos dos golfinhos-rotadores do Atlântico Ocidental.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos haplótipos disponíveis no GenBank	29
Tabela 2 - Diversidade genética dos golfinhos-rotadores da Baía de Santos para sete loci de microssatélites	34
Tabela 3 - Nome dos haplótipos do presente estudo	36
Tabela 4 - Valores de diferenciação genética entre as populações de golfinhos-rotadores do Atlântico Ocidental, para as 225 sequências de mtDNA (372 pb).....	38
Tabela 5 - Diversidade genética para a região controle do mtDNA e para loci de microssatélites para diferentes localidades do Oceano Atlântico Ocidental.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMOVA Análise de Variância Molecular

AN Atlântico Norte

ANO Atlântico Norte Ocidental

BS Bacia de Santos

D-loop Região controle do DNA mitocondrial

DNA Ácido desoxirribonucléico

dNTP's Desoxirribonucleotídeo5'' fosfato

F_{is} Coeficiente de endogamia

FN Fernando de Noronha

F_{st} Índice de fixação

GM Golfo do México

H_e Heterozigosidade esperada

H_o Heterozigosidade observada

HWE Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IUCN União Internacional para Conservação da Natureza

mtDNA DNA mitocondrial

pb Pares de base

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PMC-BS Projeto de monitoramento de cetáceos da Bacia de Santos

S. l. Stenella longirostris

S. longirostris Stenella longirostris

Taq *Thermus aquaticus*

Φ_{st} Índice de fixação (específico para dados de sequência)

LISTA DE SÍMBOLOS

- Δ Delta
- ϕ Letra grega Phi
- K Número de populações

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 HIPÓTESE	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS	24
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E SEXAGEM MOLECULAR	25
4.3 ANÁLISES DOS GENÓTIPOS DE MICROSSATÉLITES	26
4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE mtDNA	28
4.5 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE OS GOLFINHOS-ROTADORES DA BACIA DE SANTOS E DE OUTRAS LOCALIDADES DO ATLÂNTICO OCIDENTAL	28
5 RESULTADOS	30
5.1 CONTROLE DE QUALIDADE	30
5.2 ANÁLISES GENÉTICAS DE GOLFINHOS-ROTADORES DA BACIA DE SANTOS	30
5.3 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE OS GOLFINHOS-ROTADORES DA BACIA DE SANTOS COM OUTRAS LOCALIDADES DO ATLÂNTICO OCIDENTAL	35
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A genética de populações trata de princípios genéticos, seus conceitos e aplicações em populações naturais de organismos. Assim, integra fundamentos de herança mendeliana com forças que afetam mudanças na frequência de alelos, criando uma perspectiva evolutiva sobre as espécies ao longo do tempo (HARTL; CLARK, 2010; MAYR, 1963). A era da genômica possibilitou o diálogo entre a teoria e os dados empíricos da genética de populações, catalisando importantes avanços na área (CASILLAS; BARBADILLA, 2017). Métodos sofisticados, como o uso de marcadores moleculares, vem sendo desenvolvidos para auxiliar na análise de dados que visam responder questões genéticas relacionadas à estruturação, diversidade, e processos populacionais (OUBORG, 2010).

Pesquisas genéticas com marcadores moleculares têm sido realizadas com várias espécies animais (e.g., ANDREWS et al., 2010; COSTA et al., 2021; CYPRIANO-SOUZA et al., 2016; ERNEST et al., 2014; HOHENLOHE et al., 2010). Marcadores moleculares são proteínas ou sequências de DNA polimórficas capazes de revelar variações no genoma, mostrando várias linhagens genéticas dentro da mesma população (BEEBEE; ROWE, 2004). A região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) e os microssatélites (DNA nuclear) são exemplos de marcadores baseados em sequências de DNA (i.e., marcadores genéticos). Em animais, o mtDNA é uma molécula circular com milhares de cópias por célula. É considerado um DNA não-recombinante já que é transmitido de modo simples (herança maternal), geralmente com alto polimorfismo intraespecífico na região controle (D-loop), e é amplamente utilizado em pesquisas genéticas com populações animais devido a essas características (AVISE et al., 1987; FREELAND; PETERSEN, 2011; ZHANG; LAN; SHI, 1993). O estudo de sua região controle é útil para identificar estrutura e diversidade populacional dentro de uma metapopulação (i.e., entre subpopulações) devido à elevada variabilidade nucleotídica causada pela alta taxa de substituições de base (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003; MORITZ, 1994). Quanto aos microssatélites, também são bons marcadores para definir a estrutura populacional, variabilidade e perfil genético (GOLDSTEIN et al., 1995), principalmente porque tratam-se de sequências pequenas e repetidas do DNA nuclear, de herança biparental, e são altamente polimórficos (JARNE; LAGODA, 1996).

Análises genéticas podem esclarecer aspectos importantes da biologia das populações e espécies para fins de caracterizar a situação de conservação desses grupos e auxiliar no desenvolvimento de medidas de preservação eficazes (SANTOS; LACERDA; REDONDO, 2004). Mesclando conceitos de genética de populações, biologia molecular e ecologia

(OUBORG, 2010), a genética da conservação fornece estimativas de tamanho efetivo, diversidade genética, estrutura e dinâmica populacional (HOELZEL, 1992). Esse campo da genética tem sido particularmente útil em estudos populacionais de cetáceos (e.g., ATTARD et al., 2018; CABALLERO et al., 2013; FARIA et al., 2020; MENDEZ; ROSENBAUM; BORDINO, 2008).

Os cetáceos são divididos em dois grupos, os mysticetos, que compreendem as baleias com barbatanas, e os odontocetos, que compreendem as baleias dentadas, golfinhos e toninhas. Os odontocetos estão divididos em 10 famílias, 34 gêneros e 77 espécies (COMMITTEE ON TAXONOMY, 2021). Dentre estas famílias, Delphinidae é a mais diversificada, contabilizando 37 espécies de golfinhos que ocupam uma grande variedade de ecossistemas aquáticos (COMMITTEE ON TAXONOMY, 2021; LEDUC; PERRIN; DIZON, 1999).

O gênero *Stenella* (Gray, 1866) está incluído na família Delphinidae e é um dos grupos mais abundantes dentre os delfínídeos, com cinco espécies: *S. longirostris*, *S. attenuata*, *S. coeruleoalba*, *S. clymene*, e *S. frontalis*. As três primeiras estão distribuídas em águas tropicais, subtropicais e temperadas dos três grandes oceanos, já as duas últimas são espécies endêmicas do Oceano Atlântico (COMMITTEE ON TAXONOMY, 2021; PERRIN, 1975, 1998, 2002). Mais especificamente, o golfinho-rotador, *S. longirostris* (Gray, 1828), possui uma distribuição pantropical, habitando águas pelágicas, podendo estar associado às ilhas oceânicas, como ocorre no Pacífico Central e Ocidental (e.g., Havaí, Polinésia Francesa), e eventualmente à águas costeiras, o que é visto no Pacífico Oriental, Oceano Índico e Sudeste Asiático (LESLIE; ARCHER; MORIN, 2018; PERRIN; GILPATRICK-JR, 1994; PERRIN, 1998; PERRIN; DOLAR; ROBINEAU, 1999). Quando associada a ilhas oceânicas, esta espécie pode apresentar hábitos de alimentação noturnos em águas mais profundas e de descanso em regiões protegidas de águas rasas (BENOIT-BIRD; AU, 2003; DOLAR et al., 2003). Golfinhos-rotadores são facilmente reconhecidos por seus saltos giratórios, rostro alongado, sua coloração tricolor (dorso com uma capa cinza escura, laterais cinza claras e ventre branco), e por conter uma listra preta entre a maxila e os olhos, se estendendo até o início da nadadeira peitoral (Figura 1). Vivem em grupos, organizados socialmente por fusão-fissão, que variam muito de tamanho, podendo apresentar agrupamentos de alguns indivíduos a mais de mil (NORRIS et al., 1994; PERRIN, 2009). Agrupamentos com outras espécies de mamíferos marinhos também já foram registrados (e.g. *S. attenuata*, *Dugong dugon*) (PSARAKOS; HERZING; MARTEN, 2003; KISZKA, 2007).

Figura 1 - *Stenella longirostris* (golfinho-rotador).



Fonte: Nature Picture Library – Doug Perrine

Quatro subespécies de *S. longirostris* foram reconhecidas até o momento (COMMITTEE ON TAXONOMY, 2021) devido às diferenças morfológicas no crânio, tamanho corporal, coloração, formato da nadadeira dorsal e distribuição. Duas dessas subespécies são endêmicas do Oceano Pacífico Oriental Tropical: golfinho-rotador oriental (*S. l. orientalis*), habitando águas mais oceânicas, e golfinho-rotador da América Central (*S. l. centroamericana*), habitando águas mais costeiras. O golfinho-rotador anão (*S. l. roseiventris*) é uma subespécie endêmica do Oceano Índico, habitando águas rasas no sudeste da Ásia Central (PERRIN, 1990; PERRIN; DOLAR; ROBINEAU, 1999). Já *S. l. longirostris* é a subespécie nominal de golfinho-rotador (*S. longirostris*), originalmente descrito por Gray (1828) e de distribuição pantropical.

