

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA
DO GOLFINHO-DE-DENTES-RUGOSOS
(*Steno bredanensis* G. CUVIER *IN* LESSON
1828) NO ATLÂNTICO SUDOESTE**

GABRIELA ORTOLANE MEDEIROS

São Mateus/ES

Agosto/2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA
DO GOLFINHO-DE-DENTES-RUGOSOS
(*Steno bredanensis* G. CUVIER *IN* LESSON
1828) NO ATLÂNTICO SUDOESTE**

GABRIELA ORTOLANE MEDEIROS

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Ana Paula Cazerta Farro da Rosa
Coorientador (a): Me. Heloisa Helena Linhares

**São Mateus/ES
Agosto/2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Gabriela Ortolane Medeiros**

Título: **Diversidade e estrutura genética do golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis* G. Cuvier in Lesson 1828) no Atlântico Sudoeste.**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 16/08/2022

Com nota 9,8 pela comissão julgadora:


Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora


Examinador 1


Examinador 2

Dedico este trabalho a minha família que sempre me encorajou e contribuiu para que eu alcançasse meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me permitido concluir mais uma etapa de minha vida e por colocar em meu caminho pessoas incríveis que me fizeram chegar até aqui.

A minha orientadora, Dra. Ana Paula Cazerta Farro, por contribuir com o meu aprendizado, por sempre está disposta e acessível a esclarecer todas as nossas dúvidas e por se preocupar com cada um de seus alunos, não só academicamente. Agradeço por toda paciência e dedicação, sem você nada disso estaria sendo possível. Muito obrigada!

A minha coorientadora, Me. Heloisa Helena Linhares, por todo o suporte oferecido para o desempenho desta monografia, por abrir as portas de sua casa para eu poder esclarecer minhas dúvidas, por cada tempo dedicado, por todas as conversas e apoio nos momentos de desespero, obrigada pela amizade e por todo o aprendizado oferecido.

A Minha família, por todo apoio e incentivo para que eu nunca desistisse, pela confiança e por fazerem tudo que estivesse ao seu alcance para eu chegar até aqui.

A minha mãe, Cristiane, por sempre estar presente, seja nos momentos bons ou ruins, nos desabafos, reclamações ou comemorações de cada pequena vitória, por todos os conselhos e encorajamentos, e por sempre me ajudar a pensar em soluções para os problemas que fossem surgindo, por menores que fossem.

Ao meu pai, Alaelson, por nunca ter duvidado do meu potencial e por sempre ter acreditado na minha capacidade em superar cada obstáculo. À minha avó Penha, por toda paciência, moradia e por ter me buscado quase todos os domingos na rodoviária para que eu não fosse embora sozinha. Amo muito vocês.

As duas pessoas que tornaram todos os meus momentos de universidade muito mais fáceis, mesmo durante o EARTE, os meus amigos, Carlos Daniel e Ana Beatriz, por todos os desabafos, conversas, reclamações, risadas, brigas e sofrimento. Por sempre acreditarem em mim e por nunca duvidarem do meu potencial. Bem como, as minhas amigas Gabriela Liuth, Lidiane e Nayane que estiveram ao meu lado em boa parte da minha trajetória.

A Rayelle, Sandieli e Joice por vivenciar comigo o desespero de final de período e o temido TCC, obrigada por todas as risadas de desespero, momentos de descontração, auxílio na execução dos programas, criação de mapas, esclarecimento de dúvidas, em tudo. Obrigada!

As meninas do laboratório, Fernanda, Drienne, Mylla, Lorena, Manu, Karla, Dahi e Vanessa, por todos os ensinamentos, por sempre estarem dispostas a ajudar ou a explicar qualquer dúvida, por toda paciência e amizade.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET) ProdBio por ter me proporcionado tantas experiências, aprendizado e crescimento tanto pessoal quanto acadêmico. Agradeço imensamente a tutora Marielce e ao 12 petianos, Alice, Wesley, Carlos Eduardo, Gabriela Lopes, Júlia Rhayne, Julya, Leticia, Lharyssa, Lucas e Maria Eduarda, por todos os ensinamentos, trabalhos em equipe e amizade. Agradeço também aos egressos Juliana, Maria Silvia, Caroline Jaques e Matheus que me acolheram inicialmente no grupo e garantiram a minha permanência.

Ao Laboratório Franco (LTDA) por ter me proporcionado a realização de estágio voluntário durante minha graduação, por toda paciência e ensinamentos, foi enriquecedor, aprendi muito com cada um de vocês.

A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA), a equipe da Socioambiental Consultores Associados e ao Instituto Orca por terem me proporcionado realizar este estudo.

Por fim, mas não menos importantes, a todos os professores que contribuíram significativamente com a minha formação.

Obrigada!

Os pequenos detalhes são sempre os mais importantes.

(Sherlock Holmes)

RESUMO

Steno bredanensis (golfinhos-de-dentes-rugosos) é uma espécie de cetáceo pertencente à família Delphinidae, com uma ampla distribuição no globo terrestre. No Brasil, exibe hábitos costeiros e por isso está suscetível a diversas ameaças antrópicas. Essa espécie de golfinho se encontra classificada como “Pouco Preocupante” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN e no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Com o intuito de aumentar as informações existentes sobre este golfinho, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e estruturação genética da espécie *Steno bredanensis* no Oceano Atlântico Sudoeste. Para isso, foram coletadas por biópsia 18 amostras de tecido de animais vivos e três provenientes de encalhe nas praias das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Essas amostras foram amplificadas com marcador mitocondrial, D-loop, e sequenciadas nas direções *forward* e *reverse*. Ainda, 284 sequências disponibilizadas no *GenBank*, acompanhando os seus respectivos números de indivíduos por haplótipo (frequências), foram acrescentadas a este estudo, ampliando o número amostral total para 305 amostras. Os índices de diversidade e coeficiente F_{ST} foram avaliados nos *softwares* DNAsp e Arlequin. As amostras coletadas referentes ao Oceano Atlântico Sudoeste foram divididas em unidades costeiras e oceânicas. Já o total de 305 amostras, foram separadas em Oceano Atlântico Oeste, Oceano Atlântico Leste e Oceano Pacífico/Índico, de acordo com suas localidades. Como resultado, as unidades amostrais costeiras e oceânicas foram altamente estruturadas ($F_{ST} = 0,744$, $p = 0,0005$) e exibiram baixos índices de diversidade (Costeiras: $h = 0,450$ e $\pi = 0,0009$; Oceânicas: $h = 0,400$ e $\pi = 0,0024$). Ao passo que, o Oceano Atlântico Oeste, Oceano Atlântico Leste e Oceano Pacífico/Índico demonstraram estruturações significativas, altas ou moderadas (Oceano Atlântico Oeste X Oceano Atlântico Leste: $F_{ST} = 0,190$, $p = 0,0029$; Oceano Atlântico Oeste X Oceano Pacífico/Índico: $F_{ST} = 0,630$, $p = 0,0000$; Oceano Atlântico Leste X Oceano Pacífico/Índico: $F_{ST} = 0,577$, $p = 0,0000$). A diferenciação observada entre as unidades do Oceano Atlântico Sudoeste pode estar atribuída a maior produtividade no ambiente costeiro, em relação ao oceânico. Enquanto seus baixos índices de diversidade, a uma possível expansão populacional. A estruturação entre o Oceano Pacífico/Índico e o Oeste e Leste do Oceano Atlântico, sugerem restrições de fluxo gênico. Desta forma, evidencia-se com este trabalho, a provável existência de duas populações de *Steno bredanensis* no Oceano Atlântico Sudoeste com hábitos de vida diferenciados e baixos índices de diversidade. Estas populações precisam ser monitoradas geneticamente para que atualizemos o seu status de conservação, principalmente as costeiras, cada vez mais impactadas por diferentes fatores antrópicos.

Palavras-Chave: Cetáceo. Conservação. Delphinidae. D-loop. Genética populacional.

ABSTRACT

Steno bredanensis (rough-toothed dolphin) is a species of cetacean belonging to the Delphinidae family, with a wide distribution on the globe. In Brazil, it has coastal habits and is therefore susceptible to various anthropic threats. This dolphin species is classified as "Least Concern" in the IUCN Red List of Threatened Species and in the Red Book of the Brazilian Fauna Threatened with Extinction. In order to increase the existing information on this dolphin, the objective of this work was to evaluate the diversity and genetic structure of the species *Steno bredanensis* in the Southwest Atlantic Ocean. For this purpose, 18 tissue samples were collected by biopsy from live animals and three from stranded animals on beaches in the South and Southeast regions of Brazil. These samples were amplified with a mitochondrial marker, D-loop, and sequenced in forward and reverse directions. In addition, 284 sequences available in GenBank, accompanied by their respective numbers of individuals per haplotype (frequencies), were added to this study, increasing the total sample number to 305 samples. The diversity indices and F_{ST} coefficient were evaluated in DNAsp and Arlequin software. The samples collected for the Southwest Atlantic Ocean were divided into coastal and oceanic units. The total of 305 samples, on the other hand, were separated into West Atlantic Ocean, East Atlantic Ocean, and Pacific/Indian Ocean, according to their localities. As a result, the coastal and oceanic sampling units were highly structured ($F_{ST} = 0.744$, $p = 0.0005$) and exhibited low diversity indices (Coastal: $h = 0.450$ and $\pi = 0.0009$; Oceanic: $h = 0.400$ and $\pi = 0.0024$). Whereas, the Western Atlantic Ocean, Eastern Atlantic Ocean and Pacific/Indian Ocean demonstrated significant, high or moderate structuring (Western Atlantic Ocean X Eastern Atlantic Ocean: $F_{ST} = 0.190$, $p = 0.0029$; Western Atlantic Ocean X Pacific/Indian Ocean: $F_{ST} = 0.630$, $p = 0.0000$; Eastern Atlantic Ocean X Pacific/Indian Ocean: $F_{ST} = 0.577$, $p = 0.0000$). The observed differentiation between the Southwest Atlantic Ocean units may be attributed to higher productivity in the coastal environment, relative to the oceanic one. While its low diversity indices, to a possible population expansion. The structuring between the Pacific/Indian Ocean and the western and eastern Atlantic Ocean suggest restrictions on gene flow. Thus, it is evident with this work, the probable existence of two populations of *Steno bredanensis* in the Southwest Atlantic Ocean with different life habits and low diversity indices. These populations need to be monitored genetically to update their conservation status, especially the coastal ones, which are increasingly impacted by different anthropic factors.

Keywords: Cetacean. Conservation. Delphinidae. D-loop. Population genetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	6
2.1 Objetivos específicos	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1 Área de estudo e coleta das amostras	6
3.2 Extração e Quantificação, Amplificação e Sequenciamento	8
3.2.1 <i>Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS)</i>	8
3.2.2 <i>Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA)</i>	8
3.3 Edição e alinhamento das sequências	9
3.4 Análises de estruturação e diversidade genética	10
4. RESULTADOS	12
4.1 Oceano Atlântico Sudoeste	12
4.1.1 <i>Primeiro teste de estruturação entre as amostras coletadas na costa do Brasil</i>	12
4.1.2 <i>Segundo teste de estruturação entre as amostras coletadas na costa do Brasil</i>	13
4.1.3 <i>Terceiro teste de estruturação entre as amostras coletadas na costa do Brasil</i>	14
4.1.4 <i>Índices de Diversidade, Testes de Neutralidade e Distribuição Mismatch</i>	16
4.2 Oceano Atlântico Oeste, Oceano Atlântico Leste e Oceano Pacífico/Índico	19
4.2.1 <i>Teste de estruturação entre amostras oceânicas</i>	19
4.2.2 <i>Índices de Diversidade e Testes de Neutralidade</i>	20
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
APÊNDICES	34

1. INTRODUÇÃO

Conhecida como golfinho-de-dentes-rugosos ou golfinho do Sudeste, a espécie *Steno bredanensis* (G. Cuvier in Lesson, 1828) pertence a ordem Cetartiodactyla, subordem Odontoceti (com dentes), família Delphinidae. Com cerca de 17 gêneros e 37 espécies, essa família é considerada como a mais numerosa e diversa dentre os mamíferos marinhos, apresentando muitas variações morfológicas e ecológicas ocasionadas por processos de adaptação distintos, tais como diferentes formas de nicho interespecíficas e variedade de alimentos (MORENO, 2008; WICKERT, 2018).

O golfinho-de-dentes-rugosos é a única espécie pertencente ao gênero *Steno*, e se encontra amplamente distribuído em águas tropicais e temperadas quentes, habitando o Oceano Pacífico, Atlântico e Índico, bem como o Mar Mediterrâneo e Caribenho. Na maior parte dos casos, exibem hábitos oceânicos-profundos, todavia, os indivíduos presentes no litoral brasileiro apresentam uma maior preferência por águas superficiais e costeiras, podendo ser observados desde o estado do Rio Grande do Sul até o Pará (SILVA, 2014; RUEDA & CABALLERO, 2015; OMS, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020; MIRANDA *et al.*, 2020) (Figura 1).

