

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

**DIVERSIDADE MITOCONDRIAL DO GOLFINHO-
DE-CLYMENE NO OCEANO ATLÂNTICO
OCIDENTAL**

JOICE DE SOUZA SOARES

**São Mateus/ES
Agosto/2022**

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

**DIVERSIDADE MITOCONDRIAL DO GOLFINHO-
DE-CLYMENE NO OCEANO ATLÂNTICO
OCIDENTAL**

JOICE DE SOUZA SOARES

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: Profa. Dra. Ana Paula Cazerta Farro

**São Mateus/ES
Agosto/2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Joice de Souza Soares**

Título: **DIVERSIDADE MITOCONDRIAL DO GOLFINHO-DE-CLYMENE
NO OCEANO ATLÂNTICO OCIDENTAL**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 03/08/2022

Com nota 9,5 pela comissão julgadora:

Profa. Dra. Ana Paula Cazerta Farro
Orientadora e presidente da Comissão Examinadora

MSc. Fernanda Lopes Teixeira

Prof. Dr. Luiz Fernando Duboc da Silva

Signer ID: 6WJWQ20DZ8...

“O que fazemos ao oceano, fazemos a nós mesmos”

Sylvia Earle

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer a Deus por todas as bênçãos recebidas até aqui, não foram poucas. Segundo, à minha família, pois sem eles nada disso seria possível.

Minha eterna gratidão ao meu avô Zé (*in memoriam*) por despertar em mim o respeito e a admiração pela natureza. À minha avó Dulce, minha alma gêmea, por todo amor, carinho, sabedoria, cumplicidade e por ser meu maior exemplo.

Agradeço à minha mãe Alice por ser tão acolhedora, minha maior incentivadora, que mesmo não entendendo meus planos me apoia em tudo. Ao meu pai Josemar e irmão Julio por todo apoio e incentivo. E também à Ana, por ser tão inspiradora e gentil comigo.

Gratidão ao meu noivo Thiago, o qual seremos colegas de profissão e companheiros de vida. Com ele aprendi coisas importantes para meu crescimento pessoal e profissional, além de ser a fonte de paz que me faz flutuar em sonhos reais. Amar é tudo!

Gostaria de agradecer à minha orientadora Ana por ser tão generosa e cuidadosa comigo, por acreditar em mim e por todos os ensinamentos. Ao apoio da equipe do GECOM, em especial à Dri, Helô, Gabi O., Manu, Ray, Karla, Polly e João, que se dispuseram a me ajudar neste trabalho. À Mylla, Dahi, Van e Sandi pela companhia durante o estágio.

Agradeço ao PMC-BS, em especial à Ana Lúcia Cypriano por ceder dados fundamentais para a elaboração deste estudo. E também aos demais parceiros do laboratório pela colaboração com as amostras (AQUASIS, IMA, CMA e Projeto Golfinho Rotador).

Gratidão à Kelly e aos amigos do TAMAR por todo aprendizado, companheirismo e diversão nesses anos de voluntariado, vocês foram essenciais para me tornar bióloga. À minha amiga Fernanda, parceira das tartarugas e dos golfinhos, que tenho o prazer de conviver e aprender com esse ser tão amável, meu exemplo de dedicação.

Agradeço aos amigos que viraram família na república Praiana, Mai, Cadu, Bruna, Nay e aos amigos que fiz na graduação, Juliana, Samires, Jackson, Aparício, Ana Bia, Carlos, Thaís e Ellen, Júlia, Michelle, Gabi, Fabrício, Yasmim, Barbara, Izabella, Silvinha e muitos outros.

Enfim, obrigada prof. Duboc e Fernanda por aceitarem meu convite para compor a banca.

Gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
<i>Objetivo geral</i>	4
<i>Objetivos específicos</i>	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
<i>Amostragem</i>	5
<i>Extração, amplificação e sequenciamento do material genético</i>	7
<i>Análises de diversidade e estruturação genética</i>	8
4. RESULTADOS	10
<i>Oceano Atlântico Sul Ocidental</i>	10
<i>Oceano Atlântico Ocidental</i>	11
5. DISCUSSÃO	13
<i>Oceano Atlântico Sul Ocidental</i>	13
<i>Oceano Atlântico Ocidental</i>	14
6. CONCLUSÃO	16
7. REFERÊNCIAS	16
APÊNDICE A	21
ANEXO 1	22

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabelas	Páginas
1. Amostras de <i>Stenella clymene</i> deste estudo, com as localidades divididas em Atlântico Sul Tropical (AST), Atlântico Sul Subtropical (ASS) e Atlântico Norte (AN).....	6
2. Número de haplótipos (H), sítios polimórficos (Sp), diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π), D de Tajima e F_s de Fu para o Atlântico Sul Ocidental. Valor de p significativo em destaque	10
3. Valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) e P (acima da diagonal) calculados entre pares para Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul (AS), Atlântico Sul Tropical (AST), Atlântico Sul Subtropical (ASS) e Atlântico Norte mais Atlântico Sul Tropical (AN+AST), em negrito os valores significativos.....	12
4. Percentual de variação genética entre as populações e dentro das populações, resultante da AMOVA.....	13

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figuras	Páginas
1. Golfinho-de-Clymene (<i>Stenella clymene</i>) (Ilustração de Uko Gorter; JEFFERSON, 2018).....	1
2. Distribuição geográfica de <i>Stenella clymene</i> (JEFFERSON et al., 2015)...	2
3. <i>Stenella clymene</i> em comportamento aéreo (Foto de Eric Angel Ramos)..	3
4. Mapa dos locais de coleta das amostras de <i>Stenella clymene</i> do Brasil. Círculos indicam amostras oriundas de encalhes e triângulos amostras de biópsia.....	6
5. Mapa da localidade das amostras de <i>Stenella clymene</i> estudadas, divididas em Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul Tropical (AST) e Atlântico Sul Subtropical (ASS). Círculos indicam amostras oriundas de encalhes e triângulos amostras de biópsia.....	7
6. Rede de haplótipos de <i>Stenella clymene</i> no Oceano Atlântico Sul, com os indivíduos agrupados de acordo com os locais de coleta no Brasil. Círculo cinza destacando o possível haplogrupo de FN.....	10
7. Gráfico de distribuição <i>mismatch</i> de <i>Stenella clymene</i> no Oceano Atlântico Sul. No eixo x há o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto que no eixo y há a frequência das diferenças. Colunas exibem os valores observados e linhas os valores simulados.....	11
8. Rede de haplótipos de <i>Stenella clymene</i> no Oceano Atlântico Ocidental, com os indivíduos agrupados em Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul Tropical (AST) e Atlântico Sul Subtropical (ASS). Círculo cinza destacando o possível haplogrupo do AN e quadrado cinza chamando atenção para o agrupamento de FN - AST e AN.....	12

RESUMO

O golfinho-de-Clymene (*Stenella clymene*) é um pequeno cetáceo endêmico do Oceano Atlântico tropical e subtropical, que habita águas profundas. Informações sobre a espécie são limitadas devido aos avistamentos e encalhes não serem frequentes. Um estudo anterior sugeriu a hipótese de existir uma população única no Oceano Atlântico Sul Ocidental, entretanto, poucas amostras do Nordeste brasileiro foram usadas para tal. Diante disso, este trabalho objetivou testar essa hipótese com uma maior representação da espécie no Atlântico Sul. Para isso, foram analisados os dados de 43 sequências da região de controle do DNA mitocondrial (317pb), divididos em três conjuntos amostrais, de acordo com o local de amostragem: Atlântico Norte (AN), com sequências disponíveis no GenBank (N=15), Atlântico Sul Tropical (AST), de amostras de indivíduos encalhados no Nordeste brasileiro (N=14) e Atlântico Sul Subtropical (ASS), de amostras oriundas de biópsia do Sul do Brasil (N=14). Os testes estatísticos foram feitos no programa Arlequin e as redes de haplótipos foram elaboradas através do programa Network. Os resultados mostraram altas diversidades haplotípica e nucleotídica nos conjuntos do Atlântico Sul (AS) e foram encontradas evidências de expansão populacional para o AS. No teste de estruturação foi observada diferença significativa entre os conjuntos amostrais AN e ASS ($F_{ST}=0,11/p=0,01$). Ademais, ao unir AN+AST foi verificada estruturação quando comparado com ASS ($F_{ST}=0,05/p=0,01$) e entre AN e AS (AST+ASS) também foi observada estruturação ($F_{ST}=0,06/p=0,00$). Foram encontrados 33 haplótipos no total, com apenas três compartilhados, evidenciando fluxo gênico entre os conjuntos amostrais (AN, AST e ASS). Baseado na análise do DNA mitocondrial, este estudo encontrou apenas uma população no AS. Entretanto, os indivíduos da região sul subtropical (ASS) se mostraram diferenciados geneticamente, o que pode ser decorrente das correntes oceânicas, que delimita a distribuição da espécie, e também de uma possível expansão populacional de *S. clymene* no limite sul de distribuição. Além do mais, a hipótese de existir outra população mais ao sul do Atlântico não foi descartada, considerando o baixo tamanho amostral deste estudo. A continuidade desta avaliação com mais amostras e a análise de marcadores nucleares poderá contribuir para a melhor compreensão da estrutura populacional da espécie.