O golfinho-rotador (*S. longirostris* ou *S. l. longirostris*) está distribuído ao longo do Oceano Atlântico Ocidental, com seu limite de distribuição ao sul influenciado pela presença da corrente Fria das Malvinas (38°S), enquanto sua distribuição boreal está limitada a aproximadamente 40°N (JEFFERSON et al., 2007), já que a espécie prefere águas mais quentes (DO AMARAL et al., 2015; MORENO et al., 2005). No Atlântico Norte os golfinhos-rotadores são conhecidos pelas suas populações do Golfo do México e do Atlântico Norte Ocidental (ANDREWS et al., 2013). Já no Brasil, golfinhos-rotadores são encontrados entre as latitudes 1°S e 28.5°S, ao longo da plataforma continental (de aproximadamente 800 mil km² de extensão; AB'SÁBER, 2001, apud JOLY et al. 2011), e em profundidades de até 1000 metros,

onde a temperatura varia de 24°C à 28°C (DO AMARAL et al., 2015). Perto de seu limite norte de distribuição em águas brasileiras está o Arquipélago de Fernando de Noronha (3°51'13.71"S; 32°25'25.63"O), considerado abrigo natural para a espécie no país por ser área de descanso, reprodução, cuidado da prole e refúgio de predadores (SILVA-JR, 1996 apud SILVA-JR, 2005), e onde encontram-se grupos com média de 600 indivíduos diariamente (SILVA; DA SILVA, 2009). Estudos genéticos utilizando a região controle do mtDNA para esta população insular, revelaram baixa diversidade genética, e alta diferenciação e isolamento em relação à outras populações de golfinhos-rotadores ao redor do mundo (FARIA et al., 2020). Estes achados sugerem uma possível vulnerabilidade dessa população insular aos processos genéticos (i.e., mutação, migração, seleção natural e deriva) e às ações antropogênicas, indicando a importância do desenvolvimento de medidas apropriadas de conservação (FARIA et al., 2020). Contudo, pouco se sabe sobre a diversidade genética dos golfinhos-rotadores não-insulares da costa brasileira, como dos encontrados ao longo da Bacia de Santos (BS), e qual sua relação genética com a população de Noronha e outras populações do Atlântico Norte Ocidental (ANO).

Atualmente há escassez de estudos genéticos (i) exclusivos para o Atlântico Sul sobre *Stenella longirostris*, apesar da sua ampla distribuição mundial (FARIA et al., 2020); (ii) comparando os golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha (FN) (insulares) com os distribuídos ao longo da costa brasileira (não-insulares); e (iii) comparando os golfinhos-rotadores não-insulares do Atlântico Sul com os encontrados no Atlântico Norte. Assim, o presente estudo visa ajudar a preencher essas lacunas ao avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de *S. longirostris* da BS (i.e., golfinhos-rotadores não-insulares), e a sua relação genética com a população insular de FN e outras localidades do ANO através de marcadores nucleares (microsatélites) e/ou mitocondrial (região controle).

2 HIPÓTESE

Considerando o que foi apresentado acima, este estudo tem as seguintes hipóteses:

(1) A população de *Stenella longirostris* da Bacia de Santos (grupo-de-estudo), por apresentar uma distribuição mais ampla e por não apresentar filopatria, ou seja, fidelidade de retornos a uma mesma região, neste caso às ilhas oceânicas (i.e., golfinhos-rotadores não-insulares), apresentará alta diversidade genética (em ambos marcadores nuclear e mitocondrial) – similar ao encontrado para outras populações de *S. longirostris* ao redor do mundo;

(2) Esta população não-insular apresentará diferenciação populacional (marcador mitocondrial) da população insular de Fernando de Noronha, por esta última ser altamente filopátrica;

(3) As populações não-insulares da Bacia de Santos e do Atlântico Norte Ocidental demonstrarão diferenciação populacional menor do que em relação a população de Fernando de Noronha, visto que as duas primeiras não apresentam filopatria.

3 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho de conclusão de curso.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de *Stenella longirostris* da Bacia de Santos, Atlântico Sul, e analisar a relação genética entre este grupo-de-estudo e as outras populações de golfinhos-rotadores do Atlântico Ocidental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a diversidade genética dos golfinhos-rotadores da Bacia de Santos através da região controle do DNA mitocondrial e de nove loci de microssatélites;
- b) Investigar a presença de estruturação populacional entre os golfinhos-rotadores da Bacia de Santos através da região controle do DNA mitocondrial e de nove loci de microssatélites;
- c) Avaliar a relação genética entre os golfinhos-rotadores da Bacia de Santos e a população insular de golfinhos-rotadores do Arquipélago de Fernando de Noronha, bem como com os golfinhos-rotadores distribuídos no Golfo do México e ao longo da costa leste dos Estados Unidos (Atlântico Norte Ocidental), através da região controle do DNA mitocondrial.

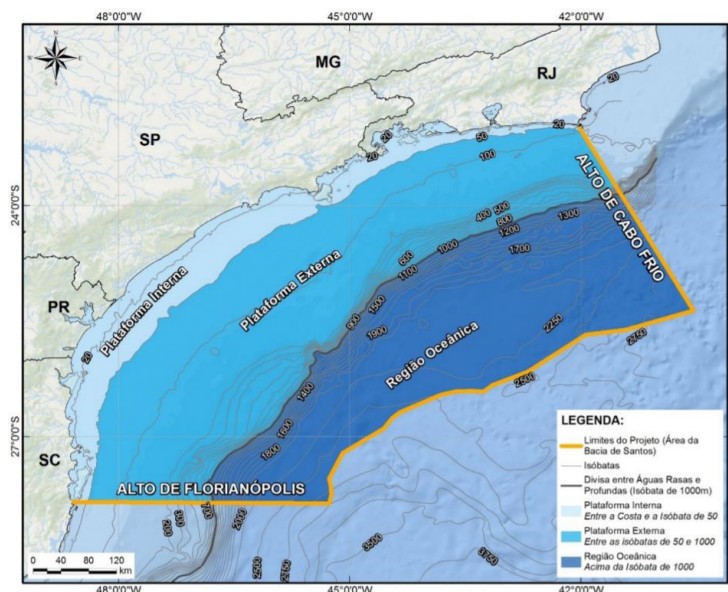
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nas seções abaixo estão descritos os tópicos da metodologia utilizada para desenvolver este trabalho de conclusão de curso.

4.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

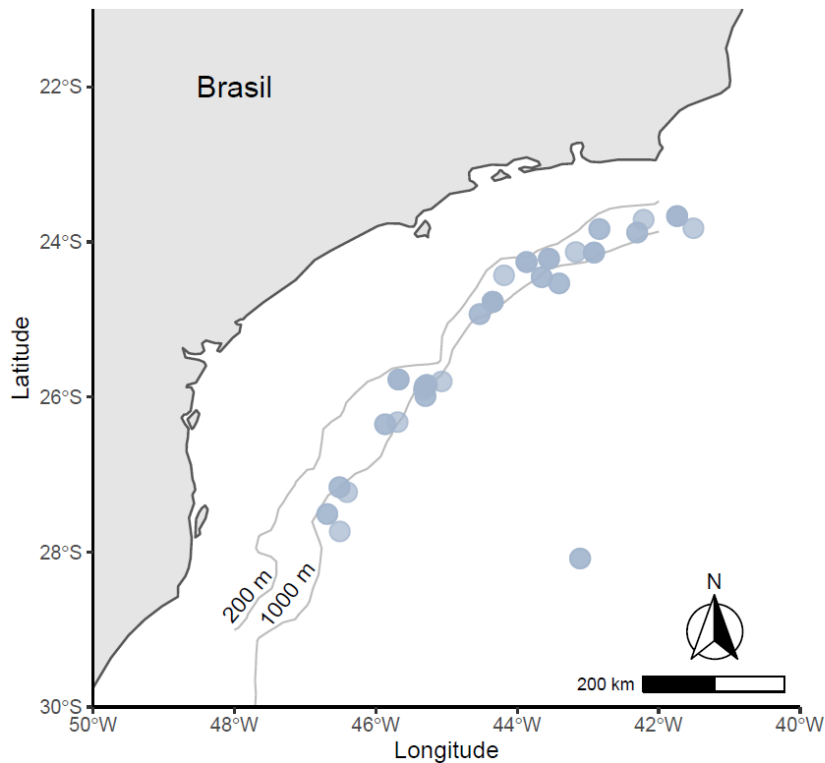
As amostras de golfinhos-rotadores utilizadas neste trabalho foram coletadas através do Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos (PMC-BS), executado pela Socioambiental Consultores Associados para a PETROBRAS. O PMC-BS foi financiado pela PETROBRAS e definido no Licenciamento Ambiental Federal do Pólo Pré-Sal da Bacia de Santos conduzido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A coleta de material ocorreu durante cruzeiros de Telemetria e Avistagem Embarcada que amostraram uma área de 272.567 quilômetros quadrados que estende-se de Cabo Frio (RJ) à Florianópolis (SC), contemplando águas rasas e profundas (Figura 2). Foram obtidas 56 amostras de pele de *S. longirostris* entre os anos de 2016 e 2020 nesta região (Figura 3), que foram adquiridas a partir do método de biópsia, o qual coleta amostras frescas de tecidos (pele e gordura) para estudos de biomarcadores, contaminantes, isótopos estáveis, bioquímicos e genéticos (IWC, 1991). As biópsias foram obtidas com balestras e dardos flutuantes com ponteiras adaptadas (LAMBERTSEN, 1987).

Figura 2 - Bacia de Santos. Área de amostragem dos cruzeiros de telemetria e avistagem.



Fonte: Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos.

Figura 3 - Local da amostragem. Localização das coletas das 56 biópsias entre os anos de 2016 e 2020.



Fonte: Dados produzidos pela autora, obtidos pelo Programa RStudio a partir dos pacotes *maps*, *mapdata*, *ggplot2*, *marmap*, *inlmisc* e *metR*.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E SEXAGEM MOLECULAR

As amostras de tecido foram preservadas em etanol 70% e transportadas para o Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) em Porto Alegre (RS). Neste laboratório foram realizadas a extração de DNA, sexagem molecular e preparo das amostras para amplificação da região controladora do mtDNA e loci de microssatélites pela coordenação técnica de genética do PMC-BS. Um breve resumo do processamento das amostras realizada por essa equipe é descrito abaixo.

A extração de DNA foi feita usando o DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) seguindo protocolo do fabricante. O DNA extraído foi amplificado para os genes SRY e ZFX/ZFY com os pares de iniciadores Y53-3C e Y53-3D; P1-5EZ e P2-3EZ, respectivamente, a fim de determinar molecularmente o sexo dos indivíduos (BERUBE; PALSBØLL, 1996), que determinou 38 fêmeas e 18 machos amostrados.