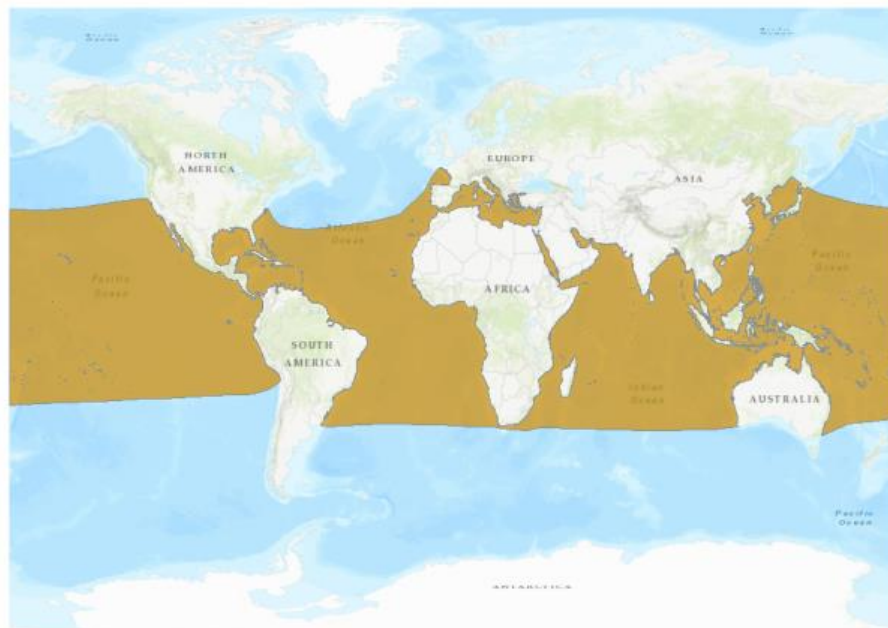


Figura 1 - Distribuição global da espécie *Steno bredanensis*, destacada em amarelo. Fonte: Kiszka *et al.*, 2019.

Esses golfinhos, variam entre 209 a 265 centímetros (cm) de comprimento em média, apresentando um peso máximo equivalente a 130 quilogramas (kg) (WEST *et al.*, 2011). Caracterizam-se pela presença de um corpo robusto, uma cabeça cônica, bico longo, nadadeira

dorsal bem demarcada, e peitorais e caudais grandes e pontiagudas. São facilmente identificados por meio de uma faixa dorsal cinza escura que se estende da cabeça a cauda, e pela ausência de separação entre o melão e o rostro. Lateralmente são cinza-claro, podendo haver na região da mandíbula, ventre e lábios cicatrizes ou manchas brancas, rosas e amarelas (Figura 2). Quando jovens, expressam uma coloração uniforme cinza claro e quando adultos, podem denotar um aspecto malhado (WEST *et al.*, 2011; VILLEGAS-ZURITA, 2015; CARDOSO *et al.*, 2019). Ademais, uma outra característica que permite a distinção do golfinho-de-dentes-rugosos das demais espécies é a presença de estreitas ranhuras verticais vistas em sua arcada dentária. Esta peculiaridade foi o que designou o nome popular dessa espécie (REIS *et al.*, 2006; JEFFERSON, 2009).



Figura 2 – Golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*). Fonte: NOAA Fisheries.

Por serem organismos sociais, comumente formam grupos de 10 a 20 indivíduos, entretanto, em populações próximas ao Havaí esses agrupamentos chegam a uma proporção superior a 300 indivíduos. Quando associados, formam subgrupos capazes de exercerem nado sincronizado, ou seja, esses golfinhos apresentam a capacidade de emergir e submergir todos ao mesmo tempo, lado a lado, estando adaptados a realizarem mergulhos longos e profundos. Usualmente, são nadadores vagarosos e pouco acrobáticos, com capacidade para emitir cliques de ecolocalização de até 200 kHz (RITTER, 2002; STRUNTZ *et al.*, 2004; JEFFERSON, 2009).

Os golfinhos-de-dentes-rugosos também expressam comportamento epimelético, isto é, ação que consiste no apoio ofertado por um indivíduo saudável a um animal doente, ferido ou morto. Nestes casos, o golfinho saudável nada com o indivíduo incapacitado suspenso à

superfície. Esta prática foi descrita tanto em animais na natureza quanto em cativeiro, podendo ser intraespecífica ou interespecífica (KUCZAJ II & YEATER, 2007; MOURA, RODRIGUES & SICILIANO, 2009; OMS, 2018). Lodi (1992) observou este comportamento na cidade de Ilha Grande, Rio de Janeiro (Brasil), onde um golfinho de *Steno bredanensis*, por aproximadamente duas horas, forneceu assistência a uma fêmea já morta para que ficasse flutuando próxima à superfície. O organismo morto pertencia à mesma espécie e apresentava idade próxima a 3 anos.

Outros tipos de interações também podem ser observadas, como as associações com outras espécies de cetáceos, dentre elas, a baleia-piloto-de-peitorais-curtas (*Globicephala macrorhynchus*), golfinho de Fraser (*Lagenodelphis mangai*), golfinho-pintado-do-atlântico (*Stenella frontalis*) e baleia-de-minke (*Balaenoptera acutorostrata*). Além disso, *Steno bredanensis* também foi visto se reproduzindo com o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e acompanhando o deslocamento de baleias-franca-do-sul (*Eubalaena australis*) e baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) (LODI & HETZEL, 1998; RITTER, 2002; JEFFERSON, 2009). Ainda, são relatadas aproximação a pássaros como as gaivotas-arenque e as fragatas para a realização de forrageamento na superfície (LODI & HETZEL, 1999; RITTER, 2002).

Sua dieta consiste em alimentação variada, forrageando várias espécies de peixes e cefalópodes oceânicos e costeiros, como por exemplo: dourado (*Coryphaena hippurus*), peixe-agulha (*Hemiramphus brasiliensis*), tainha (*Mugil curema*), peixe-espada (*Trichiurus lepturus*), sauru (*Cololabis adocetus*), e a lula (*Dorytheutis plei*) (STRUNTZ *et al.*, 2004; CARDOSO, *et al.*, 2019; KISZKA *et al.*, 2019).

Após o desmame, machos atingem sua maturidade sexual com idade próxima aos 14 anos e 225 cm de comprimento. As fêmeas, quando comparadas com os machos, expõem uma maturação mais precoce, dispondo de aproximadamente 210 cm de comprimento e faixa etária em torno dos 10 anos, sendo sexualmente dimórficos, isto é, machos maiores que as fêmeas (STRUNTZ *et al.*, 2004; HUANG, CHOU & NI, 2009; VILLEGAS-ZURITA, 2015).

A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, responsável por avaliar informações sobre os riscos de extinção global, de animais, fungos e plantas, classifica a espécie *Steno bredanensis* como “Pouco Preocupante”, o mesmo também pode ser observado no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBio, 2018). Porém, por ser bem distribuída, aspectos como abundância total, tendência populacional, comportamento, padrões de movimentação, dentre outros, ainda são pouco conhecidos, tornando a atual classificação

questionável e impedindo que melhores ações de conservação sejam exercidas (LODI & HETZEL, 1998; KISZKA *et al.*, 2019; IUCN, 2021).

Por apresentar hábitos costeiros, essa espécie está suscetível a diversas ameaças antropogênicas, tais como poluição por resíduos sólidos ou químicos, interações negativas com a pesca e encalhes (LODI & HETZEL, 1998; MEIRELLES & BARROS, 2007; OMS, 2018; MIRANDA, *et al.*, 2020). Barreto (2011), demonstrou que, no Ceará, *Steno bredanensis* é a segunda espécie mais afetada pela captura acidental, sendo a principal causa deste impacto a utilização de equipamentos de pesca, como redes de emalhe, redes de cerco e espinhel. Essas ferramentas, quando em contato com os golfinhos, provocam severas mutilações e feridas que podem resultar no falecimento do animal (LODI & HETZEL, 1998; RITTER, 2002). Com relação à poluição por resíduos, Yogui (2002) constatou que dentre os mamíferos marinhos observados na costa de São Paulo e Ilha Rei George (Antártica), o golfinho-de-dentes-rugosos foi o que obteve os maiores índices de contaminação por organoclorados, apresentando elevadas cargas de PCB's (bifenilos policlorados) e DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) em seu organismo. No entanto, pouco se sabe ainda a respeito de quais seriam os efeitos desses fatores nas populações.

Estudos que envolvem genética populacional permitem adquirir dados sobre a origem de indivíduos, sucesso reprodutivo, divergências genéticas, migração, tamanho populacional e eventos históricos, contribuindo, assim, para o aumento de informações sobre os grupos estudados (CRUZ, 2018). Para as análises populacionais, verificar a diversidade genética é imprescindível, uma vez que fornece informações sobre a variedade de alelos e genótipos presentes nas populações. Neste sentido, a manutenção da diversidade genética é essencial para a sobrevivência das espécies, permitindo que os indivíduos se adaptem às variações do ambiente, tenham uma melhor capacidade de colonização e distribuição e maior potencial para responder aos processos de seleção natural. Portanto, conhecê-la é fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável e estudos relacionados à biologia básica aplicada (CERQUEIRA, *et al.*, 2014; CRUZ, 2018; OLIVEIRA, 2021).

Entender a estruturação genética populacional também é considerada de grande relevância, justamente por estar relacionada ao padrão de distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações da espécie, buscando compreender os efeitos da seleção natural, fluxo gênico e deriva genética na diferenciação das populações em ambientes heterogêneos (MARTINS, 1987; CRUZ, 2018; SARTORI, 2018; OLIVEIRA, 2021).

Desde a década de 70, a molécula de DNA mitocondrial (mtDNA) vem sendo utilizada em estudos referentes à diversidade genética, estrutura populacional e relações filogenéticas. Características como herança matrilinear, ausência de recombinação, regiões conservadas e altas substituições de bases nucleotídicas, fazem com que o mtDNA seja um bom modelo para estudos que envolvem relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações, e eventos evolutivos recentes (ARIAS *et al.*, 2003; LOPES, 2012; REBLIN, 2016). A região do mtDNA mais recomendada para os estudos populacionais é a região não codificadora D-loop, responsável por controlar processos de replicação e transcrição do genoma mitocondrial. Ao longo dos anos, este marcador tem se mostrado eficiente no monitoramento genético de populações, na detecção de gargalos genéticos e em análises populacionais sob escalas de tempo microevolutivas que evidenciam rápidas substituições nucleotídicas e altos níveis de polimorfismo intraespecífico (PRADO *et al.*, [s.d.]; TEODORO, 2018).

Silva (2014) e Silva e colaboradores (2015) analisaram a diversidade e estruturação genética de 42 golfinhos-de-dentes-rugosos no Oceano Atlântico Sudoeste, fazendo-se o uso de marcadores D-loop e Citocromo b, que permitiram sugerir a ocorrência de três populações atlânticas de golfinho-de-dentes-rugosos (Caribe, ES + RJ e SC + RS). Contudo, os resultados obtidos não permitiram afirmar o número exato de populações ou a presença de especiação críptica no gênero *Steno*. Desta forma, foi sugerido por ambos que novos estudos fossem realizados.

Donato e colaboradores (2019) também examinaram a estrutura genética de 15 amostras de carcaças de *Steno bredanensis* encalhadas no Rio de Janeiro por meio de sequências de DNA mitocondrial. Assim como Silva (2014) e Silva e colaboradores (2015), verificaram a presença de três populações atlânticas de golfinho-de-dentes-rugosos (Caribe, ES + RJ e SC + RS).

Posto isso, é importante ampliar as informações sobre a genética da espécie *Steno bredanensis* no Atlântico Sudoeste para que, futuramente, tenha-se um melhor panorama populacional e que seja possível uma reavaliação ou confirmação do *status* de conservação da espécie no litoral brasileiro.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade e estruturação genética da espécie *Steno bredanensis* no Atlântico Sudoeste.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica de golfinhos-de-dentes-rugosos encontrados no litoral brasileiro;
- Verificar a existência de mais de uma população no Atlântico Sudoeste;
- Avaliar a história demográfica populacional da espécie *Steno bredanensis* no litoral brasileiro;
- Comparar os haplótipos dos golfinhos-de-dentes-rugosos encontrados no Atlântico Sudoeste com os das demais localidades, disponibilizados no GenBank por outros pesquisadores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e coleta das amostras

Fragmentos de tecido muscular de 21 indivíduos pertencentes a espécie *Steno bredanensis* foram coletadas nas praias das regiões Sul e Sudeste do Brasil, correspondentes ao Oceano Atlântico Sudoeste entre os anos de 2016 a 2021. Destas, dezoito foram obtidas por biópsia pelo Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS) pela equipe da Socioambiental Consultores Associados, e três foram procedentes de encalhes e adquiridas pelo Instituto Orca (ORCA) em parceria com o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA) (Figura 3).