Palavras-Chave: Cetáceo. D-loop. Genética populacional. *Stenella clymene*.

ABSTRACT

The Clymene dolphin (*Stenella clymene*) is a small cetacean endemic of the tropical and subtropical Atlantic Ocean, which inhabits deep waters. Information about it is limited, because your sightings and strandings are infrequent. A previous study suggested the hypothesis of a different population in the Southwestern Atlantic Ocean, but few samples and only from Northeastern Brazil were used. Therefore, this study aimed to test this hypothesis with a better representation of the species in the South Atlantic. For this, data from 43 mtDNA control region sequences (317bp) were analyzed, divided into three groups, according to the sampled location: North Atlantic (AN), with sequences from GenBank (N=15), Tropical South Atlantic (AST), from samples of stranded individuals (N=14) found along the Northeastern Brazil coast, and Subtropical South Atlantic (ASS), provided by biopsy samples in the South of Brazil (N=14). Statistical tests were executed by Alerquin program and the haplotype networks were obtained using the Network software. The results showed high haplotype and nucleotide diversities in the South Atlantic (AS) groups and evidence of population expansion for the AS was found. In the structuring test, a significant difference was observed between the AN and ASS sample groups ($F_{ST}=0.11/p=0.01$). Furthermore, when AN and AST were merged, structuring was verified when compared with ASS ($F_{ST}=0.05/p=0.01$) and between AN and AS (AST+ASS) structuring was also observed ($F_{ST}=0.06/p=0.00$). A total of 33 haplotypes were found, with only three shared, showing gene flow between the sample sets (AN, AST and ASS). Based on mitochondrial DNA analysis, this study found only one population in AS. However, individuals from the southern subtropical region (SSA) were genetically differentiated, which may be due to ocean currents, which delimit the species distribution, and also to a possible population expansion of *S. clymene* in the southern limit of distribution. Furthermore, the hypothesis that there is another population further south of the Atlantic was not ruled out, considering the small sample size of this study. The continuity of this study with more samples and the analysis of nuclear markers will contribute to better understanding the population structure of this species.

Key-words: Cetacean. D-loop. Genetic population. *Stenella clymene*.

1. INTRODUÇÃO

Stenella clymene (GRAY, 1850) pertence à classe Mammalia, ordem Cetartiodactyla e família Delphinidae (RICE, 2009). É conhecido popularmente por golfinho-de-Clymene, golfinho clímene e golfinho-fiandeiro-de-bico-curto, sendo o primeiro nome mais utilizado. O nome popular da espécie vem do grego, deusa do mar, Clymene (filha de Oceanus e Tethys) (PERRIN et al., 1981; JEFFERSON & CURRY, 2003). Espécie considerada pequena, *S. clymene* mede cerca de 190 cm e pesa entorno de 80 kg (JEFFERSON et al., 1995). Possui um padrão tricolor com o dorso cinza escuro, a lateral cinza claro e o ventre branco, além de um “bigode” no rosto, sendo a característica mais marcante para o diagnóstico da espécie (PERRIN et al., 1981) (Figura 1). Sua identificação por observação é difícil, pois possui o corpo e extremidades similares a de outras espécies, como *Delphinus delphis* e outras do gênero *Stenella* (*S. longirostris*, *S. coeruleoalba*, *S. attenuata* e *S. frontalis*) (PERRIN et al., 1981; JEFFERSON & CURRY, 2003).