Cada amostra teve a região controle do DNA mitocondrial amplificada com os iniciadores D1p1.5 e D1p8 (BAKER et al., 1998), por reação em cadeia da polimerase (PCR),

obtendo-se um fragmento de 686 pares de bases (pb). As reações de PCR incluíram: 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada primer, 0,3 U da enzima 10 Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1X o tampão de reação (Invitrogen) e 1 µl de DNA (aproximadamente 20 ng). O PCR foi realizado com desnaturação inicial à 94°C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridização à 55°C por 45 segundos, e extensão à 72°C por 40 segundos e extensão final à 72°C por 10 minutos.

O DNA dos 56 indivíduos foi amplificado para nove loci de microssatélites: EV1, EV14, EV37, EV94 (VASECCHI; AMOS, 1996); KWM12a (HOELZEL; DAHLHEIM; STERN, 1998); TexVet5, TexVet7 (ROONEY; MERRITT, 1999); MK6 e D08 (KRÜTZEN et al., 2001). A reação de PCR foi conduzida num volume final de 10 µl, com as concentrações e as condições de PCR variando dependendo do par de iniciadores utilizados. Os produtos de PCR, tanto para mtDNA quanto para microssatélites, foram enviados para a MacroGen Inc. (Seoul, Coreia do Sul) para purificação e sequenciamento/genotipagem em um sequenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems). As sequências de mtDNA foram analisadas através do programa SEQUENCHER 5.4.6 (Gene Codes Corporation) e os genótipos do DNA nuclear foram determinados usando o programa Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) pela coordenação técnica de genética do PMC-BS.

4.3 ANÁLISES DOS GENÓTIPOS DE MICROSSATÉLITES

Para o presente trabalho foram utilizados os dados não tratados produzidos pela equipe do PMC-BS, e nestes foram realizadas as análises estatísticas e de controle de qualidade descritas a seguir. O programa Convert v.1.31 (GLAUBITZ, 2004) foi utilizado para converter as planilhas de dados para os arquivos de entrada requerido por cada programa. Para avaliar a presença de possíveis amostras duplicadas no conjunto de dados do presente grupo-de-estudo, os genótipos de cada indivíduo foram comparados utilizando o programa MSTools (PARK, 2001), em caso de duplicadas apontadas pelo programa, o sexo e o haplótipo (obtido com as análises do marcador mitocondrial) dos indivíduos seriam levados em consideração para confirmar que as amostras originaram-se do mesmo golfinho-rotador. Erros de genotipagem e presença de alelos que não foram amplificados (alelos nulos - ou fuga de alelos) (DAKIN; AVISE, 2004) foram testados pelo programa Microchecker v.2.2.0.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Para este programa, o motivo de repetição selecionado para cada locus foi dinucleotídeo conforme a configuração dos loci usados neste estudo, o tamanho máximo esperado foi 264 e o intervalo de confiança foi de 95% com poder de 10.000 interações.

Para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o desequilíbrio de ligação foi utilizado o teste exato de Fisher no programa GENEPOP v4.6 (ROUSSET, 2008), versão web. Sendo que, para o HWE foi utilizado o teste de probabilidade para cada locus da população, usando 10.000 desmemorizações, 1.000 lotes e 10.000 interações por lotes como parâmetro para a Cadeia de Markov. Enquanto para o desequilíbrio de ligação foi aplicado o teste para cada par de loci da população usando teste de probabilidade e os mesmos parâmetros para a Cadeia de Markov citados anteriormente. O teste estatístico de correção sequencial de Bonferroni foi realizado para calcular a significância dos resultados. Os loci que apresentaram significância para o desvio de HWE e presença de alelos nulos, problema de amplificação por não anelamento dos *primers*, ou fuga alélica (allelic dropout), não amplificação dos alelos por problemas em outras etapas da PCR, foram descartados das análises subsequentes.

A presença de estruturação populacional de golfinhos-rotadores não-insulares da BS foi analisada através do programa STRUCTURE v2.3.4 (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010), que usa uma abordagem de agrupamento Bayesiano. Para estimar o número de populações (K) foram utilizados dois modelos de ancestralidade disponíveis neste programa, o *Admixture model* e o *No admixture model*. A escolha do *Admixture model* se deu por ser o modelo mais recomendado como ponto de partida para as análises por considerar a possibilidade de ancestralidade mista para cada indivíduo, já que a mistura de ancestralidade é uma característica comum em populações reais (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010). Enquanto o modelo *No admixture model* é apropriado para populações discretas e mais poderoso para detectar estruturas sutis (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010). Dessa forma, levando em consideração as características biológicas das amostras utilizadas neste estudo (e.g. hábitos *offshore*, vivem em grandes grupos, organização social de fissão-fusão) e os resultados de uma única população obtidos com o modelo anterior (ver Resultados), o modelo *No admixture model* também foi executado. Para ambos modelos empregou-se o K variando de um a dez e foi realizado dez interações independentes com 1.000.000 de repetições da Cadeira de Markov Monte Carlos (MCMC) e 200.000 *burn-in*. Foi rodado o programa CLUMPAK versão web (KOPELMAN et al., 2015) levando em consideração os dados de L(K) e Delta K do método Evanno (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) para estimar o melhor valor de K.

O programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi operado para realizar análise da variância molecular (AMOVA) com o objetivo de testar o coeficiente de endogamia (F_{IS}). Também avaliou-se o índice de diversidade molecular a fim de descobrir as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) para os loci de microssatélites. Utilizou-se o Fstat v.2.9.3.2 (GOUDET, 2001) para avaliar o número total de alelos por locus e a riqueza

alélica, ou seja, o número médio de alelos por locus. Para a riqueza alélica foram calculados a média e o desvio padrão. Caso a população amostral tivesse apresentado estruturas distintas (o que não foi o caso deste estudo – ver resultados), também teriam sido analisados o número de alelos privados por grupo e o índice de fixação (F_{ST}), através dos programas Fstat e ARLEQUIN, respectivamente.

4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE mtDNA

A fim de certificar-se de que as sequências trabalhadas realmente pertenciam a *S. longirostris*, foi utilizada a ferramenta de alinhamento nucleotídico BLAST do Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde cada sequência é comparada com as sequências de DNA do banco de dados de referência através de pesquisa de similaridade.

As 56 sequências de 686 pb da região controle de mtDNA foram alinhadas em MUSCLE, implementado no programa MEGA v6.06 (TAMURA, 2013). Neste programa também foi possível criar os arquivos de entrada requerido pelo *software* DNAsp v6.12.03 (ROZAS, 2017), o qual foi utilizado para gerar o arquivo de importação para os programas subsequentes e avaliar as frequências haplotípicas das amostras.

O programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi utilizado para avaliar a diversidade molecular através das diversidades nucleotídica e haplotípica. Caso as análises nucleares tivessem revelado a presença de estruturação genética, também teria sido avaliado o nível de diferenciação entre os grupos genéticos para o mtDNA através do cálculo de F_{ST} e Φ_{ST} no ARLEQUIN.

A relação genética entre *S. longirostris* da Baía de Santos foi investigada através da construção de uma rede haplotípica pelo método *median-joining network* usando o programa PopART v.1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015).

4.5 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE OS GOLFINHOS-ROTADORES DA BACIA DE SANTOS E DE OUTRAS LOCALIDADES

As relações genéticas entre os golfinhos-rotadores da BS com a população insular de FN e as populações oceânicas do Golfo do México (GM) e costa leste dos Estados Unidos no Atlântico Norte (AN) (GM e AN são considerados como parte do Atlântico Norte Ocidental – ANO) foram comparada através da região controle do mtDNA. Utilizaram-se os haplótipos

identificados para os 56 indivíduos da BS com os 11 haplótipos encontrados para a população de FN (FARIA et al., 2020) e disponíveis no GenBank (Tabela 1). Foram também utilizados dois haplótipos encontrados para a população do GM e dois para o AN (ANDREWS et al., 2013) e disponíveis no GenBank (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista dos haplótipos disponíveis no GenBank. (n: número de indivíduos).

Nome Haplótipo	Localização	n	Código de Acesso	Referência
SLOH1FNCR	FN	126	MK184992	FARIA et al., 2020
SLOH2FNCR	FN	24	MK184993	FARIA et al., 2020
SLOH3FNCR	FN	1	MK184994	FARIA et al., 2020
SLOH4FNCR	FN	1	MK184995	FARIA et al., 2020
SLOH5FNCR	FN	1	MK184996	FARIA et al., 2020
SLOH6FNCR	FN	1	MK184997	FARIA et al., 2020
SLOH7FNCR	FN	1	MK184998	FARIA et al., 2020
SLOH8FNCR	FN	3	MK184999	FARIA et al., 2020
SLOH9FNCR	FN	2	MK185000	FARIA et al., 2020
SLOH10FNCR	FN	1	MK185001	FARIA et al., 2020
SLOH11FNCR	FN	1	MK185002	FARIA et al., 2020
StLo045CR	GM	1	KC161041	ANDREWS et al., 2013
StLo046CR	GM	4	KC161042	ANDREWS et al., 2013
StLo059CR	AN	1	KC161055	ANDREWS et al., 2013
StLo060CR	AN	1	KC161056	ANDREWS et al., 2013

Fonte: Da autora.

As diferentes sequências dos haplótipos foram alinhadas em MUSCLE, e a partir deste alinhamento foram encurtadas para 372 pb. A relação genética foi investigada através da construção de uma rede haplotípica pelo método *median-joining network* usando o programa PopART v.1.7. O nível de diferenciação genética para o mtDNA entre as diferentes populações do Atlântico Ocidental foi estimado por meio dos cálculos de F_{ST} e Φ_{ST} no ARLEQUIN v3.5.2.2, com 10.000 permutações. Para estes, GM e AN foram consideradas uma única área (ANO), devido ao baixo número amostral de indivíduos para estas duas localidades ($n = 7$). O melhor modelo de evolução para calcular o Φ_{ST} foi estimado usando jModelTest v2.1.6 (POSADA, 2008) em CIPRES Science Gateway (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010), com o algoritmo Bayesian Information Criterion (BIC), o qual identificou Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) com sítios invariantes como o melhor modelo para cálculo das taxas de substituição.