A região amostrada caracteriza-se por haver a mistura de águas continentais com oceânicas, o encontro entre a Corrente do Brasil (quente e salina) e a Corrente das Malvinas (fria e menos salina), e a formação da Água Central do Atlântico Sul. Particularidades que permitem a este ambiente ser um dos mais dinâmicos de todos os oceanos (MINUZZI *et al.*, 2007; SOPPA, SOUZA & PEZZI, 2011; WREGGE *et al.*, 2012).

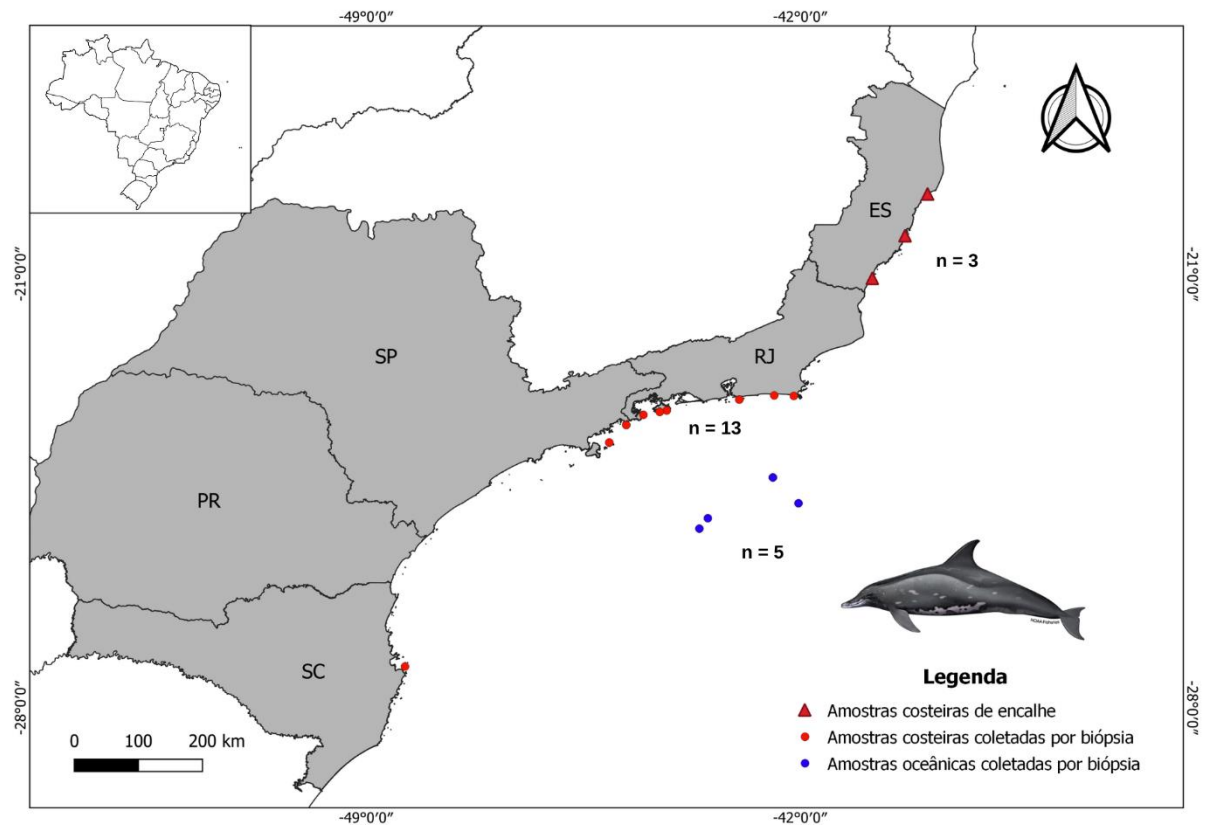


Figura 3 – Localização das amostras de *Steno bredanensis* nas praias das regiões Sul e Sudeste do Brasil, correspondentes ao Oceano Atlântico Sudoeste. Os pontos representam os indivíduos coletados por biópsia, sendo os de cor vermelha os localizados próximos à costa e os azuis em regiões oceânicas. Os triângulos referem-se aos três encalhes obtidos em ambiente costeiro. Fonte Mapa: Sandieli dos Santos Sudre. Foto de *Steno bredanensis*: NOAA Fisheries

Após a coleta do material, as amostras foram armazenadas individualmente em microtubos de 1,5 ml com álcool (70%), estocadas em freezer e enviadas aos laboratórios do PMC-BS e PMBA, onde foram feitas as análises de extração, quantificação, amplificação, purificação e sequenciamento. Em seguida, as sequências adquiridas foram cedidas ao Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) para a realização das demais análises.

Além das 21 amostras sequenciadas, foram adicionadas ao estudo 69 haplótipos correspondentes a espécie *Steno bredanensis* disponibilizados previamente no *GenBank* por outros autores. Em seus artigos de publicação, foram adquiridas informações sobre a quantidade de indivíduos representados por cada um destes haplótipos. Os 69 haplótipos correspondiam a 284 indivíduos ao todo. Dessa forma, obteve-se um total de 305 indivíduos a serem analisados, 21 deste estudo e 284 de outros trabalhos previamente publicados (Apêndice A).

3.2 Extração e Quantificação, Amplificação e Sequenciamento

3.2.1 Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS)

O DNA genômico das 18 amostras coletadas por biópsia nas praias dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina foram extraídas com o auxílio do kit *Dneasy Blood and Tissue* da Qiagen, seguindo as instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do material extraído foram avaliadas com o auxílio do espectofotômetro *NanoDrop One*.

Em seguida, a região controle do mtDNA, D-loop, foi amplificada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* DLp8 e DLp1.5 (BAKER *et al.*, 1998; GARRIGUE *et al.*, 2004). Para isso, uma solução de mix contendo 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,3U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), Tampão a 1x (Invitrogen), 20ng de DNA e 0,4μM de cada *primer*, foi produzida e submetida as seguintes condições de termociclador: 94 °C por 2 min para desnaturação inicial; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg; 55 °C por 45 seg para o anelamento dos *primers*; 72 °C por 40 seg para extensão do DNA; e 72 °C por 10 min para extensão final.

Os fragmentos amplificados foram encaminhados a Macrogen Inc. para purificação e sequenciamento (*forward e reverse*) no ABI 3730XL (Applied Biosystems).

3.2.2 Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA)

As três amostras coletadas no Espírito Santo foram submetidas ao protocolo de extração de DNA a partir de uma solução Salina (BRUFORD *et al.*, 1992, adaptado por David Vieites). Neste processo, cada fragmento de músculo foi picotado com o auxílio de um bisturi e inseridos em diferentes microtubos de 1,5ml. Em cada tubo, uma solução de lise foi realizada adicionando-se 410μl de Buffer de Extração, 80μl de SDS 10% e 10μl de Proteinase K. A solução foi incubada em banho seco a 55 °C *overnight*, para a digestão do tecido.

No dia consecutivo, as amostras foram retiradas da incubação e adicionadas a uma centrífuga refrigerada a 13000rpm por 5 minutos. Passado o tempo, o sobrenadante foi aplicado em um microtubo de 1,5ml e adicionados a ela, 180μl de NaCl, em seguida, a solução foi homogeneizada levemente por 50 vezes antes de ser encaminhada à centrífuga por mais 5 minutos. Após o tempo, o sobrenadante foi transferido novamente para um microtubo de 1,5ml, onde foi adicionado 1ml de isopropanol gelado. A solução foi invertida gentilmente 20 vezes e encaminhada à centrífuga por 7 minutos. Após este processo, o sobrenadante foi

descartado cuidadosamente e adicionados 250µl de etanol 80%, a solução foi homogeneizada invertendo-a 50 vezes, e enviada a centrifuga por mais 7 minutos. Terminado o processo, todo o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados de cabeça para baixo, para que o etanol pudesse escorrer. Passada esta fase, com as tampas ainda abertas, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 55 °C no banho seco por cerca de 10 min, para total evaporação do etanol. Logo, o DNA foi ressuspensionado adicionando-se 50µl de água ultrapura (ddH₂O) e a solução foi armazenada em um refrigerador a 4 °C para total dissolução do pellet.

Com o auxílio do espectrofotômetro *NanoDrop One*, 1µl de cada amostra de DNA foi analisado para a verificação da quantidade e qualidade do produto final extraído.

As extrações foram submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e asseguradas pelo marcador mitocondrial, D-loop, utilizando-se o par de *primers* DLp8 e DLp1.5 (BAKER *et al.*, 1998; GARRIGUE *et al.*, 2004) para gerar um fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb).

Para um volume total de 20µl, foi produzido uma solução de mix contendo 10ng de DNA, Tampão a 10x (Invitrogen), 50mM de MgCl₂, 10mM de DNTP, 5 unidades de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) e 10µM de cada primer. As condições no termociclador foram: 94 °C a 2 min para a desnaturação inicial; seguido de 35 ciclos a 94 °C a 30 seg para a desnaturação; 55 °C a 45 s para o anelamento dos *primers*; 72 °C a 40 s para a extensão da fita; e 72 °C a 10 min para sua extensão final. Após este processo, 2,5µl de cada DNA amplificado foi corado com 2µl de tampão de carregamento (*GelRed + Blue Juice*) para visualização do número de pares de bases em luz ultravioleta (UV), corridos em eletroforese com gel de agarose a 1%, e foto-documentadas em transiluminador UV.

Após a foto-documentação dos fragmentos, estes foram purificados com 1µl da enzima ExoSap-IT (USB Corporation), com o intuito de eliminar possíveis inibidores de sequenciamento. Posteriormente, os produtos purificados foram encaminhados a empresa terceirizada para sequenciamento *forward e reverse*.

3.3 Edição e alinhamento das sequências

Todas as sequências obtidas foram comparadas com as publicadas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e *DNA Surveillance* (<http://dna-surveillance.fos.auckland.ac.nz:23060/>) para a confirmação da espécie. Após confirmação, as

sequências foram editadas e alinhadas no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - MEGA11 (TAMURA *et al.*, 2021).

3.4 Análises de estruturação e diversidade genética

O software DNAsp v.6.12.03 (ROZAS *et al.*, 2019) foi utilizado para definir os testes de estruturação populacional a serem executados. Para o Atlântico Sudoeste, foram realizados três testes com o intuito de definir a melhor organização das populações para as análises de diversidade. O primeiro, consistiu na aplicação de 25 sequências (21 deste estudo e quatro do *GenBank* pertencentes ao Atlântico Sudoeste) agrupadas em diferentes unidades amostrais (UA) e avaliadas como agregações costeiras. As supostas populações e seus respectivos locais de coleta foram: UA_1 – Costa do Espírito Santo, UA_2 – Costa do Rio de Janeiro, UA_3 – Costa de São Paulo, UA_4 – Costa de Santa Catarina e UA_5 – Costa do Rio Grande do Sul (Figura 4; Tabela 1). Em contrapartida, para o segundo teste foram empregues apenas as 21 amostras coletadas neste estudo, separando as populações conforme a proximidade das amostras, sendo: UA_1 provenientes da costa do Espírito Santo, UA_2 da costa do Rio de Janeiro, UA_3 oceânicas e UA_4 oriundas da costa do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Figura 5). As 21 amostras também foram utilizadas para o terceiro teste, sendo estas, classificadas como costeiras e oceânicas, e divididas de acordo com suas distâncias geográficas: UA_1 Costa – Espírito Santo, UA_2 Costa – Rio de Janeiro, UA_3 Oceânica, UA_4 Costa – São Paulo e UA_5 Costa – Santa Catarina (Figura 6). Um quarto teste foi realizado acrescentando-se as 284 frequências haplotípicas do *GenBank* às amostras coletadas no Atlântico Sudoeste, as populações hipotéticas definidas foram: Oceano Atlântico Oeste, Oceano Atlântico Leste e Oceano Pacífico/Índico. Ainda, o programa DNAsp v.6.12.03 (ROZAS *et al.*, 2019) foi aplicado para mensurar o número de haplótipos (H) e sítios polimórficos (S), diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h), bem como os arquivos de entrada para os programas Arlequin e PopART.

Os sítios polimórficos representam alterações no DNA da população a uma frequência maior que 1%, e os haplótipos correspondem a um agrupamento de alelos ligados, herdados em blocos ao longo das gerações (QUINTANA-MURCI *et al.*, 2001; MACIEL, 2003; SILVA, 2007; NUSSBAUM *et al.*, 2016). Neto (2009) explica o conceito de diversidade haplotípica como sendo a probabilidade de escolha ao acaso de dois haplótipos diferentes. Seus resultados podem variar de 0 a 1, entretanto, os valores mais próximos de 1 indicam uma maior diversidade haplotípica (LAVAGNINI, 2011; TEIXEIRA, 2018). Distintivamente, a diversidade nucleotídica examina os polimorfismos do DNA, por meio do número médio de diferenças

nucleotídicas a cada sítio existente em duas sequências escolhidas ao acaso (NEI & TAJIMA, 1980; DANTAS *et al.*, 2013).