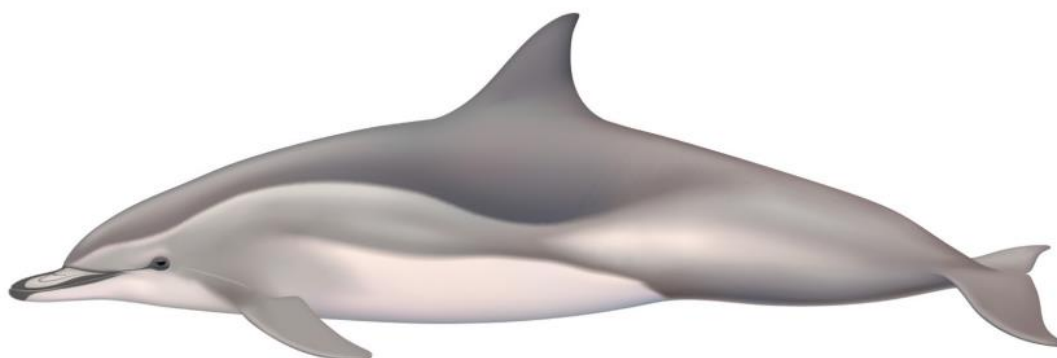


Figura 1 – Golfinho-de-Clymene (*S. clymene*) (Ilustração de Uko Gorter; JEFFERSON, 2018).

O golfinho-de-Clymene é endêmico do Oceano Atlântico tropical e subtropical, sua distribuição abrange principalmente águas oceânicas profundas com cerca de 1.800 metros de profundidade, mas pode habitar regiões litorâneas como demonstrado na Figura 2 (FERTL et al., 1997; JEFFERSON et al., 2015). Recentemente, um indivíduo foi registrado encalhado no litoral da Argentina, fora do limite de distribuição da espécie (HERNANDEZ-ORTS et al., 2021). Dorneles (2015) pontuou que a espécie pode ocorrer em águas próximas da costa, porém profundas, como no talude e além da plataforma continental. As correntes marinhas e as regiões de alta produtividade demarcam a distribuição da espécie, bem como para outros cetáceos (CAÑADAS et al., 2002; DORNELES, 2015).

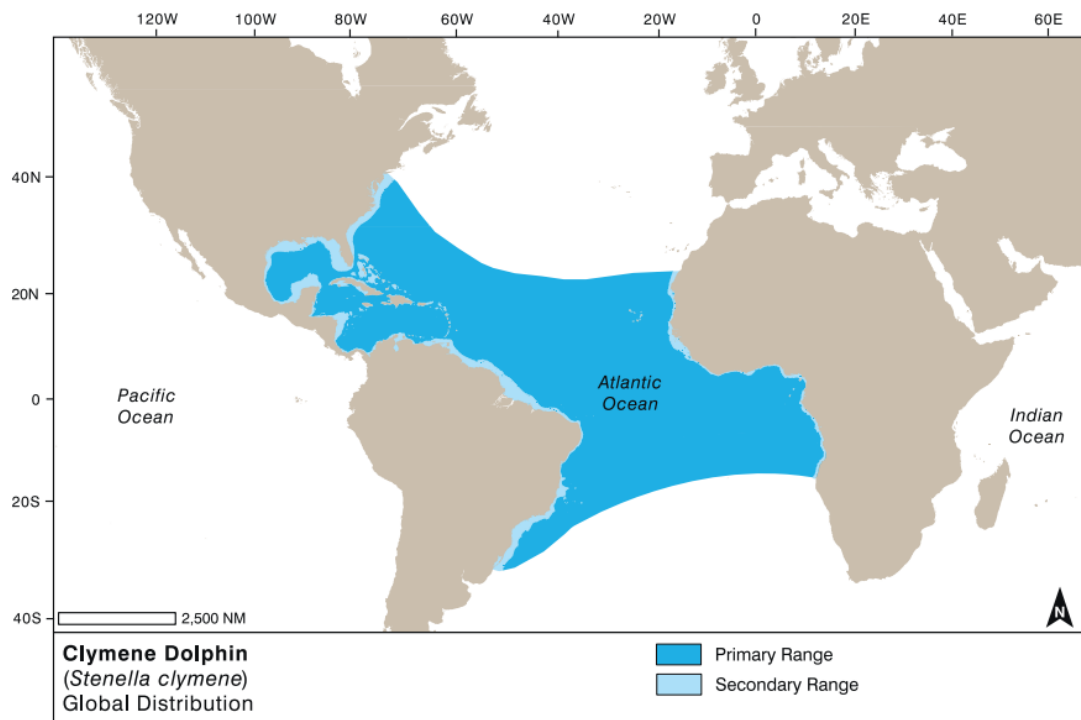


Figura 2 – Distribuição geográfica de *Stenella clymene* (JEFFERSON et al., 2015).