5 RESULTADOS

Nas seções abaixo estão descritos os resultados obtidos neste trabalho de conclusão de curso.

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE

Os genótipos de todos os indivíduos do grupo-de-estudo ($n = 56$) foram comparados e não apresentaram nenhuma duplicata, tendo como 72,22% o maior percentual de alelos correspondentes entre todos analisados. Desta forma, não foi retirada nenhuma amostra e todos os 56 indivíduos foram avaliados.

Dos nove loci estudados para estes indivíduos, o programa Microchecker apontou que nenhum locus apresentou abandono alélico. Entretanto, os loci TexVet5 e D08 apresentaram alta homozigosidade para a maioria das classes de tamanho dos alelos. Para o locus TexVet5, o número de homozigotos esperados foi 17,142 e o observado foi 47. Já para o locus D08 o total de homozigotos esperados foi 6,125 e o observado 15. Estes resultados indicaram a presença de alelos nulos para ambos loci.

Os loci TexVet5 e D08 também apresentaram significância ($P \leq 0,05$) para desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), enquanto os sete loci restantes estavam em equilíbrio (Tabela 2). Os resultados do GENEPOP também demonstraram que nenhum dos loci estudados evidenciaram desequilíbrio de ligação. Desta forma, levando em consideração a presença de alelos nulos e o desvio do HWE do TexVet5 e D08, ambos foram excluídos das análises abaixo.

Avaliando a qualidade das sequências da região controle de mtDNA do presente estudo, os resultados obtidos demonstraram que todas as 56 sequências haplotípicas dos golfinhos-rotadores apresentaram grau de identidade de no mínimo 96% com outras sequências da mesma espécie, confirmando que todos os indivíduos do grupo-de-estudo são *S. longirostris*. Desta forma, nenhuma sequência foi desconsiderada das análises abaixo.

5.2 ANÁLISES GENÉTICAS DE GOLFINHOS-ROTADORES DA BACIA DE SANTOS

O melhor K para explicar a estruturação populacional dos golfinhos-rotadores da BS estimado por L(K) foi $K = 1$ para ambos os modelos testados (Figura 4), enquanto que DeltaK

(ΔK) estimou $K > 1$ para ambos os modelos (Figura 5). Contudo, ao checar os valores de atribuição para cada indivíduo aos *cluster* propostos para $K > 1$, foi observado que não há estruturação populacional (Figura 6).

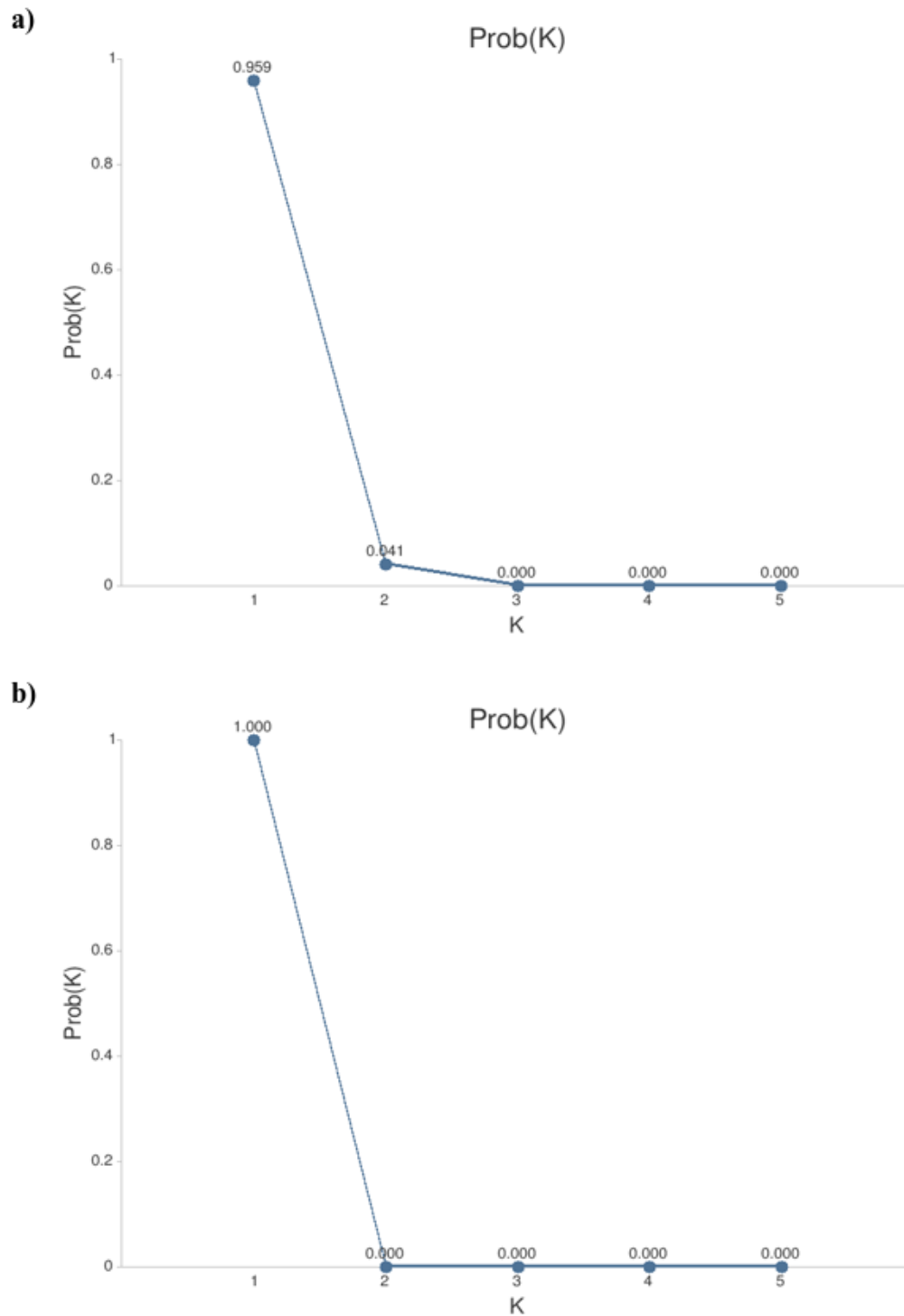
O método estatístico ΔK é comumente usado para detectar a estruturação genética entre amostras, pois, em alguns casos, $L(K)$ pode superestimar a estrutura populacional. Entretanto, mesmo quando não há estruturação populacional entre as amostras, ΔK não é capaz de estimar $K = 1$ e neste caso deve-se levar em consideração o $L(K)$ e os valores de atribuição de cada indivíduo a cada grupo ou população (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Tal fato foi observado no presente estudo, e desta forma, considerou-se como o melhor valor de K o maior valor estimado pelo método estatístico $L(K)$, ocorrendo em $K = 1$.

Como as análises dos microssatélites não apresentaram estruturação populacional para os golfinhos-rotadores da BS, não foi avaliado o nível de diferenciação genética entre os possíveis clusters através do cálculo de F_{ST} (microssatélites; mtDNA) e Φ_{ST} (mtDNA).

Os índices de diversidade dos microssatélites foram calculados considerando os sete loci que passaram os testes de controle de qualidade, e a diversidade calculada para estes pode ser vista na Tabela 2. Estes loci apresentaram uma média da riqueza alélica de 12,689, com desvio padrão (D.P.) de 3,984. A média da heterozigosidade esperada (H_e) é 0,891 (D.P.= 0,244) e da heterozigosidade observada (H_o) é 0,839 (D.P. = 0,231). O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) médio de 0,0292 ($P = 0,065$) não apresentou significância mesmo depois da correção de Bonferroni, evidenciando a ausência de endogamia.