Para as Análises de Variação Molecular (AMOVA), índices de fixação (F_{ST}), distribuição *Mismatch* e testes de neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu) foi utilizado o programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). O teste de AMOVA consiste na avaliação do grau de diferenciação e estruturação das populações com base nos haplótipos observados e suas distâncias inter haplotípicas, possibilitando verificar a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações (EXCOFFIER *et al.*, 1992; MAGALHÃES, 2018; TEIXEIRA, 2018). O cálculo de F_{ST} proposto por Nei (1973) determina o grau de diferenciação genética entre populações a um nível de significância menor que 0,05. As medidas de F_{ST} variam em uma escala de 0 a 1, valores menores que 0,05 apontam baixa diferenciação, números maiores que 0,05 até 0,25 mostram uma estruturação moderada, enquanto valores que ultrapassam a margem de 0,25, exibem uma alta diferenciação entre populações (WRIGHT, 1978).

A distribuição *Mismatch* (ROGERS & HARPENDING, 1992) irá verificar a história demográfica das populações a partir de diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos, expressas através de uma representação gráfica. Sabendo-se disso, uma distribuição unimodal indica uma expansão demográfica recente, decorrente de uma população fundadora pequena, e curvas multimodais, populações que permanecem estáveis ao longo das gerações (ROGERS & HARPENDING, 1992; LAVAGNINI, 2011).

Por fim, os testes de neutralidade apontam se os genes avaliados se encontram sob seleção. Com o método D de Tajima é possível calcular as diferenças entre os polimorfismos e o número de divergências nucleotídicas. Se, porventura, o número de sítios polimórficos presentes em uma única sequência for maior que as diferenças par a par, o valor do teste é negativo, demonstrando uma possível expansão ou seleção populacional. Entretanto, quando o número de diferenças par a par for maior que o número de sítios polimórficos, o teste é positivo, sendo um indício de estrutura populacional (TAJIMA, 1989; DANTAS *et al.*, 2013; LINHARES, 2019). Já os índices de F_s de Fu irão aferir a probabilidade de se observar em uma amostragem aleatória neutra, números menores ou similares de alelos, permitindo detectar crescimento populacional (FU, 1997; DANTAS *et al.*, 2013).

A rede de haplótipos foi baseada nos cálculos de *Median-Joining*, por meio do programa *Population Analysis with Reticulate Trees* – PopART 1.7 (LEIGH & BRYANT, 2015). Com a rede de haplótipos construída, informações sobre a história evolutiva das populações,

biogeografia, relações genealógicas ao nível intraespecífico e dados genéticos populacionais serão passíveis de visualização (MAGALHÃES, 2018).

4. RESULTADOS

O alinhamento e edição dos fragmentos amplificados para a região D-loop dos 25 indivíduos do Oceano Atlântico Sudoeste (21 das amostras coletadas e quatro do *GenBank*) resultaram em sequências de 545 pb. Quando analisadas somente as 21 amostras coletadas neste estudo, obtiveram-se fragmentos de 659 pb, à medida que foram acrescentadas a elas, as 284 frequências de haplótipos do GenBank, o tamanho resultante foi de 266 pb.

Todas as sequências analisadas, incluindo as baixadas do banco de dados *GenBank*, foram confirmadas como sendo *Steno bredanensis*. No *GenBank*, os exemplares apresentaram uma média de 100% em sua porcentagem de identidade. Enquanto no DNA *Surveillance*, as sequências exibiram uma média de 0,034 em distância do golfinho-de-dentes-rugosos, sendo esta, muito baixa para atribuí-las à outra espécie que não seja *Steno bredanensis*.

Trinta e três frequências de haplótipos depositadas no *GenBank* não puderam ser avaliadas no DNA *Surveillance*, devido ao sítio eletrônico não estar funcionando atualmente, entretanto, estas foram devidamente conferidas e analisadas com as demais no *GenBank*.

4.1 Oceano Atlântico Sudoeste

4.1.1 Primeiro teste de estruturação entre as amostras coletadas na costa do Brasil

Para as 25 amostras pertencentes ao Oceano Atlântico Sudoeste (21 deste estudo e quatro do *GenBank*), os cálculos de diferença par a par e valor de p para F_{ST} , mostraram ser significativos e sugeriram alta diferenciação populacional entre os agrupamentos UA_3 e UA_2, exibindo medidas de F_{ST} (0,298) maior que 0,25 e valor de p menor que 0,05 (Figura 4; Tabela 1).

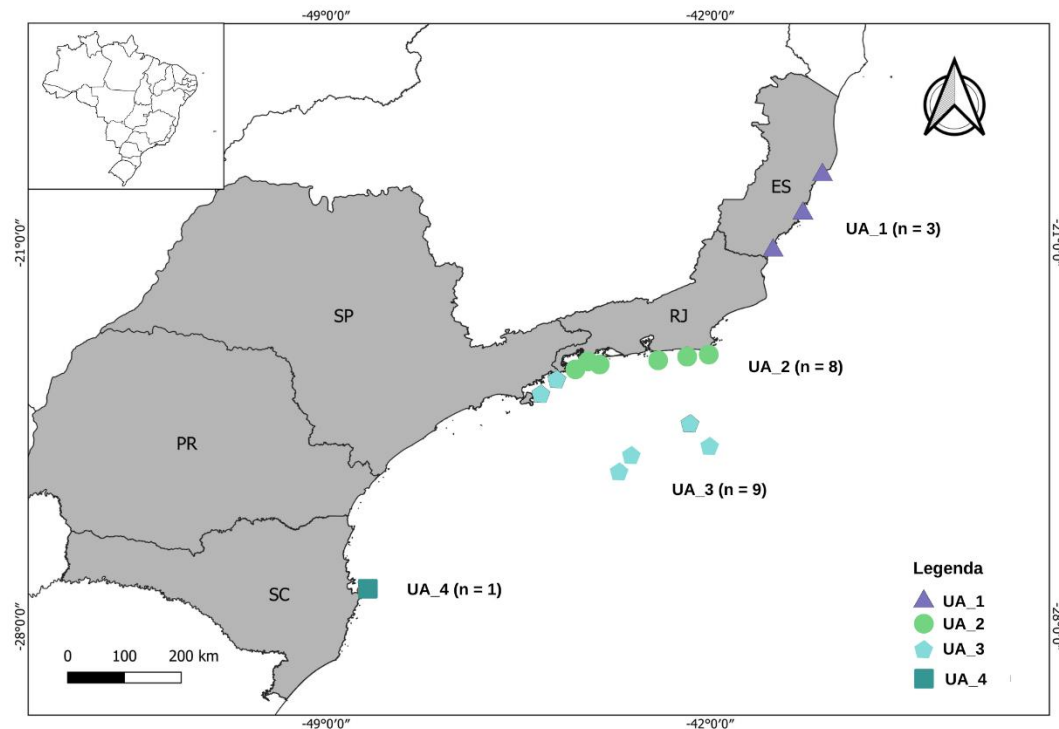


Figura 4 - Localização das amostras de *Steno bredanensis* nas praias das regiões Sul e Sudeste do Brasil, correspondentes ao Oceano Atlântico Sudoeste. As circunferências separam as coletas em diferentes unidades amostrais (UA) para efetuação do teste de estruturação; n = número de amostras para cada UA. Fonte: Alterado de Sandieli dos Santos Sudre.

Tabela 1 – Medidas de F_{ST} referente as 25 sequências de *Steno bredanensis* (21 deste estudo e quatro do *GenBank*) encontradas nas diferentes unidades amostrais (UA). Três amostras do *GenBank* foram agrupadas a população UA_2, e uma, a população UA_5. Em negrito, observa-se resultados significativos (valor de $p < 0,05$); n = número de amostras para cada UA.

Populações	UA_1 (n = 3)	UA_2 (n = 11)	UA_3 (n = 9)	UA_4 (n = 1)	UA_5 (n = 1)
UA_1 (n = 3)	-	-	-	-	-
UA_2 (n = 11)	-0,049 (p = 0,690)	-	-	-	-
UA_3 (n = 9)	0,172 (p = 0,199)	0,298 (p = 0,004)	-	-	-
UA_4 (n = 1)	1,000 (p = 0,999)	0,240 (p = 0,999)	0,136 (p = 0,999)	-	-
UA_5 (n = 1)	1,000 (p = 0,999)	0,629 (p = 0,999)	0,612 (p = 0,999)	1,000 (p = 0,999)	-

4.1.2 Segundo teste de estruturação entre as amostras coletadas na costa do Brasil

Considerando apenas as 21 amostras coletadas neste estudo, foi verificada alta estruturação significativa entre as populações UA_3 X UA_2 ($F_{ST} = 0,677$; valor de $p = 0,040$) e UA_4 X UA_3 ($F_{ST} = 0,677$; valor de $p = 0,004$) por demonstrarem medidas de F_{ST} maiores que 0,25 e valor de p menor que 0,05 (Figura 5; Tabela 2).

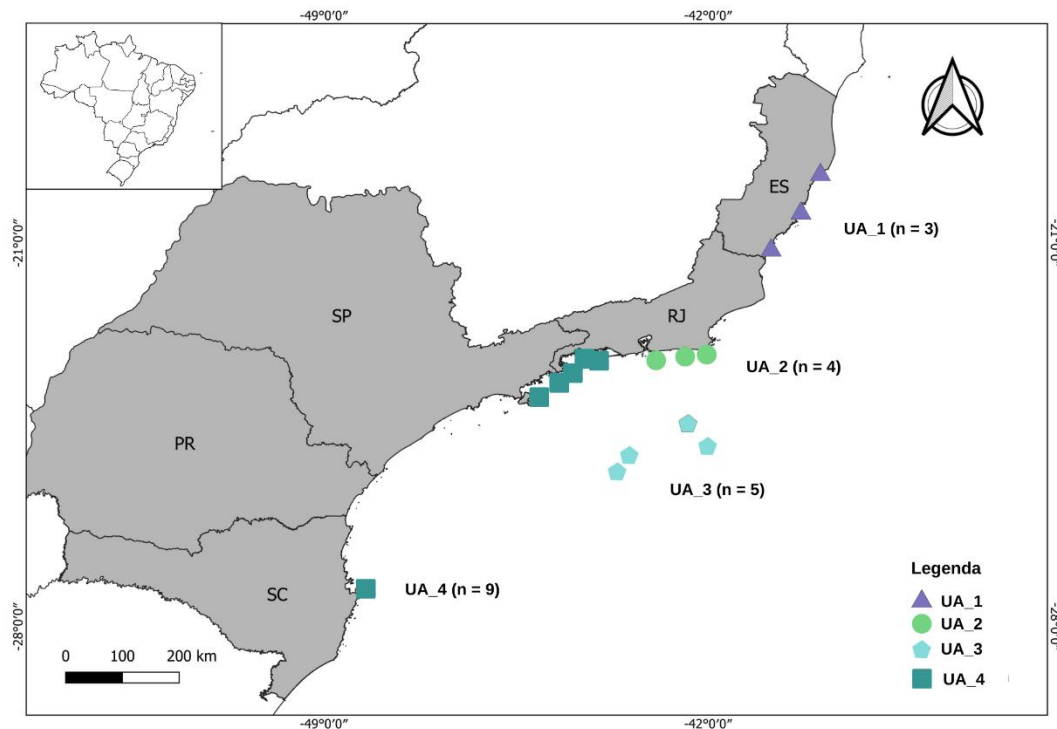


Figura 5 - Localização das amostras de *Steno bredanensis* nas praias das regiões Sul e Sudeste do Brasil, correspondentes ao Oceano Atlântico Sudoeste. As circunferências separam as coletas em diferentes unidades amostrais (UA) para efetuação do teste de estruturação; n = número de amostras para cada UA. Fonte: Alterado de Sandieli dos Santos Sudre.

Tabela 2 – Medidas de F_{ST} referente as 21 amostras coletadas neste estudo, averiguadas nas diferentes unidades amostrais (UA), UA_1, UA_2, UA_3 e UA_4. Em negrito, observa-se resultados significativos (valor de $p < 0,05$); n = número de amostras para cada UA.

Populações	UA_1 (n = 3)	UA_2 (n = 4)	UA_3 (n = 5)	UA_4 (n = 9)
UA_1 (n = 3)	-	-	-	-
UA_2 (n = 4)	-0,090 (p = 0,999)	-	-	-
UA_3 (n = 5)	0,680 (p = 0,141)	0,677 (p = 0,040)	-	-
UA_4 (n = 9)	-0,125 (p = 0,999)	0,003 (p = 0,482)	0,677 (p = 0,004)	-

4.1.3 Terceiro teste de estruturação entre as amostras coletadas na costa do Brasil

Os valores de F_{ST} para as 21 amostras coletadas no Oceano Atlântico Sudoeste indicaram alta diferenciação ($<0,05$) entre as populações: UA_3 Oceânica X UA_2 Costa ($F_{ST} = 0,768$); e UA_4 Costa X UA_3 Oceânica ($F_{ST} = 0,561$). Sendo ambas altamente significativas, $p = 0,018$ e $p = 0,027$, respectivamente (Figura 6; Tabela 3).

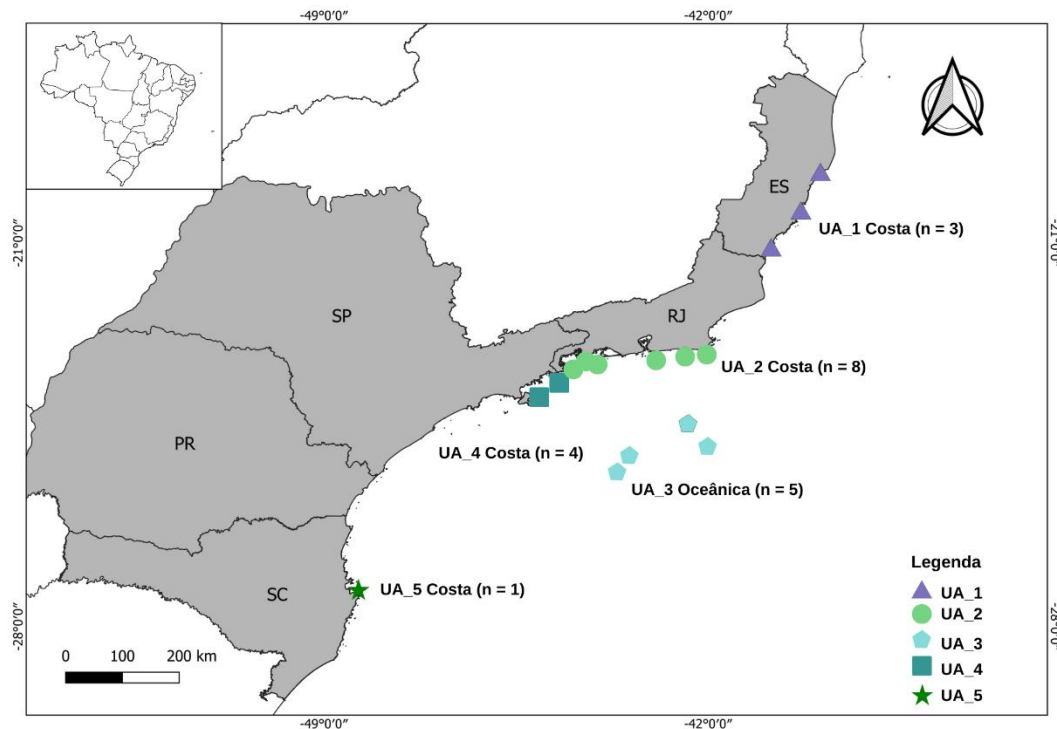


Figura 6 - Localização das amostras de *Steno bredanensis* nas praias das regiões Sul e Sudeste do Brasil, correspondentes ao Oceano Atlântico Sudoeste. As circunferências separam as coletas em diferentes unidades amostrais (UA) para efetuação do teste de estruturação; n = número de amostras para cada UA. Fonte: Alterado de Sandieli dos Santos Sudre.

Tabela 3 - Medidas de F_{ST} referente as 21 amostras coletadas neste estudo averiguadas nas diferentes unidades amostrais (UA), UA_1 Costa, UA_2 Costa, UA_3 Oceânica, UA_4 Costa e UA_5 Costa. Em negrito, observa-se resultados significativos (valor de $p < 0,05$); n = número de amostras para cada UA.

Populações	UA_1 Costa (n = 3)	UA_2 Costa (n = 8)	UA_3 Oceânica (n = 5)	UA_4 Costa (n = 4)	UA_5 Costa (n = 1)
UA_1 Costa (n = 3)	-	-	-	-	-
UA_2 Costa (n = 8)	-0,174 (p = 0,990)	-	-	-	-
UA_3 Oceânica (n = 5)	0,680 (p = 0,126)	0,768 (p = 0,018)	-	-	-
UA_4 Costa (n = 4)	-0,090 (p = 0,990)	0,120 (p = 0,135)	0,561 (p = 0,027)	-	-
UA_5 Costa (n = 1)	1,000 (p = 0,990)	0,777 (p = 0,990)	0,619 (p = 0,990)	-0,200 (p = 0,990)	-

De maneira a confirmar o teste apresentado acima, as amostras foram reagrupadas em populações Costeiras (16) e Oceânicas (5). Estas exibiram valores de F_{ST} altamente significativos ($F_{ST} = 0,744$, $p = 0,0005$), indicando uma alta estruturação populacional (Tabela 4). Este foi o agrupamento considerado mais adequado e por isso foi o utilizado para dar prosseguimento às demais análises.

Tabela 4 - Valores de F_{ST} encontrados para populações Costeiras e Oceânicas. Em negrito, observa-se resultados significativos (valor de $p < 0,05$); n = número de amostras para cada população.

Populações	Costeiras (n = 16)	Oceânicas (n = 5)
Costeiras (n = 16)	-	-
Oceânicas (n = 5)	0,744 (p = 0,0005)	-

Segundo a Análise de Variância Molecular (AMOVA), a porcentagem de variação entre as populações Oceânicas e Costeiras foi de 74,44%, sendo maior que a porcentagem de variação dentro das populações, isto é, entre indivíduos de uma mesma população, estando em 25,56%.

4.1.4 Índices de Diversidade, Testes de Neutralidade e Distribuição Mismatch

Sete sítios polimórficos foram observados nas 21 amostras do Oceano Atlântico Sudoeste (Tabela 5 e 6). Quanto a diversidade nucleotídica e haplotípica, a população Oceânica exibiu maiores valores de diversidade nucleotídica ($h = 0,400$ e $\pi = 0,0024$), enquanto a população Costeira, maiores valores de diversidade haplotípica, $h = 0,450$ e $\pi = 0,0009$ (Tabela 6).

Tabela 5 – Sítios polimórficos e frequência absoluta dos haplótipos encontrados para *Steno bredanensis* nas amostras Oceânicas e Costeiras.

Haplótipos	113	296	308	393	505	559	598	Frequência
1	T	C	C	A	T	T	T	13
2	.	T	.	G	C	C	.	4
3	C	1
4	C	1
5	.	.	T	1
6	.	T	T	1

Tabela 6 - Número amostral (N), sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) observada para as populações Oceânicas e Costeiras de *Steno bredanensis* no Atlântico Sudoeste. O total não se refere à soma dos valores, mas sim a uma única população.

Populações	N	S	H	h	π
Oceânicas	5	4	2	0,400	0,0024
Costeiras	16	4	5	0,450	0,0009
Total*	21	7	6	0,600	0,0026

Analisando o Brasil como uma única população, a diversidade nucleotídica e haplotípica foi de 0,0026 e 0,600, respectivamente. Ao todo, foram observados seis haplótipos, o mais frequente foi o haplótipo 1 aparecendo em 13 indivíduos, onde a maioria pertencia à população Costeira. O haplótipo 2 apresentou uma frequência de quatro indivíduos na população Oceânica, e os haplótipos 3, 4, 5 e 6 foram exclusivos da população Costeira, contendo um representante cada (Figura 4).

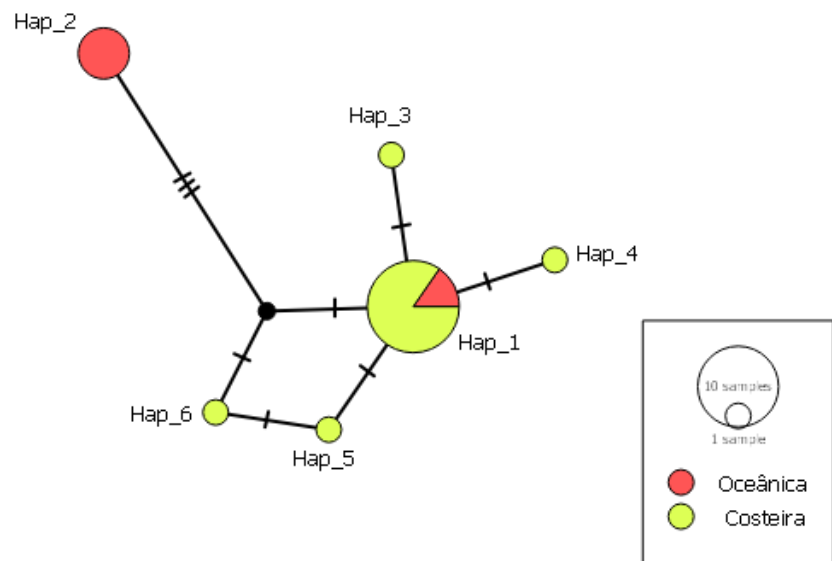


Figura 7 – Rede de haplótipos de *Steno bredanensis* para as populações Oceânicas e Costeiras. O tamanho de cada circunferência, refere-se à frequência absoluta para cada haplótipo. *Samples* = amostras.

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu não evidenciaram desvio de neutralidade e equilíbrio esperado para a população Oceânica, ou seja, não indicaram nem estruturação, nem expansão populacional. Em contrapartida, a população Costeira exibiu resultados estatisticamente negativos (D de Tajima = -1,549, valor de $p = 0,035$; e F_s de Fu = -2,751, valor de $p = 0,002$), podendo ser um indício de expansão populacional (Tabela 7). A análise de distribuição *Mismatch* para a população costeira, apresentou curva unimodal, sugerindo expansão populacional (Figura 8). Enquanto a população oceânica exibiu curva de aspecto multimodal, indicando que a população se mantém estável ao longo das gerações, sem haver expansão recente (Figura 9).

Tabela 7 – Testes de neutralidade aplicados às sequências da região controle do mtDNA, D-loop, para populações de *Steno bredanensis* no Atlântico Sudoeste. Valor de p para D de Tajima $< 0,05$ e Fs de Fu $< 0,02$. O total não se refere à soma dos valores, mas sim, a uma única população do Atlântico Sudoeste.

Populações	D de Tajima	Valor de p	Fs de Fu	Valor de p
Oceânica	-1,093	0,107	2,202	0,842
Costeira	-1,549	0,035	-2,751	0,002
Total*	-0,369	0,398	-0,600	0,353

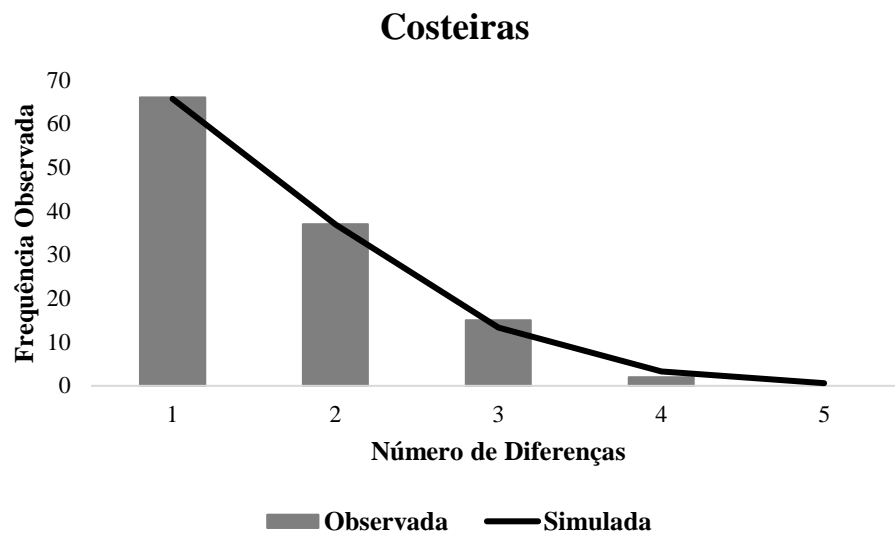


Figura 8 – Distribuição *Mismatch* da região controle do mtDNA, D-loop, de *Steno bredanensis* na população Costeira do Atlântico Sudoeste. O eixo y representa a frequência observada e o eixo x, o número de diferenças. Os valores observados são representados por barras e os valores simulados por linha.

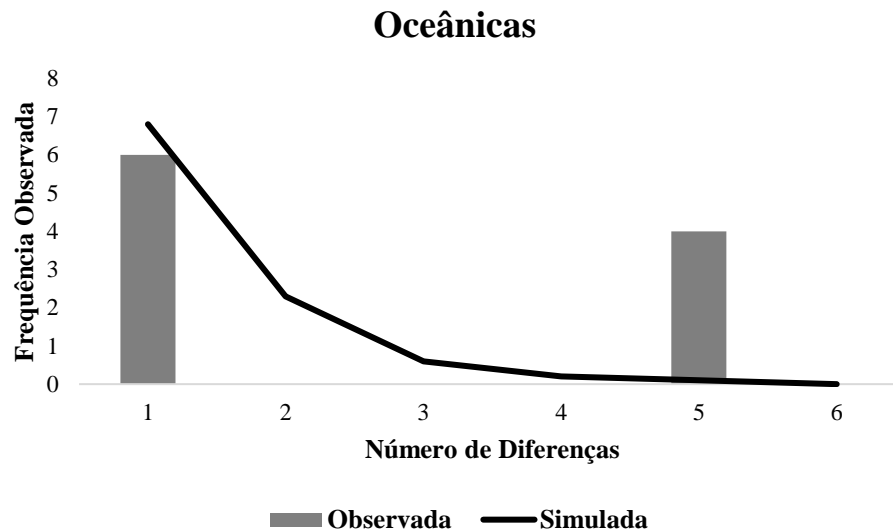


Figura 9 – Distribuição *Mismatch* da região controle do mtDNA, D-loop, de *Steno bredanensis* na população Oceânica do Atlântico Sudoeste. O eixo y representa a frequência observada e o eixo x, o número de diferenças. Os valores observados são representados por barras e os valores simulados por linha.