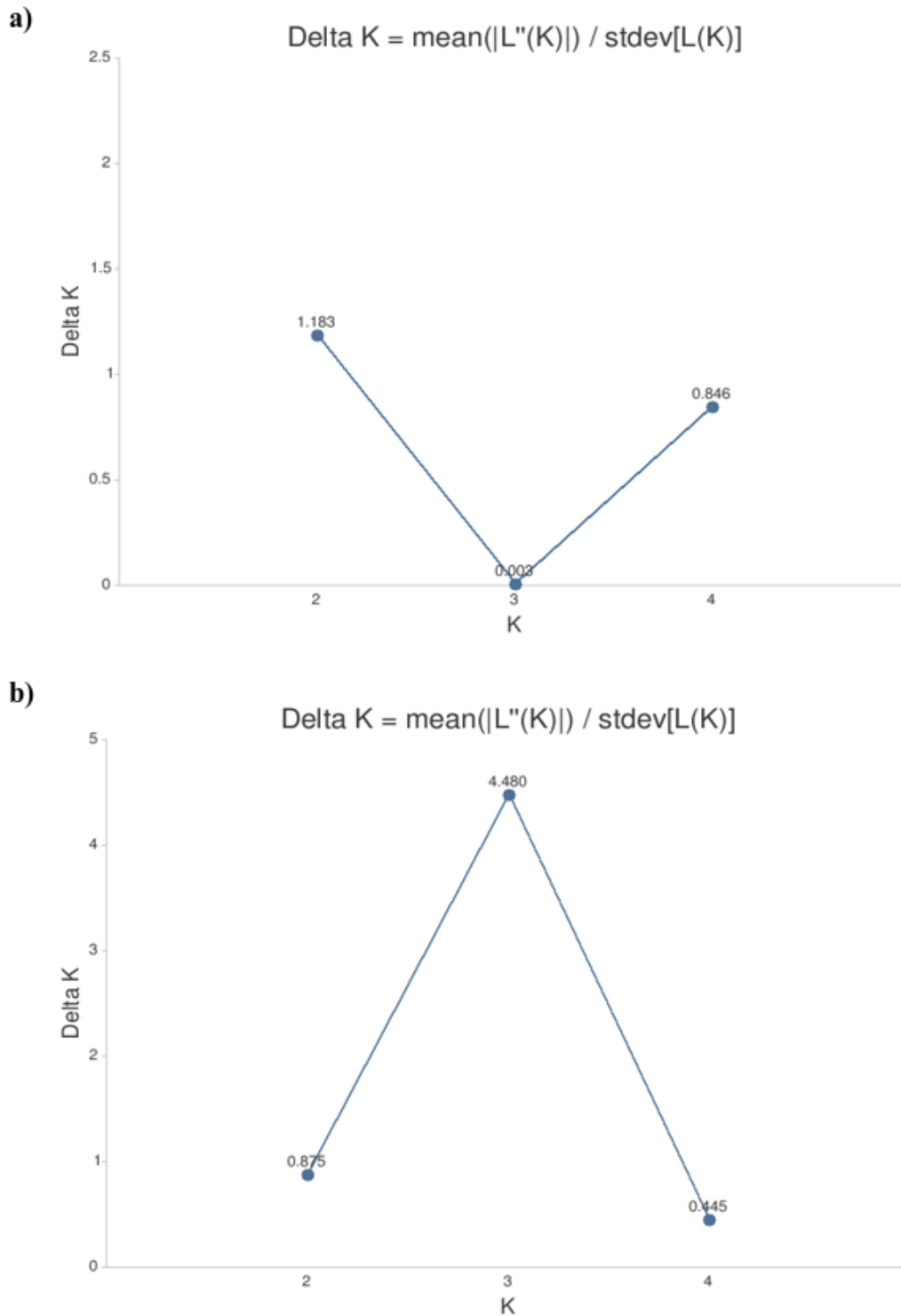
O alinhamento da região controle de mtDNA das 56 sequências estudadas apontou um tamanho comum de 686 pb e ausência de *indels*. Os resultados dos *softwares* DNAsp e ARLEQUIN mostraram que este conjunto de sequências correspondem a 29 haplótipos (Tabela 3), com 40 sítios polimórficos, uma diversidade haplotípica (h) de 0,949 (D.P = 0,017), e diversidade nucleotídica (π) de 0,016 (D.P. = 0,008). As relações de frequência e proximidade genética entre os 29 haplótipos pode ser vista na rede haplotípica (Figura 7).

Figura 4 - Estimativa do melhor K pelo método estatístico L(K). (a) melhor K obtido pelo modelo de mistura (*Admixture Model*) e (b) melhor K estimado pelo modelo sem mistura (*No Admixture Model*).



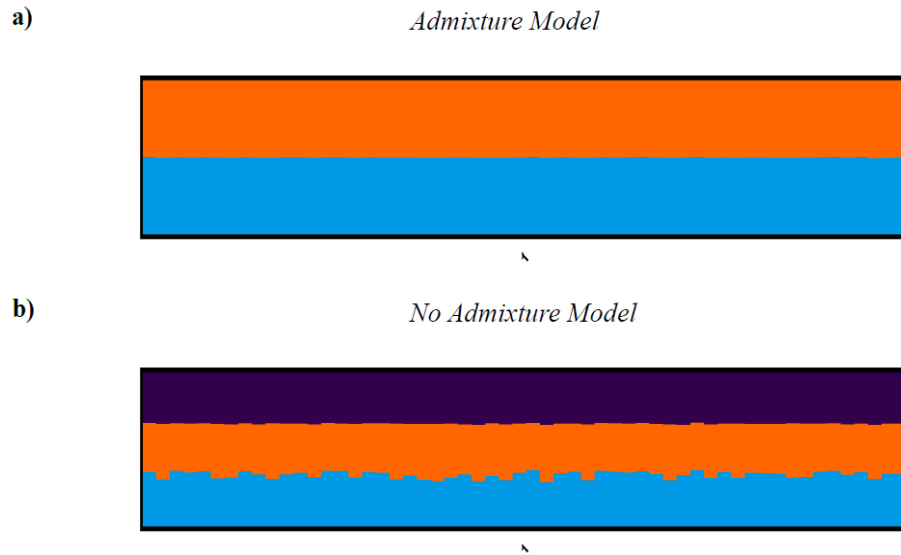
Fonte: Dados obtidos pela autora a partir do programa CLUMPAK.

Figura 5 - Estimativa do melhor K pelo método estatístico ΔK . (a) melhor K obtido pelo modelo de mistura (*Admixture Model*) e (b) melhor K estimado pelo modelo sem mistura (*No Admixture Model*).



Fonte: Dados obtidos pela autora a partir do programa CLUMPAK.

Figura 6 - Análise Bayesiana dos golfinhos-rotadores da Bacia de Santos. Distribuição da estrutura genética dos indivíduos para (a) $K = 2$ e (b) $K = 3$ para o método estatístico ΔK .



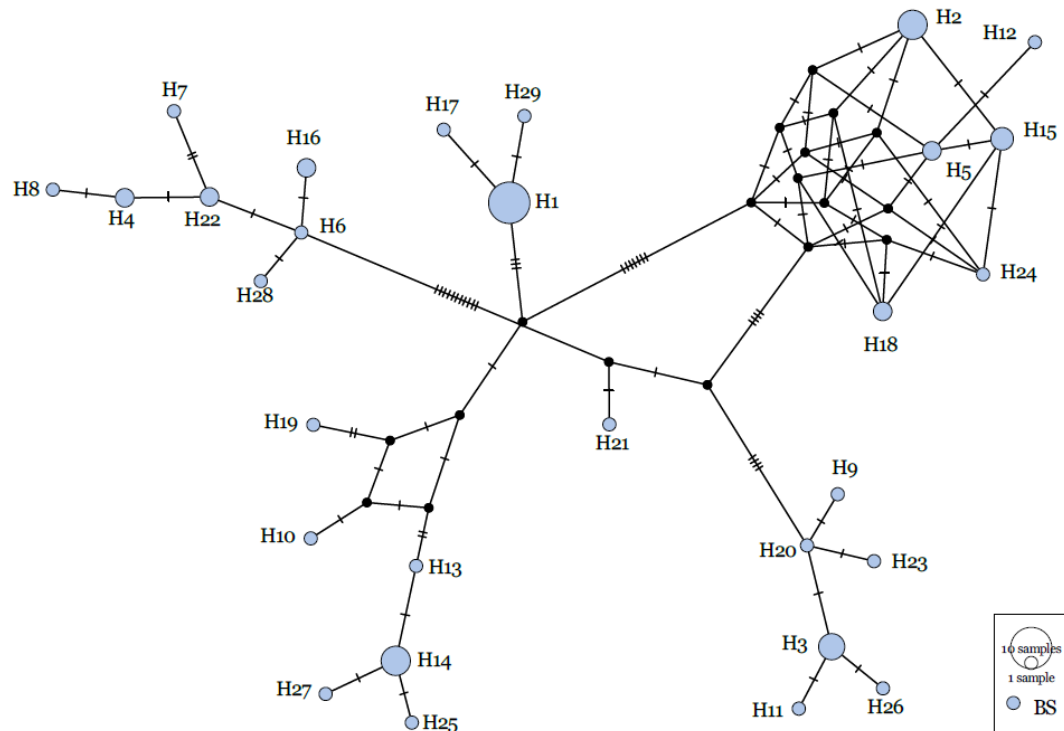
Fonte: Dados obtidos pela autora a partir do programa CLUMPAK.

Tabela 2 - Diversidade genética dos golfinhos-rotadores da Bacia de Santos para sete loci de microssatélites (Na: número de alelos; Ra: riqueza alélica; H_e : heterozigosidade esperada e H_o : heterozigosidade observada).

Locus	Na	Ra	H_e	H_o
EV1	14	13,982	0,906	0,839
EV14	15	14,964	0,891	0,875
EV37	15	14,946	0,862	0,946
EV94	16	15,982	0,927	0,893
KWM12a	8	8,000	0,820	0,745
TexVet7	6	5,964	0,247	0,268
MK6	15	14,982	0,909	0,839
Média	13	12,689	0,891	0,839

Fonte: Da autora.

Figura 7 - Rede haplotípica pelo método *median-joining network* para os 29 haplótipos de golfinhos-rotadores da Baía de Santos. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência de cada haplótipo. Círculos pretos indicam possíveis haplótipos intermediários não amostrados ou extintos. Pequenos traços pretos nas linhas que conectam os haplótipos equivalem ao número de mutações. O nome de cada haplótipo pode ser visto na Tabela 3. Tamanho do fragmento: 686 pb.



Fonte: Rede haplotípica obtida pela autora por meio do programa POPART.

5.3 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE OS GOLFINHOS-ROTADORES DA BACIA DE SANTOS E DE OUTRAS LOCALIDADES DO ATLÂNTICO OCIDENTAL

O alinhamento das 56 sequências da região controle de mtDNA dos golfinhos-rotadores da BS com as sequências haplotípicas das populações de FN ($n = 11$), GM ($n = 2$) e AN ($n = 2$), gerou um fragmento em comum de 372 pb. A redução do tamanho destes fragmentos resultou na perda de nove haplótipos de *S. longirostris* da BS, que colapsaram em quatro haplótipos (Tabela 3). Além disso, ao diminuir o fragmento de 413 pb das sequências haplotípicas de FN (obtidos no GenBank) para 372 pb (usados nesse estudo), o haplótipo SLOH10FNCR de FN passou a ser compartilhado com o haplótipo H13 da BS e dois outros haplótipos de FN (SLOH7FNCR e SLOH9FNCR) uniram-se ao haplótipo SLOH1FNCR desta mesma localidade (Tabela 3).