4.2 Oceano Atlântico Oeste, Oceano Atlântico Leste e Oceano Pacífico/Índico

4.2.1 Teste de estruturação entre amostras oceânicas

Com o intuito de promover uma análise populacional mais ampla, um total de 305 sequências de *Steno bredanensis* foram utilizadas, 21 deste estudo e 284 do *GenBank*. Analisando as populações par a par, o Oceano Pacífico/índico (OPI) mostrou-se a população mais diferenciada, com valores de F_{ST} superiores a 0,25 ($F_{ST} = 0,630$ e $p = 0,0000$ para o Oceano Atlântico Oeste (OAO); e Oceano Atlântico Leste (OAL), valores de $F_{ST} = 0,577$ e $p = 0,0000$) e haplótipos exclusivos encontrados nesta região. Por outro lado, a estruturação moderada entre OAO e OAL ($F_{ST} = 0,190$, $p = 0,0029$) é corroborada pela rede de haplótipos, por não ter evidenciado muitos haplótipos exclusivos (Figura 10; Tabela 8). A AMOVA demonstrou significativa variação entre populações (62,27%) e moderada variação dentro das populações (37,73%), também sendo um indicativo de estruturação populacional e fluxo gênico restrito.

Tabela 8 - Valores de F_{ST} encontrados para as populações do Oceano Atlântico Oeste (OAO), Oceano Atlântico Leste (OAL) e Oceano Pacífico/Índico (OPI) de *Steno bredanensis*. Em negrito, observa-se resultados significativos (valor de $p < 0,05$); n = número de amostras para cada população.

Populações	OAO (n = 57)	OAL (n = 8)	OPI (n = 240)
OAO (n = 57)	-	-	-
OAL (n = 8)	0,190 (p = 0,0029)	-	-
OPI (n = 240)	0,630 (p = 0,0000)	0,577 (p = 0,0000)	-

4.2.2 Índices de Diversidade e Testes de Neutralidade

Um total de 26 sítios polimórficos e 36 haplótipos foram evidenciados nas populações (Tabela 9). Efetuando um *ranking*, o haplótipo 27 foi o mais frequente, compartilhado por 49 indivíduos, em seguida, o haplótipo 17 com 33 indivíduos, e por último, o haplótipo 30 com 29 indivíduos, todos situados no OPI. Com relação à exclusividade, a população do OAO apresentou seis haplótipos restritos a ela (Hap 1, Hap 11, Hap 20, Hap 21, Hap 23 e Hap 33), o OAL dois haplótipos (Hap 25 e Hap 26) e OPI com vinte e cinco (Hap 2 ao Hap 10, Hap 14 ao Hap 19, Hap 24 e Hap 27 ao Hap 36). Os haplótipos 12, 13 e 22 foram compartilhados entre às três populações. A rede de haplótipos apresentou formato do tipo estrela, evidenciando expansão populacional recente, onde há alguns haplótipos centrais mais frequentes e, partindo deles, outros de menor frequência diferentes daqueles por poucos passos mutacionais. Além disso, é possível observar dois haplogrupos, um pertencente ao OPI e outro, quase exclusivo, com haplótipos do OAO e OAL (Figura 10).

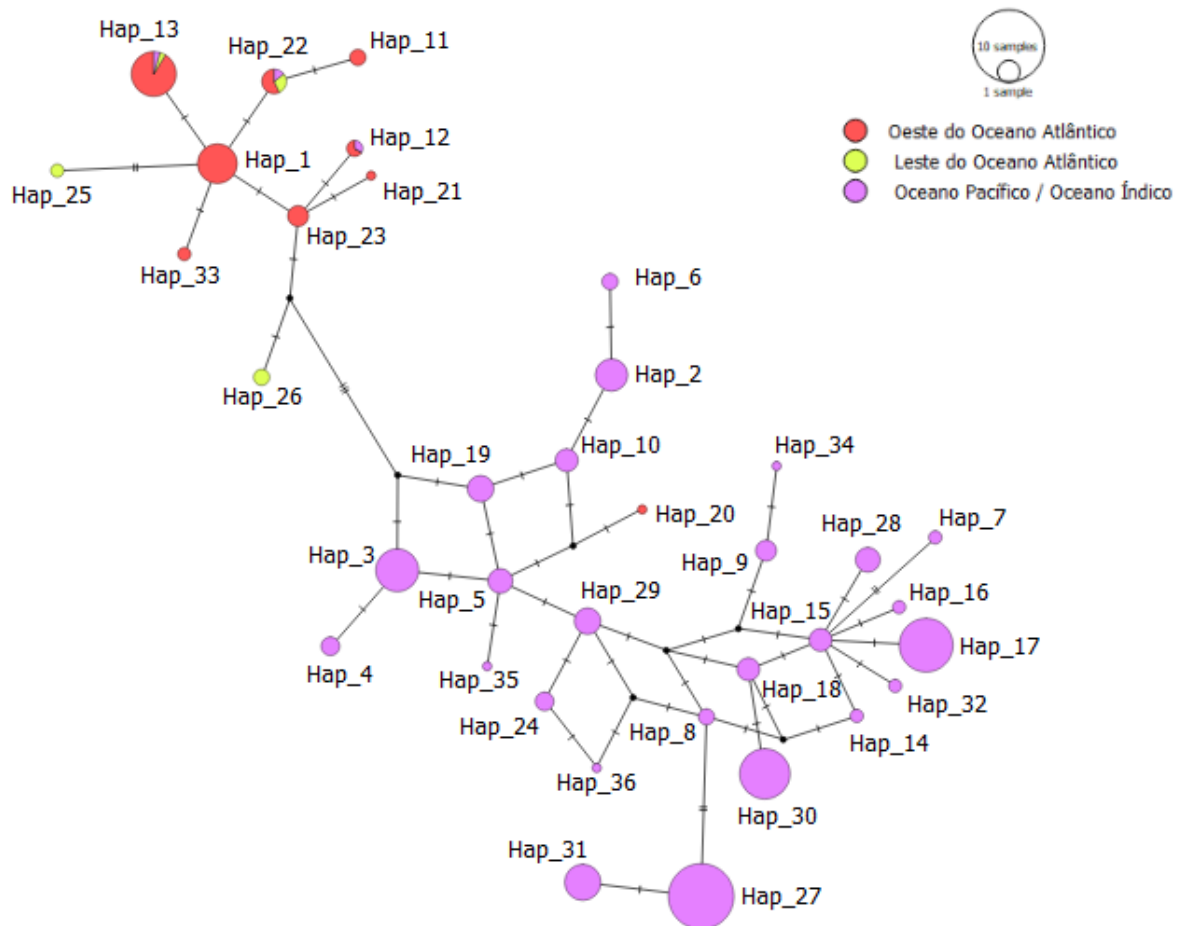


Figura 10 - Rede de haplótipos de *Steno bredanensis* para as populações Oceano Atlântico Oeste (OAO), Oceano Atlântico Leste (OAL) e Oceano Pacífico/Índico (OPI). O tamanho de cada circunferência, refere-se à frequência absoluta para cada haplótipo. *Samples* = amostras.

Em referência aos índices de diversidade, a população OPI apresentou os maiores valores para diversidade haplotípica (0,907) e nucleotídica (0,0162). Ao passo que, o OAO exibiu os menores índices de diversidade ($h = 0,759$ e $\pi = 0,0056$). Também foi feita uma análise com os indivíduos compondo uma única população, a partir deste critério, sua diversidade haplotípica e nucleotídica foi de 0,933 e 0,0223, respectivamente. Todas as populações trabalhadas, exibiram uma diversidade haplotípica alta ou moderada, e uma baixa diversidade nucleotídica (< 5%), indicando um acúmulo de mutações após um efeito gargalo (ALMEIDA *et al.*, [s.d.]). Com relação aos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu, as populações não apresentaram resultados significativos, não sendo possível evidenciar estruturação ou expansão populacional (Tabela 9).

Tabela 9 – Número amostral (N), sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π), D de Tajima / p, e Fs de Fu / p observados para as populações do Oceano Atlântico Oeste (OAO), Oceano Atlântico Leste (OAL) e Oceano Pacífico/Índico (OPI). Valor de p para D de Tajima < 0,05 e Fs de Fu < 0,02. O total não se refere à soma dos valores, mas sim, uma avaliação global de uma única população.

Populações	N	S	H	h	π	D de Tajima / p	Fs de Fu / p
OAO	57	14	9	0,759	0,0056	-1,492 / 0,053	-2,051 / 0,168
OAL	8	7	4	0,821	0,0118	0,781 / 0,783	1,103 / 0,742
OPI	240	21	28	0,907	0,0162	0,660 / 0,779	-5,004 / 0,114
Total*	305	26	36	0,933	0,0223	1,173 / 0,901	-5,333 / 0,162

5. DISCUSSÃO

Para as populações do Atlântico Sudoeste, o teste de estruturação entre populações costeiras e oceânicas foi utilizado por revelar uma população oceânica que se diferencia significativamente do agrupamento costeiro, indicando mais de uma população no Oceano Atlântico Sudoeste com hábitos de vida variados. De forma a corroborar com esta avaliação, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) também foi sugestiva de estruturação. Todavia, hábitos oceânicos não tende a ser um comportamento comum para os indivíduos de *Steno bredanensis* localizados próximos ao Brasil, pois costumam apresentar hábitos costeiros e superficiais. Neste caso, o presente estudo conseguiu atribuir novas informações sobre o comportamento da espécie nesta região.

A estruturação observada no Oceano Atlântico Sudoeste, pode ser decorrente de maior produtividade no ambiente costeiro. O Relatório Consolidado do Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS) aponta grande produtividade primária nas regiões próximas ao Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, resultantes dos processos de ressurgência que ocorrem na costa e na quebra da plataforma continental (PMC-BS, 2021).

Natoli e colaboradores (2005) analisaram a estruturação populacional de 145 golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) localizados desde o Mar Negro até a Escócia, sendo observada estruturação populacional em diferentes localidades. Os autores justificam essas diferenciações por meio de vários parâmetros, tais como, distribuição de suas presas, diferenças hidrográficas, salinidade, temperatura e eventos históricos. Louis e colaboradores (2014) também avaliaram a estrutura populacional de 405 golfinhos-nariz-de-garrafa em águas costeiras e pelágicas do Atlântico Nordeste, neste, foi verificada alta estruturação entre os

golfinhos de ambientes pelágicos e costeiros, sugerido como possíveis causas, as movimentações migratórias, classificação de linhagem incompleta ou introgressão.

Com relação aos índices de diversidade, ambas as populações, oceânicas e costeiras, exibiram valores reduzidos de diversidade haplotípica e nucleotídica, podendo ser um indicativo de expansão populacional recente, tendo em vista os testes de neutralidade negativos para a população costeira, ou mesmo algum evento de redução populacional. Destaca-se que mesmo o número amostral da população costeira ser quase o triplo da quantidade de amostras do agrupamento oceânico, ainda assim, sua diversidade haplotípica e nucleotídica foram muito próximas das estimadas para o agrupamento oceânico.

Populações que exibem altos índices de diversidade genética são consideradas populações “sadias” e bem estruturadas, à medida que, populações com baixa diversidade sugerem isolamento de poucos indivíduos, processos recentes de divergência evolutiva, varredura seletiva e efeito gargalo ou fundador (GALTIER *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; MARIN, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

Uma população com variação genética constantemente baixa está suscetível às ações da deriva genética e aos impactos ambientais e antrópicos causados. Estes, quando ocorrem, conseguem reduzir ainda mais o tamanho populacional da espécie, ao ponto de provocar sua extinção. Isso acontece, pois com a diminuição da variabilidade genética a população exibe dificuldades a longo prazo em se adaptar às mudanças de ambiente (GALTIER *et al.*, 2000; FRUET *et al.*, 2014; AZEVEDO, 2020; SILVA, 2021).

Silva e colaboradores (2015) também verificaram baixa diversidade nucleotídica e haplotípica para a população de *Steno bredanensis* do Sul do Brasil (Santa Catarina + Rio Grande do Sul), para a qual foram encontrados valores iguais a 0,00086 e 0,345, respectivamente. Sendo sugerido que esta população tenha passado por um recente processo de diferenciação, ou que apresente poucos indivíduos. Azevedo (2020) constatou baixa variabilidade genética ($h = 0,295$ e $\pi = 0,0015$) em baleias-de-bryde (*Balaenoptera brydei*) localizadas na Baía de Santos, sugerindo eventos históricos naturais, recente divergência evolutiva e gargalos demográficos para justificar sua perda de variação. Fruet e colaboradores (2014) averiguaram diversidade haplotípica moderada ($h = 0,712$) e nucleotídica baixa ($\pi = 0,009$) para 124 golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) ao longo do Atlântico Sudoeste, associando a baixa diversidade a possíveis eventos fundadores.