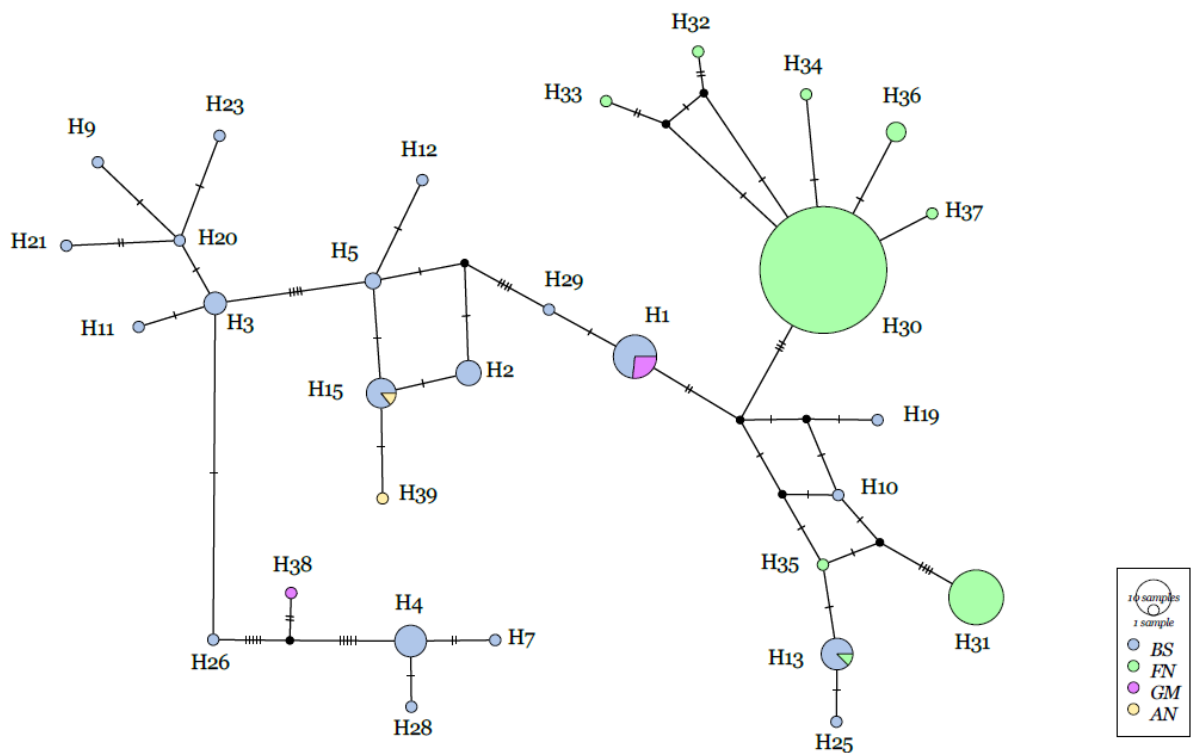
Tabela 3 - Nome dos haplótipos do presente estudo.

<i>Sigla</i>	<i>Haplótipos - 686 pb</i>	<i>Haplótipos - 372 pb</i>
H1	SWA-SloH1	SWA-SloH1+ SWA-SloH17+StLo046CR
H2	SWA-SLoH2	SWA-SLoH2
H3	SWA-SloH3	SWA-SloH3
H4	SWA-SloH4	SWA-SloH4+SWA-SloH6+SWA-SloH8+SWA-SloH13+SWA-SloH22
H5	SWA-SloH5	SWA-SloH5
H6	SWA-SloH6	
H7	SWA-SloH7	SWA-SloH7
H8	SWA-SloH8	
H9	SWA-SloH9	SWA-SloH9
H10	SWA-SloH10	SWA-SloH10
H11	SWA-SloH11	SWA-SloH11
H12	SWA-SloH12	SWA-SloH12
H13	SWA-SloH13	SWA-SloH13+SWA-SloH14+SWA-SloH27+SLOH10FNCR
H14	SWA-SloH14	
H15	SWA-SloH15	SWA-SloH15+SWA-SloH18+SWA-SloH24+StLo059CR
H16	SWA-SloH16	
H17	SWA-SloH17	
H18	SWA-SloH18	
H19	SWA-SloH19	SWA-SloH19
H20	SWA-SloH20	SWA-SloH20
H21	SWA-SloH21	SWA-SloH21
H22	SWA-SloH22	
H23	SWA-SloH23	SWA-SloH23
H24	SWA-SloH24	
H25	SWA-SloH25	SWA-SloH25
H26	SWA-SloH26	SWA-SloH26
H27	SWA-SloH27	
H28	SWA-SloH28	SWA-SloH28
H29	SWA-SloH29	SWA-SloH29
H30		SLOH1FNCR+SLOH7FNCR+SLOH9FNCR
H31		SLOH2FNCR
H32		SLOH3FNCR
H33		SLOH4FNCR
H34		SLOH5FNCR
H35		SLOH6FNCR
H36		SLOH8FNCR
H37		SLOH11FNCR
H38		StLo045CR
H39		StLo060CR

Fonte: Da autora.

Desta forma, as 71 sequências comparadas, apresentaram 30 haplótipos. Destes, 17 foram exclusivos de *S. longirostris* da BS, oito exclusivos dos indivíduos de FN, um exclusivo para os indivíduos do GM, e outro para o AN. Três haplótipos foram compartilhados entre diferentes localidades, sendo um haplótipo compartilhado entre os indivíduos da BS e FN, e dois entre indivíduos da BS, GM e AN. Na rede haplotípica (Figura 8) pode ser visto a relação genética entre esses indivíduos e a frequência destes 30 haplótipos nas populações.

Figura 8 - Rede haplotípica pelo método *median-joining network* para os 30 haplótipos dos golfinhos-rotadores do Atlântico Ocidental. As cores correspondem aos haplótipos de diferentes localidades: haplótipos da Baía de Santos (azul), Fernando de Noronha (verde), Golfo do México (rosa) e Atlântico Norte (amarelo). O tamanho dos círculos é proporcional a frequência de cada haplótipo. Círculos pretos indicam possíveis haplótipos intermediários não amostrados ou extintos. Pequenos traços pretos nas linhas que conectam os haplótipos equivalem ao número de mutações. Os nomes dos haplótipos podem ser vistos na Tabela 3. Tamanho do fragmento: 372 pb.



Fonte: Rede haplotípica obtida pela autora por meio do programa POPART.

Para a sequência de mtDNA de 372 pb, a diferenciação genética entre as três principais áreas (i.e., BS, FN e ANO) em relação aos valores de F_{ST} foi de 0,4329 entre BS e FN e de 0,04996 entre a BS e o ANO (Golfo do México + Atlântico Norte) (Tabela 4). Enquanto que para o Φ_{ST} foi de 0,51095 para o primeiro grupo citado anteriormente e de 0,00929 para o segundo (Tabela 4). Ambos parâmetros de diferenciação genética mostram altos níveis de

estruturaco populacional ($> 0,25$) entre as populaoes da BS e FN e baixa diferenciao ($< 0,05$) entre BS e ANO.

Tabela 4 - Valores de diferenciao genética entre as populaoes de golfinhos-rotadores do Atlântico Ocidental, para as 225 seqncias de mtDNA (372 pb). F_{ST} (diagonal inferior) e Φ_{ST} (diagonal superior) baseados no método de distância Tamura & Nei. Os valores com asterisco (*) apresentam P significativo ($P < 0,00001$).

	BS	FN	ANO
BS	-	0,51095*	0,00929
FN	0,43299*	-	0,57167*
ANO	0,04996	0,58000*	-

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

A diversidade genética entre os indivíduos de uma populaoe  fundamental para que esta se adapte às mudanças ambientais e adversidades resultantes de aoes antropognicas, além de favorecer a evoluoe e manter o *fitness* reprodutivo (HUGHES et. al., 2008). Por essas razoes, a União Internacional para Conservaoe da Natureza (IUCN) considera a variabilidade genética um importante fator para análise da biodiversidade e conservaoe das espécies (McNEELY et al., 1990). Até o momento, estudos genéticos são escassos para avaliar este parâmetro de biodiversidade para a populaoe de *Stenella longirostris* do Oceano Atlântico Sul Ocidental. Assim, este estudo visou avaliar a diversidade genética e a estruturao populacional da populaoe *offshore* (não-insular) encontrada ao longo da Bacia de Santos por meio de análises de DNA nuclear (microsatélites) e mitocondrial (região controle). Bem como, comparar geneticamente (mtDNA) a populaoe da BS com outras populaoes de golfinhos-rotadores em diferentes localidades do Oceano Atlântico Ocidental (Arquipélago de Fernando de Noronha, Golfo do México e Atlântico Norte).

Os resultados nucleares baseados em sete loci de microsatélites não apresentaram estruturao populacional, indicando um cluster único para *S. longirostris* da BS ($K = 1$). Entre os cetáceos, a estrutura genética pode variar entre diferentes populaoes, pois esta  determinada pelas formas de acasalamento, mobilidade e *home range*, relaoes entre os indivíduos, padrões de formaoe, tamanho e estabilidade de grupos sociais (ANDREWS et al., 2010; HOELZEL; GOLDSWORTHY; FLEISCHER, 2002). O nico *cluster* encontrado para o

grupo-de-estudo está em consonância com as características biológicas do mesmo, pois estes indivíduos não apresentam hábitos de vida que favoreçam a estruturação. Visto que, trata-se de uma população *offshore* e não está associada às ilhas oceânicas (i.e., não-insular), ela dificilmente apresenta preferência por alguma área ou filopatria (AMARAL et al, 2015; MORENO et al., 2005). Estes golfinhos também costumam viver em grandes grupos, de até mil, formando grupos por fissão-fusão entre eles, sem evidências de preferência para estas associações, e são poligâmicos e poliândricos (NORRIS et al., 1994; PERRIN, 2009). Uma única unidade populacional para os golfinhos-rotadores *offshore* da BS também foi vista por Volpi (2012), por meio de marcadores mitocondriais, e por Faria (2013), com sete loci de microsatélites, em suas dissertações de mestrado. A maioria das amostras de ambos trabalhos são provenientes da região nordeste do Brasil, mas eles também avaliaram 36 indivíduos das regiões Sul e Sudeste do Brasil, com abrangência de coleta inferior ao presente trabalho, visto que este último tem coletas homogeneamente distribuídas ao longo da BS (Figura 3).