Quando efetuada a avaliação das populações mundiais, o Oceano Pacífico/Índico apresentou os maiores valores para diversidade haplotípica e nucleotídica, seguida do Oceano Atlântico Leste e Oceano Atlântico Oeste. O diagnóstico global com uma só população demonstrou alta diversidade haplotípica e nucleotídica baixa, assemelhando-se aos resultados de Donato e colaboradores (2019) (Tabela 10).

Tabela 10 – Localidades, espécie, diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π) e referências para *Steno bredanensis*, *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Comparação entre diferentes trabalhos.

Localidades	Espécie	h	π	Referências
Costeiras	<i>Steno bredanensis</i>	0,450	0,0009	Este estudo
Oceânicas	<i>Steno bredanensis</i>	0,400	0,0024	Este estudo
Oceano Atlântico Oeste	<i>Steno bredanensis</i>	0,759	0,0056	Este estudo
Oceano Atlântico Leste	<i>Steno bredanensis</i>	0,821	0,0118	Este estudo
Oceano Pacífico/Índico	<i>Steno bredanensis</i>	0,907	0,0162	Este estudo
Diversidade Global	<i>Steno bredanensis</i>	0,933	0,0223	Este estudo
Diversidade Global	<i>Steno bredanensis</i>	0,910	0,0140	Donato <i>et al.</i> , 2019
Diversidade Global	<i>Steno bredanensis</i>	0,839	0,0190	Silva <i>et al.</i> , 2015
Polinésia Francesa	<i>Steno bredanensis</i>	0,624	0,0110	Oremus <i>et al.</i> , 2012
Norte e Sudeste do Brasil	<i>Sotalia guianensis</i>	0,848	0,0037	Corrêa, 2010
FMAIa, Espírito Santo (Brasil)	<i>Pontoporia blainvillei</i>	0,041	0,0001	Oliveira <i>et al.</i> , 2020
São Paulo (Brasil)	<i>Pontoporia blainvillei</i>	0,476	0,0010	Cunha <i>et al.</i> , 2014

Ambas as redes de haplótipos produzidas (Figura 7 e 10) aproximam-se de formato estrela, com um haplótipo de maior frequência dando origem aos demais de menor frequência. Esta característica supõe que a espécie enfrenta um afunilamento populacional seguido de uma expansão recente (FRANCISCO, 2012; ALMEIDA, 2015). Diferente de Albertson e colaboradores (2022) que analisaram a região controle do mtDNA de 328 golfinhos-de-dentes-ruçosos e não averiguaram nenhum haplótipo do Oceano Atlântico que fosse compartilhado com populações de outras bacias oceânicas. Neste estudo, foram verificados três haplótipos do Oceano Atlântico compartilhados com o Oceano Pacífico/Índico, indicando um processo de expansão recente do Indo-Pacífico para o Oceano Atlântico (Hap: 12, 13 e 22 – Figura 6). Provavelmente, essa movimentação tenha ocorrido através da corrente das Agulhas, que se encontra localizada abaixo da África do Sul, responsável por enviar águas quentes densas para o Oeste (Oceano Atlântico). No entanto, outra hipótese seria o resultado do processo de migração a milhões de anos a partir de um ancestral de origem Pacífica (RUEDA & CABALLERO, 2015; ALBERTSON *et al.*, 2022). Ainda, o haplótipo 20 do Oceano Atlântico

Oeste foi o único observado entre os haplótipos do Oceano Pacífico/Índico, podendo ser consequência de uma ação isolada.

A rede haplotípica global também apontou uma evidente separação entre a população do Oceano Atlântico e a do Oceano Pacífico/Índico, formando dois haplogrupos. Esta organização também foi observada por Silva e colaboradores (2015), podendo ser resultante de interferências geográficas, como temperatura da água e correntes oceânicas capazes de restringir o fluxo gênico das espécies (OREMUS *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2019).

Buonaccorsi e colaboradores (2001) analisaram por marcadores moleculares a estruturação populacional do espadim azul (*Makaira nigricans*) e verificaram um limitado fluxo gênico entre o Oceano Pacífico e Atlântico, sugerindo ser decorrente de um percurso unidirecional provocado pela corrente das Agulhas.

Esta divergência verificada na rede de haplótipos corrobora com os valores de F_{ST} obtidos para as mesmas populações, apontando uma alta diferenciação populacional entre o Pacífico/Índico e Oeste e Leste do Oceano Atlântico. Albertson e colaboradores (2022) e Silva e colaboradores (2015) levantaram hipóteses de especiação críptica no gênero, ou subespécies oceânicas para estas estruturas avaliadas.

A partir do F_{ST} , também foi possível verificar diferenciação significativa entre a população do Oeste do Oceano Atlântico e Leste do Oceano Atlântico, indicando estruturação populacional. De acordo com Amaral (2018), fatores demográficos, evolutivos, ecológicos, ambientais e antropogênicos podem influenciar a distribuição dos cetáceos. Contudo, a disponibilidade de alimento seria o principal fator para sua distribuição. Albertson e colaboradores (2022) haviam sugerido a dorsal Meso-Atlântica como a responsável por essa diferenciação. Medeiros (2012) explica que a dorsal Meso-Atlântica corresponde a uma feição geológica no centro do Oceano Atlântico, capaz de determinar a distribuição das espécies, podendo ser uma justificativa para esta estruturação observada. A análise AMOVA corrobora positivamente com as diferenciações relatadas, expondo uma estruturação populacional dado ao elevado valor de variação entre populações.

Oremus e colaboradores (2012) verificaram em todas as suas áreas de estudo, comportamento de fidelidade dos golfinhos-de-dentes-rugosos aos seus locais de vida, podendo ser uma hipótese para as estruturas vistas nas populações, porém, deriva genética, especialização de presas e organização social também podem justificar esse padrão averiguado (ALBERTSON, 2014). Genoves (2019) explica que a estrutura social dos cetáceos, isto é, as

formas como um indivíduo interage com o outro, também podem atuar como barreiras não físicas e influenciar no fluxo gênico da espécie. Uma população com estabilidade social pode fazer com que os indivíduos parem de se reproduzir aleatoriamente e busquem aqueles que partilham as mesmas preferências por habitat e alimento, podendo provocar futuras estruturações.

Oremus e colaboradores (2012) avaliaram a diversidade e estruturação genética de 223 golfinhos-de-dentes-rugosos nas Ilhas da Polinésia Francesa, com marcadores microssatélites e região controle do mtDNA. Neste estudo, foi verificada divergência nos resultados entre os marcadores selecionados, onde os microssatélites apontaram índices de diversidade semelhantes para às duas populações avaliadas, enquanto a região controle do mtDNA averiguou maior diversidade para a população de Moorea. Krutzen e colaboradores (2004), observaram a estrutura de 362 golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops* sp.) em Shark Bay, Austrália, fazendo-se o uso de marcadores microssatélites e mtDNA. Ambos os marcadores revelaram alta diversidade entre as localidades analisadas, bem como significativas diferenciações, porém, os microssatélites denotaram estruturação em maiores distâncias na baía, ao passo que, os marcadores mitocondriais exibiram diferenciação em menor escala.

Ressalta-se que o baixo número amostral obtido para o Atlântico Sudoeste, impediu que fossem feitas investigações mais robustas para a região. Desta forma, sugere-se que mais estudos sejam realizados analisando-se marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, para se obter resultados mais precisos acerca da diversidade genética das populações e fornecer maior suporte para rejeitar ou comprovar as hipóteses sugeridas em um trabalho.

6. CONCLUSÃO

Dado o exposto, é possível concluir que no Oceano Atlântico Sudoeste há duas populações com hábitos de vida diversificados, sendo uma costeira e outra oceânica. Ambas com baixos índices de diversidade. A população costeira demonstrou estar passando por um processo de expansão populacional recente. E quando comparados os haplótipos do Oceano Atlântico Sudoeste com os das demais localidades, foram observadas três populações, Oceano Atlântico Oeste, Oceano Atlântico Leste e Oceano Pacífico/Índico. Desta forma, verifica-se que mesmo sendo uma espécie amplamente distribuída e categorizada como “Pouco Preocupante” nas listas de espécies ameaçadas, as estruturações genéticas encontradas nos remetem a necessidade de se olhar para as diferentes populações com maior cuidado, principalmente para aquelas costeiras, que sofrem alta pressão antrópica e podem estar ameaçadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSON, G. R. **Worldwide Phylogeography and Local Population Structure of the Rough-Toothed dolphin (*Steno bredanensis*)**. 2014. Dissertação, Doutor, Filosofia, Universidade Estadual de Oregon, 2014.
- ALBERTSON, G. R. *et al.* Worldwide phylogeography of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) provides evidence for subspecies delimitation. **Marine Mammal Science**. p. 1-27, 2022.
- ALMEIDA, F. S. **Avaliação Populacional e Diversidade Genética do Camarão Vermelho *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888)**. Disponível em: https://www.umc.br/_img/_diversos/pesquisa/pibic_pvic/XX_congresso/artigos/Fernanda_de_Sousa_Almeida.pdf. Acesso em: 25 de jul. de 2022.
- ALMEIDA, T. R. A. **Análises genético-populacionais em arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) baseadas em marcadores mitocondriais: contribuições à conservação biológica da espécie**. São Paulo, 2015. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, 2015.
- AMARAL, K. B. **Influência do Ambiente Marinho no Padrão de Distribuição e na Estrutura Genética de Mamíferos Marinhos Predadores de Topo de Cadeia**. Porto Alegre, 2018. Tese, Mestre/Doutor, Programa de Pós-Graduação em biologia Animal, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- ARIAS, M. C. *et al.* O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica**. UNESC, Criciúma, p. 305-309, 2003.
- AZEVEDO, L. D. Estrutura espaço-temporal da população de baleias-de-bryde na Bacia de Santos: uma abordagem multimétodos. Florianópolis, 2020. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.
- 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.
- BARRETO, A. S. Golfinho-de-dentes-rugosos. *In*: ROCHA-CAMPOS, C. C. *et al* (org.). Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos - Pequenos Cetáceos. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, n. 18, p. 1-132, Brasília, 2011.
- BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *In*: HOELZEL, A. R. **Molecular genetic analyses of populations: A Pratical Approach**. Oxford: IRL Press, 1992.
- BUONACCORSI, V. P. *et al.* Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). **Molecular Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1179-1196, 2001.
- CARDOSO, J. *et al.* Rough-Toothed Dolphins (*Steno bredanensis*) Along Southeastern Brazil: Report of an Anomalous Pigmented Juvenile and Description of Social and Feeding Behaviors, **Aquatic Mammals**, 45(1), 30- 36, 2019.
- CERQUEIRA, L. L. M. *et al.* Estudo Genético da Piraputanga *Brycon microlepis*. **Biodiversidade**, v. 13, n. 2, 2014.

CORRÊA, T. S. G. **Uma abordagem ecotoxicológica e evolutiva em populações do boto cinza *Sotalia guianensis* (Van Bénédén, 1875) na costa brasileira.** Rio de Janeiro, 2010. Tese, Doutor, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

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, 2019.

CRUZ, K. G. O. **Estrutura Genética Populacional do Surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linneaus, 1766) na Bacia do Pindaré-Mearim e suas Implicações para a Conservação.** São Luís, 2018. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

CUNHA, H. A. *et al.* Population structure of the endangered franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*): reassessing management units. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85633, 2014.

DANTAS, G. P. M. **Introdução à Fiogeografia Aplicada à Conservação Biológica de Vertebrados Neotropicais.** 1. ed. Editora CRV, 2013.

DONATO, A. *et al.* Population structure and the conservation status of the rough-toothed dolphins based on the analysis of the mitochondrial control region. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, 2019.

EXCOFFIER, L. *et al.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L. *et al.* Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, **Molecular Ecology Resources**, 10, 564–567, 2010.

FRANCISCO, F. O. **Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica.** São Paulo, 2012. Tese, Doutor, Biologia/Genética, da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FRUET, P. F. *et al.* Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 4, p. 879-895, 2014.

FU, Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.

GALTIER, N. *et al.* Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 981-987, 2000.

GARRIGUE, C. *et al.* Organismal and 'genetic' capture-recapture using microsatellite genotyping confirm low abundance and reproductive autonomy of humpback whales on the wintering grounds of New Caledonia. **Marine ecology progress series**, v. 274, p. 251-262, 2004.

GENOVES, R. C. **Estrutura Genética e Social do Boto (*Tursiops truncatus gephyreus*) no Estuário da Lagoa dos Patos e Águas Costeiras Adjacentes.** Rio Grande, 2019. Tese, Doutor, Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

HUANG, S.; CHOU, L. & NI, I. Comparable length at weaning in cetaceans. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 4, p. 875-887, 2009.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**, volume I, Brasília, ICMBio, 709p., 2018.