Tanto Volpi (2012) quanto Faria (2013) apontaram que os golfinhos-rotadores brasileiros são divididos em dois *clusters*. Para Volpi (2012) os *clusters* são compostos da seguinte forma, um compreende os indivíduos não-insulares de diferentes localidades (Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte) e outro são os golfinhos-rotadores insulares de FN. Faria (2013) agrupa os não-insulares (mesmas localidades citadas anteriormente) à 51 indivíduos de FN, mas a maioria das amostras insulares do Arquipélago de Fernando de Noronha ($n = 113$) forma um cluster único com três indivíduos do Ceará. Faria et al. (2020) também comparou os golfinhos-rotadores de FN (através do mtDNA) com diversas localidades ao redor do mundo, mostrando o isolamento genético de FN para esse marcador. Contudo, neste estudo, os autores não utilizaram as amostras de golfinhos-rotadores não-insulares da costa brasileira e não há menção dos resultados prévios. Estes autores ainda ressaltam que “a falta de informação sobre golfinhos-rotadores de outras localidades ao longo da costa brasileira limita responder sobre a manutenção do fluxo gênico entre o estoque populacional de FN e demais áreas no Brasil” (FARIA et al., 2020). Visto isso, para melhor compreender como os golfinhos-rotadores do litoral brasileiro são estruturados, são necessários estudos com um maior número amostral e menor lacuna entre os sítios de amostragem, o que podem ser obtidos através de amostragens sistemáticas como as empregadas através do PMC-BS para a coleta das amostras do presente trabalho.

A ausência de endogamia apontado pelo baixo coeficiente de endocruzamento ($F_{IS} = 0,029$; $P = 0,065$) encontrado para a população da BS, indica a panmixia desse grupo,

favorecendo a alta diversidade desta população. A diversidade genética nuclear (microssatélites) da população da BS foi a mais alta quando comparado aos mesmo parâmetros de *S. longirotris* de FN (FARIA et al., 2020), e também em relação as populações de outras localidades oceânicas (LESLIE; ARCHER; MORIN, 2018; OREMUS et al., 2007; VIRICEL et al., 2016). Já a diversidade genética mitocondrial (região controle do mtDNA) dos golfinhos-rotadores da BS foi similar a ANO (ANDREWS et al., 2013) e em relação aos mesmos grupos de outras bacias oceânicas, com exceção aos golfinhos-rotadores de FN, os quais apresentaram uma baixa diversidade para este marcador (Tabela 5). Volpi (2012) também encontrou maior diversidade em relação a este marcador para os golfinhos-rotadores do Sul e Sudeste do Brasil do que os do Arquipélago.

Tabela 5 - Diversidade genética para a região controle do mtDNA e para loci de microssatélites para diferentes localidades do Oceano Atlântico Ocidental. (n: número de indivíduos; h: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; Ra: riqueza alélica; H_e : heterozigosidade esperada e H_o : heterozigosidade observada)

Localização	n	mtDNA		Microssatélites		
		h	π	Ra	H_o	H_e
BS	56	0,949	0,016	12,689	0,839	0,891
FN	162	0,345	0,006	9,716	0,767	0,764
GM	5	0,700	0,009	-	-	-
AN	2	1,000	0,001	-	-	-

Fonte: Da autora.

Apesar do baixo número de indivíduos disponíveis para o ANO ($n = 7$) e da maior distância geográfica, este estudou mostrou um maior compartilhamento de haplótipos ($n = 2$) e baixa diferenciação genética baseada no mtDNA (F_{ST} e $\Phi_{ST} < 0,05$) entre BS e ANO, criando a hipótese que estes grupos podem estar inseridos em uma mesma população *offshore* não-insular de grande *home range*. Como é sabido para cetáceos; são um grupo altamente móvel e com baixo custo energético para a locomoção (MARTIN; KESSING; PALUMBI, 1990; WÜRSIG et al., 1994), possibilitando a troca genética entre indivíduos de locais distantes. Entretanto, para trabalhos futuros, seria interessante aumentar o número amostral do ANO para marcadores mitocondriais e nucleares. Isso possibilitaria melhor compreender se os indivíduos da BS e ANO fazem parte de uma única população *offshore* panmítica, como encontrado para *Tursiops truncatus* do Atlântico Oeste (COSTA et al., 2021). Já o oposto é visto quando se compara a

BS com FN, pois apesar de maior proximidade geográfica e maior número de amostras comparadas ($n = 162$), obteve-se um único haplótipo compartilhado e alta diferenciação genética baseada no mtDNA (F_{ST} e $\Phi_{ST} > 0,25$) entre essas duas localidades. Estes resultados indicam ao menos filopatria das fêmeas de FN, visto que o DNA mitocondrial é uma herança materna (FREELAND; PETERSEN, 2011). Para melhor entender se machos e fêmeas de *S. longirostris* de FN são filopátricos e geneticamente isolados dos da BS, estudos futuros com marcadores nucleares são necessários.

Características biogeográficas também influenciam a estruturação das populações e diferenciação genética, já que afetam os padrões de dispersão das espécies (BOWEN et al., 2016). A influência dos aspectos marinhos para a estruturação populacional e diversidade genética faz com que dentro da mesma região oceânica, diferentes espécies mostrem padrões semelhantes em sua estrutura populacional e diversidade (GRAY et al., 2020). Para os odontocetos é comum vermos estruturação em populações associadas às ilhas (e.g. ANDREWS et al., 2010; ANDREWS et al., 2013; FARIA et al., 2020; LESLIE; ARCHER; MORIN, 2018; OREMUS et al., 2007; VIRICEL et al., 2016), já que esta característica favorece comportamentos de filopatria, uma vez que ilhas apresentam recursos e muitas áreas de descanso (ANDREWS et al., 2010). Já a ausência de estruturação pode ser observada para indivíduos não associados às ilhas que vivem em áreas abertas, como as águas pelágicas, como é o caso dos golfinhos-rotadores não-insulares deste estudo e de outra população *offshore* da família Delphinidae encontrada ao longo do Atlântico Ocidental (e.g. COSTA et al., 2021).

As análises de mtDNA do presente estudo, reforçam os resultados já encontrados por Faria et al. (2020), onde apontam essa população de golfinhos-rotadores de Noronha com forte fidelidade geográfica e maior isolamento genético. Estas características, demandam políticas de conservação eficazes para esta população insular, já que isolamento e baixa diversidade genética deixa a população mais susceptível a sofrer com impactos ambientais e antrópicos, como por exemplo as mudanças climáticas (GRAY et al., 2020). A baixa diversidade torna a espécie menos capaz de adaptar-se rapidamente ao ambiente global em rápida mudança, gerando perda da incrível biodiversidade atual (FENSTER et al., 2018)

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*) da Bacia de Santos são uma única população, com alta diversidade genética para ambos os marcadores nucleares (microsatélites) e mitocondrial (região controle). Os resultados de diferenciação genética baseados no mtDNA sugerem que os golfinhos-rotadores da costa Ocidental do Atlântico Sul e Norte formam uma única população *offshore* panmítica. Apesar da proximidade geográfica, os golfinhos-rotadores da Bacia de Santos mostraram-se altamente diferenciados dos associados à Fernando de Noronha, indicando isolamento genético e fidelidade geográfica do último grupo, especialmente das fêmeas já que esses dados são baseados no mtDNA. Estes resultados reforçam a importância de políticas de conservação para *S. longirostris* de FN. Assim como, da necessidade de futuros trabalhos com maior número amostral e marcadores nucleares para melhor compreender se, de fato, os golfinhos-rotadores não-insulares do Atlântico Ocidental formam uma única população.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, K. B. et al. Ecological niche modeling of *Stenella* dolphins (Cetartiodactyla: delphinidae) in the southwestern Atlantic Ocean. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 472, p. 166-179, 2015.
- ANDREWS, K. R. et al. Rolling stones and stable homes: Social structure, habitat diversity and population genetics of the Hawaiian spinner dolphin (*Stenella longirostris*). **Molecular Ecology**, v. 19, n. 4, p. 732-748, 2010.
- ANDREWS, K. R. et al. The evolving male: spinner dolphin (*Stenella longirostris*) ecotypes are divergent at Y chromosome but not mtDNA or autosomal markers. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 9, p. 2408-2423, 2013.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. **O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos**. Editora UNESC, p. 305-509, 2003.
- ATTARD, C. R. M. et al. From conservation genetics to conservation genomics: A genome-wide assessment of blue whales (*Balaenoptera musculus*) in Australian feeding aggregations. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 1, 2018.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Vol. 18, v. 18, n. 1987, p. 489-522, 1987.
- BAKER, C. S. et al. Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. **Marine Mammal Science**, v. 14, n. 4, p. 721-737, 1998.
- BEEBEE, T.; ROWE, G. **An Introduction to Molecular Ecology**. Oxford University Press, 2004.
- BENOIT-BIRD, K. J.; AU, W. W. L. Prey dynamics affect foraging by a pelagic predator (*Stenella longirostris*) over a range of spatial and temporal scales. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 53, p. 364-373, 2003.
- BERUBE, M.; PALSBOÛLL, P. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 2, p. 283-287, 1996.
- BOWEN, B. W. et al. Comparative phylogeography of the ocean planet. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 29, p. 7962-7969, 2016.
- CABALLERO, S. et al. 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**, v. 48, p. 263-270, 2013.
- CASILLAS, S.; BARBADILLA, A. Molecular population genetics. **Genetics**, v. 205, n. 3, p. 1003-1035, 2017.

CASTRO, P.; HUBER, M. E. **Biologia Marinha**. AMGH Editora, n. 8, 2012.

COMMITTEE ON TAXONOMY. **List of Marine Mammal Species and Subspecies**. Disponível em: <https://marinemammalscience.org/species-information/list-marine-mammal-species-subspecies/>. Acesso em: agosto 2021.

COSTA, A. P. B. et al. Ecological divergence and speciation in common bottlenose dolphins in the western South Atlantic. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 34, n. 1, p. 16-32, 2021.

CYPRIANO-SOUZA, A. L. et al. Genetic differentiation between humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Atlantic and Pacific breeding grounds of South America. **Marine Mammal Science**, v. 33, n. 2, p. 457-479, 2016.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504-509, 2004.

DO AMARAL, K. B. et al. Ecological niche modeling of *Stenella dolphins* (Cetartiodactyla: Delphinidae) in the southwestern Atlantic Ocean. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 472, p. 166-179, 2015.

DOLAR, M. L. L. et al. Comparative feeding ecology of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) and Fraser's dolphins (*Lagenodelphis hosei*) in the Sulu Sea. **Marine Mammal Science**, 19, p. 1-19, 2003.

ERNEST, H. B., et al. Fractured genetic connectivity threatens a southern California puma (*Puma concolor*) population. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FARIA, D. M. **Estruturação genética de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris* Gray, 1828) no litoral brasileiro**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biodiversidade Tropical, 2013.

FARIA, D. M. et al. Low mtDNA diversity in a highly differentiated population of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, 2020.

FENSTER, C. B et al. Conservation and Genetics. **Yale Journal of Biology and Medicine**, p. 291-501, 2018.

FREELAND, J; PETERSEN, H. K. **Molecular Ecology**. Wiley-Blackwell, v. 2, n. 2, 2011.

GLAUBITZ, J. C. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 309-310, 2004.

GOLDSTEIN, D. B. et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 463–471, 1995.

GOUDET, J. **FSTAT 2.9.3: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices**, 2001. Disponível em: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: maio 2021.

GRAY, J. E. *Spicilegia zoologica; or, original figures and short systematic descriptions of new and unfigured animals. Partes I e II: p. 1-8, 9-12, 1828. Parte III: p. 7-11, 1830.* Disponível em: <https://archive.org/details/b22007556/page/n3/mode/2up>. Acesso em: agosto 2021.

GRAY, H. W. I. et al. Comparative biogeography and the evolution of population structure for bottlenose and common dolphins in the Indian Ocean. **Journal of Biogeography**, v. 48, n. 7, p. 1654-1668, 2021.

HARTL D. L.; CLARK A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Artmed, v. 4, 2010.

HOELZEL, A. R. Conservation genetics of whales and dolphins. **Molecular Ecology**, v. 1, n. 2, p. 119-125, 1992.

HOELZEL, A. R.; DAHLHEIM, M.; STERN, S. J. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 2, p. 121-128, 1998.

HOELZEL, A. R.; GOLDSWORTHY, S. D.; FLEISCHER, R. C. Population genetics. In: HOELZEL A.R. (ed) **Marine Mammal Biology: An Evolutionary Approach**. Blackwell Science, 2002.

HOHENLOHE, P. A. et al. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. **PLOS Genetics**, v. 6, n. 2, 2010.

HUGHES, A. R. et al. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v. 11, n. 6, p. 609-623, 2008.

IWC (International Whaling Commission). Report of the ad-hoc working group on the effect of biopsy sampling on individual cetaceans. **Report of International Whaling Commission Special**, n. 13, p. 23–27, 1991.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

JEFFERSON, T. A.; WEBBER, M. A.; PITMAN, R. L. **Marine Mammals of the World: A Comprehensive Guide to Their Identification**. Academic Press/Elsevier, 2007.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, v. 0, n. 89, p. 114, 2011.

KISZKA, J. J. Atypical associations between dugongs (*Dugong dugon*) and dolphins in a tropical lagoon. **Journal of Marine Biological Association**, v. 87, p. 101-104, 2007.

KOPELMAN, Naama et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across k. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.

KRÜTZEN, M. et al. Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 3, p. 170-172, 2001.

LAMBERTSEN, R. H. A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. **Journal of Mammalogy**, v. 68, n. 2, p. 443-445, 1987.

LEDUC, R. G.; PERRIN, W. F.; DIZON, A. E. Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome B sequences. **Marine Mammal Science**, v. 15, n. 3, p. 619-648, 1999.

LEIGH, J.W.; BRYANT, D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110-1116, 2015.

LESLIE, M. S.; ARCHER, F. I.; MORIN, P. A. Mitogenomic differentiation in spinner (*Stenella longirostris*) and pantropical spotted dolphins (*S. attenuate*) from the eastern tropical Pacific Ocean. **Marine Mammal Science**, v. 35, n. 2, p. 522-551, 2018.

MAYR, E. Animal Species and Evolution. **Harvard University Press**, 1963.

MARTIN, A. P.; KESSING, B. D.; PALUMBI, S. R. Accuracy of estimating genetic distance between species from short sequences of mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 485-488, 1990.

McNEELY, J. A. et al. Conserving the world's biological diversity. **World Conservation Union, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund-US, and the World Bank**, 1990.

MENDEZ, M.; ROSENBAUM, H. C.; BORDINO, P. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: Population structure, by-catch impacts, and management implications. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 2, p. 419-435, 2008.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop**, p. 1-8, 2010.

MORENO, I. B. et al. Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 300, p. 229-240, 2005.

MORITZ, C. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: A critical review. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 4, p. 401-411, 1994.

- NORRIS, K. S. et al. **The Hawaiian Spinner Dolphin**. University of California Press, 1994.
- OREMUS, M. et al. Isolation and interchange among insular spinner dolphin communities in the South Pacific revealed by individual identification and genetic diversity. **Marine Ecology Progress Series**, v. 336, p. 275-289, 2007.
- OUBORG, N. J. Integrating population genetics and conservation biology in the era of genomics. **Biology Letters**, v. 6, n. 1, p. 3-6, 2010.
- PALAZZO-JR, J. T.; BOTH, M. C. **Guia dos Mamíferos Marinhos do Brasil**. Sagra, p.158, 1988.
- PARK, S. D. E. **Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection**. Tese (Doutorado) – Curso de Genética, 2001.
- PERRIN, W. F. Subspecies of *Stenella longirostris* (Mammalia Cetacea Delphinidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, n. 103, p.453-463, 1990.
- PERRIN, W. F. Variation and taxonomy of spotted and spinner porpoises (genus *Stenella*) of the eastern Tropical Pacific and Hawaii. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 7, p. 1059-1067, 1975
- PERRIN, W. F. *Stenella longirostris*. In: American Society of Mammalogists (eds). **Mammalian Species**. Oxford University Press, n. 599, p. 1-7, 1998
- PERRIN, W. F. *Stenella frontalis*. . In: American Society of Mammalogists (eds). **Mammalian Species**. Oxford University Press, n. 702, p. 1-6, 2002.
- PERRIN, W. F. Spinner Dolphin: *Stenella longirostris*. In: PERRIN, W. F.; WURSIG B.; THEWISSEN J. G. M (eds). **Encyclopedia of Marine Mammals**, San Francisco Academic Press, v. 2, p. 1100-1103, 2009.
- PERRIN, W. F.; DOLAR, M. L. L.; ROBINEAU, D. Spinner dolphins (*Stenella longirostris*) of the western Pacific and Southeast Asia: Pelagic and shallow-water forms. **Marine Mammal Science**, v. 15, n. 4, p. 1029-1053, 1999.
- PERRIN, W. F.; GILPATRICK-JR, J. W. Spinner dolphin *Stenella longirostris* (Gray, 1828). IN: RIDWAY S.H.; HARRISON R (eds). **Handbook of Marine Mammals: The First Book of Dolphins**. Academic Press, p. 99-128, 1994.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253 -1256, 2008.
- PRITCHARD, J. K., WEN, X., & FALUSH, D. Documentation for structure software: Version 2.3, 2010. Disponível em: https://www.ccg.unam.mx/~vinueza/tlem09/docs/structure_doc.pdf. Acesso em: abril, 2021

PSARAKOS, S.; HERZING, D. L.; MARTEN, K. Mixed-species associations between Pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) and Hawaiian spinner dolphins (*Stenella longirostris*) off Oahu, Hawaii. **Aquatic Mammals**, v. 3, n. 29, p. 390-395, 2003.

ROONEY, A.P.; MERRITT, D. B. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Heredity**, v. 90, n. 1, p. 228-231, 1999.

ROUSSET, F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.

ROZAS, J. et al. DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017.

SANTOS, F.; LACERDA, D.; REDONDO, R. Tecnologias genômicas na conservação da biodiversidade. **Bioscience Journal**, v. 20, p. 79-92, 2004.

SILVA, F. J. D. L.; DA SILVA, J. M. Circadian and seasonal rhythms in the behavior of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 1, p. 176-186, 2009.

SILVA-JR, J. M. **Ecologia comportamental do golfinho-rotadores em Fernando de Noronha**. Tese (Doutorado) – Curso Oceanografia Biológica, 2005.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K. et al. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VALSECCHI, E.; AMOS, W. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 1, p. 151-156, 1996.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VIRICEL, A. et al. Habitat availability and geographic isolation as potential drivers of population structure in an oceanic dolphin in the Southwest Indian Ocean. **Marine Biology**, v. 163, n. 10, p. 163-219, 2016.

VOLPI, T. A. **Filogeografia de golfinhos rotadores (*Stenella longirostris* Gray, 1828) no litoral brasileiro a partir de marcadores mitocondriais**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biodiversidade Tropical, 2012.

WÜRSIG B. et al. Population structure. In: NORRIS, K.S. et al. (eds). **The Hawaiian spinner dolphin**. University of California Press, Berkeley, p. 122-140, 1994.

ZHANG, Y.; LAN, H.; SHI, L. Animal mitochondrial DNA polymorphism: A valuable tool for evolutionary studies. **Cell Research**, v. 3, p. 113-119, 1993.