IUCN. **Red List of Threatened Species**, c2021. About. Background & History. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/about/background-history>>. Acesso em: 28 de set. de 2021.

JEFFERSON, T. A. Rough-toothed dolphin: *Steno bredanensis*. In: Encyclopedia of marine mammals. **Academic Press**, p. 990-992, 2009.

KISZKA, J. *et al.* *Steno bredanensis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2019. DOI e.T20738A50376703. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20192.RLTS.T20738A50376703.en>.

KRÜTZEN, M. *et al.* Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. **Marine Mammal Science**, v. 20, n. 1, p. 28-47, 2004.

KUCZAJ II, S. A. & YEATER, D. B. Observations of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) off the coast of Utila, Honduras. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 87, n. 1, p. 141-148, 2007.

LAVAGNINI, C. T. **Estudo do Padrão de Distribuição Genético-Haplotípico de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) em Áreas de Citros no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2011. Dissertação, Mestre, Agronomia, da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2011.

LEIGH, J. W.; & BRYANT, D. PopART: Software completo para construção de rede de haplótipos. **Métodos Ecol Evol**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LINHARES, H. H. **Diversidade Genética dos Gaivotões ao Longo de um Gradiente Latitudinal**. Belo Horizonte, 2019. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrado, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

LODI, L. Epimeletic behavior of free-ranging rough-toothed dolphins, *Steno bredanensis*, from Brazil. **Marine Mammal Science**, v. 8, n. 3, p. 284-287, 1992.

LODI, L. & HETZEL, B. O golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) no Brasil, **Revista Bioikos**, Campinas, 12 (1), 29-45, 1998.

LODI, L. & HETZEL, B. Rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, feeding behaviors in Ilha Grande Bay. **Biociências**, v. 7, p. 29-42, 1999.

LOPES, D. D. **Variabilidade Genética, Estrutura populacional e Relações evolutivas de cabras crespas com base em marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial**. Porto Alegre, 2012. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

LOUIS, M. *et al.* Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 4, p. 857-874, 2014.

MACIEL, E. M. B. B. **Determinação do Polimorfismo e Análise de 5 Marcadores do Cromossomo Y em Pernambuco**. Recife, 2003. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em genética, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

MAGALHÃES, C. O. **Análise da estrutura populacional e diversidade genética do tubarão mako (*Isurus paucus*) no Oceano Atlântico**. Botucatu, 2018. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

MARIN, J. M. **Análise da estrutura genética populacional de duas espécies de Characiformes (*Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior*) na região da bacia do Rio Madeira, Rondônia**. São Paulo, 2013. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação in situ. **IPEF**, v. 35, p. 71-78, 1987.

MEDEIROS, M. G. **Estudo Descritivo Relativo à Migração Vertical da Camada de Micronecton / Macroplankton (*Sound scattering Layer*) sobre a Dorsal Meso-Oceânica e cadeia Walvis do Atlântico Sul**. Itajaí, 2012. Monografia, Oceanografia, da Universidade do vale do Itajaí, Itajaí, 2012.

MEIRELLES, A. C. O. & BARROS, H. M. D. R. Plastic debris ingested by a rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, stranded alive in northeastern Brazil, **Revista Biotemas**, Ceará, 20 (1), 127-131, 2007.

MINUZZI, R. B. *et al.* Climatologia do comportamento do período chuvoso da região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 22, p. 338-344, 2007.

MIRANDA, A. V. *et al.* Guia Ilustrado de Identificação de Cetáceos e Sirênios do Brasil—ICMBio/CMA. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, Brasília, DF, ed. 2, p. 70, 2020.

MONTEIRO, F. *et al.* Total and subcellular Ti distribution and detoxification processes in *Pontoporia blainvillei* and *Steno bredanensis* dolphins from Southeastern Brazil, **Marine Pollution Bulletin**, 153, 1-6 p., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110975>.

MORENO, I. B. **Relações filogenéticas entre os golfinhos da família Delphinidae (Mammalia: Cetacea)**, Porto Alegre, 2008. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

MOURA, J. F.; RODRIGUES, E. S. & SICILIANO, S. Epimeletic behaviour in rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) on the east coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 2, 2009.

NATOLI, A. *et al.* Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1569, p. 1217-1226, 2005.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. & TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, v. 97, n. 1, p. 145-163, 1980.

NETO, P. Q. C. **Avaliação da diversidade e estrutura genética de *Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) através do marcador mitocondrial d-loop no Parque Estadual Morro do Diabo e em fragmentos de Mata Atlântica adjacentes**, São Carlos, 2009. Dissertação, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

NUSSBAUM, R. L. *et al.* Diversidade Genética Humana: Mutação e Polimorfismo. In: NUSSBAUM, R. L. *et al.* **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8. ed. Elsevier Editora Ltda, p. 43-54, 2016.

OLIVEIRA, V. **Diversidade e Estrutura Genéticas de *Bryconamericus aff. Iheringii* (Characiformes: Characidae) na Área de Influência do Reservatório da Itaipu**, Foz do Iguaçu, 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) - Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2021.

OLIVEIRA, V. K. M. *et al.* Low genetic diversity of the endangered franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in its northernmost, isolated population (FMAIa, Espírito Santo, Brazil). **Frontiers in Marine Science**, v. 7, p. 608276, 2020.

OMS, G. C. **Co-ocorrência, uso de habitat e movimento dos golfinhos *Steno bredanensis* e *Tursiops truncatus* no Nordeste do Brasil**, Florianópolis, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

OREMUS, M. *et al.* Pelagic or insular? Genetic differentiation of rough-toothed dolphins in the Society Islands, French Polynesia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 432, p. 37-46, 2012.

PRADO, K. S. R. *et al.* **Desenvolvimento de Primers Universais da Região D-loop do DNA Mitocondrial em Espécies do Gênero *Brycon* para Estudos Genéticos Populacionais**, [s.d.]. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Jussara-Vaini/publication/327022987_Desenvolvimento_de_primers_universais_da_regiao_DLOOP_do_DNA_mitocondrial_em_especies_do_genero_Brycon_para_estudos_geneticos_populacionais/links/5b733033299bf14c6da2423b/Desenvolvimento-de-primers-universais-da-regiao-D-LOOP-do-DNA-mitocondrial-em-especies-do-genero-Brycon-para-estudos-geneticos-populacionais.pdf.

QUINTANA-MURCI, L. *et al.* The human Y chromosome: function, evolution and disease. **Forensic science international**, v. 118, n. 2-3, p. 169-181, 2001.

REBLIN, R. D. **Diversidade e Estruturação Genética do Boto-Cinza (*Sotalia Guianensis*, Van Bénédén 1864) no Litoral do Espírito Santo**, São Mateus, 2016. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo. São Mateus, 2016.

REIS, N. R. *et al.* **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2006. 437 p. Disponível em: <http://www.uel.br/pos/biologicas/pages/arquivos/pdf/Livro-completo-Mamiferos-do-Brasil.pdf>.

PMC-BS. Relatório Consolidado 01 – Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos PMC-BS. **Petrobras**, Volume I: Apresentação e Discussão de Resultados Orientados aos Objetivos, 2021. Disponível em: https://comunicabaciadesantos.petrobras.com.br/sites/default/files/RC-01_Vol-I_PMC_Rev00_FINAL.pdf. Acesso em: 04 de ago. de 2022.

RITTER, F. Behavioural observations of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) off La Gomera, Canary Islands (1995-2000), with special reference to their interactions with humans. **Aquatic Mammals**, v. 28, n. 1, p. 46-59, 2002.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology Evolution**, 9(3), p. 552-569. 1992.

RUEDA, B. & CABALLERO, S. **Phylogeographic description of *Steno bredanensis* and *Physeter macrocephalus*, inferred from the analyses of mitochondrial DNA of stranded individuals in the Caribbean Sea**, Bogotá-Uniandes, 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Bogotá-Uniandes, 2015.

Rozas, J. *et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Mol. Biol. Evol.** v. 34, p. 3299-3302, 2017.

SANTOS, F. R. *et al.* Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. **Lundiana: International Journal of Biodiversity**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2002.

SARTORI, R. Q. **Análise da estrutura genética populacional em *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira), utilizando marcadores moleculares microssatélites**, São José do Rio Preto, 2018. Dissertação, Mestre em Genética, Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2018.

SILVA, D. M. P. **Diferenciação genética do golfinho-de-dentes-rugosos, *Steno bredanensis* (Cuvier in Lesson, 1828) (Cetartiodactyla: Delphinidae): taxonomia molecular e estrutura populacional**, Rio de Janeiro, 2014. Dissertação, Mestre, Processos Oceanográficos na Interface Continente-Oceano – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SILVA, D. M. P. *et al.* Molecular taxonomy and population structure of the rough-toothed dolphin *Steno bredanensis* (Cetartiodactyla: Delphinidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 175, 949-962, 2015.

SILVA, L. S. **Estruturação populacional e diversidade genética de golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) da Bacia de Santos, Atlântico Sul**. Florianópolis, 2021. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

SILVA, W. S. S. **Polimorfismos de DNA no Complexo de Genes da Beta-Globina em Indivíduos Normais e Portadores de Hemoglobinopatias do Recôncavo Baiano**. Brasília, 2007. Tese, Doutor, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SOPPA, M. A.; SOUZA, R. B. & PEZZI, L. P. Variabilidade das anomalias de temperatura da superfície do mar no Oceano Atlântico Sudoeste e sua relação com o fenômeno El Niño-Oscilação Sul. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 26, n. 3, p. 375-391, 2011.

STRUNTZ, W. DJ. *et al.* Persistent organic pollutants in rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) sampled during an unusual mass stranding event. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 1, p. 164-173, 2004.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K. *et al.* MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TEIXEIRA, F. L. **Estruturação Genética entre os Golfinhos-pintados-pantropicais (*Stenella attenuata*, Gray 1846) dos Oceanos Atlântico e Pacífico**. São Mateus, 2018. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2018.

TEODORO, S. S. A. **Estrutura genética populacional do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) nas costas sul e sudeste brasileira**. Botucatu, 2018. Tese, Doutora, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, A/C Zoologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

VILLEGAS-ZURITA, F. Primer registro de *Steno bredanensis* (Cetartiodactyla: Delphinidae) en la costa de Oaxaca, México. **Therya**, v. 6, n. 2, p. 483-488, 2015.

WEST, K. L. *et al.* *Steno bredanensis* (Cetacea: Delphinidae). **Mammalian Species**, v. 43, n. 886, p. 177-189, 2011.

WICKERT, J. C. **Relações filogenéticas da Subfamília Delphininae (Delphinidae: Cetartiodactyla)**. 2018. Tese, Doutora, Biologia Animal – Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

WREGGE, M. S. *et al.* Atlas climático da região sul do Brasil: estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Embrapa**, Brasília, ed. 2, p. 334, 2012.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations IV. Variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

YOGUI, G. T. **Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica)**. 2002. Dissertação, Mestre em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica, do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela referente aos 69 haplótipos da região não codificadora do DNA mitocondrial, D-loop, para a espécie *Steno bredanensis* provenientes do banco de dados, *GenBank*.

Localidades	Nº de Sequências	Nº de Acesso	Referências
Oeste do Oceano Atlântico	13	KM260657 (1); KM260656 (1); KM260655 (2); KM260654; KM260653; MW929465 (15); MW929464 (2); MW929463 (1); MW929462 (1); MW929461 (3); MW929460 (5); MW929459 (2) e JF681038 (1)	Silva <i>et al.</i> , 2015; Albertson <i>et al.</i> , 2022
Leste do Oceano Atlântico	6	MW929458 (1); MW929457 (1); MW929456 (2); MW929455 (1); MW929454 (2) e MW929453 (1)	Albertson <i>et al.</i> , 2022
Oceano Pacífico / Oceano Índico	50	KU745664 (7); KU745663 (1); KU745662 (1); KU745661 (1); KU745660 (2); KU745659 (7); KU745658 (8); KU745657 (35); KU745656 (16); KU745655 (4); KU745654 (28); KU745653 (15); KU745652 (1); KU745651 (33); JQ798157; JQ798156; JQ798155; JQ798154; JQ798153; JQ798152; JQ79815; JQ798150; JQ798149; JQ798148; JQ798147; JQ798146; JQ798145; FJ411044 (1); NC_042761 (1); MH910343 (1); MW929485 (1); MW929484 (3); MW929483 (4); MW929482 (6); MW929481 (14); MW929480 (2); MW929479 (3); MW929478 (2); MW929477 (4); MW929476 (4); MW929475 (2); MW929474 (1); MW929473 (12); MW929472 (2); MW929471 (1); MW929470 (1); MW929469 (1); MW929468 (2); MW929467 (1) e MW929466 (2)	Albertson <i>et al.</i> , 2017; Oremus <i>et al.</i> , 2012; Anoop <i>et al.</i> , 2015; Park <i>et al.</i> , 2019; Albertson <i>et al.</i> , 2022

*() = Número referente a quantidade de indivíduos por haplótipo.