Segundo estudos de alimentação de *S. clymene*, em diversos locais do Oceano Atlântico, a dieta da espécie é em grande parte composta por peixes mesopelágicos (JEFFERSON & BRAULIK, 2018). Nos Estados Unidos observou-se que apresentam hábitos noturnos com uma dieta de cardumes de peixes pequenos (JEFFERSON, 2018). No Golfo do México foi registrado o comportamento de alimentação cooperativa entre os indivíduos do grupo (FERTL & WURSIG, 1995). Em Gana, foram encontrados peixes, cefalópodes e crustáceos no conteúdo estomacal de golfinhos-de-Clymene encalhados (SAKYI et al., 2019).

A reprodução de *S. clymene* se dá quando a fêmea atinge a maturidade sexual, com cerca de 171 cm e o macho com 175 cm de tamanho corporal (PERRIN et al., 1981). A história de vida da espécie ainda não foi documentada devido à falta de um tamanho amostral suficiente, mas acredita-se que seja semelhante à de outros golfinhos do gênero *Stenella* (JEFFERSON, 2018). Outras informações existentes sobre a espécie são limitadas, principalmente relacionadas à população, por conta de sua distribuição ser restrita ao Oceano Atlântico e da baixa incidência de avistamentos e encalhes.

A espécie já foi avistada em grupos de tamanho pequeno e em grupos com cerca de 200 indivíduos (PERRIN et al., 1981; MULLIN et al., 2004; WEIR et al., 2014). Os golfinhos-de-Clymene normalmente acompanham embarcações (MULLIN et al., 2004) e se associam com golfinhos de outras espécies (JEFFERSON & BRAULIK, 2018). Além disso, apresentam

comportamento aéreo (Figura 3), podendo saltar em torno do próprio corpo (MULLIN et al., 2004), o que contribui para possíveis confusões na identificação, pois há outras espécies que realizam o mesmo comportamento. Muitos indivíduos possuem mordidas e cicatrizes de tubarões-charuto (JEFFERSON, 2018; MIGNUCCI-GIANNONI et al., 2021), sendo os grandes tubarões e as orcas seus prováveis predadores (JEFFERSON, 2018).



Figura 3 – *Stenella clymene* em comportamento aéreo (Foto de Eric Angel Ramos).

S. clymene está listada como Pouco Preocupante (LC, *Least-Concern*) na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (2018) e no livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção do ICMBio (2018). As principais ameaças para a espécie são as capturas intencional e acidental na pesca, com maiores registros no Caribe e na costa oeste da África (JEFFERSON & CURRY, 2003; JEFFERSON & BRAULIK, 2018). No Brasil não há tantos registros, mas as ameaças são reconhecidas pelo Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos Pequenos Cetáceos do ICMBio (2011). Outra ameaça é a exploração de petróleo e gás, que pode ocasionar derramamentos acidentais de petróleo e produtos químicos (JEFFERSON & CURRY, 2003), atividade intensa no Atlântico Sul.

Na taxonomia a espécie está posicionada próxima a *S. longirostris* e *S. coeruleoalba* dentro do gênero *Stenella* (PERRIN et al., 1981). Existe a hipótese de que a espécie tenha surgido de um evento de hibridação, entre *S. longirostris* e *S. coeruleoalba* (AMARAL et al., 2014), entretanto, no estudo de Kessler (2019) não foram encontradas evidências genéticas para corroborar tal hipótese, sendo apenas encontradas evidências de um evento de introgressão.

Ademais, apesar da semelhança morfológica com *S. longirostris* (SILVA et al., 2005), não foi encontrado hibridação entre as duas espécies no estudo de Faria et al. (2022) para marcadores mitocondriais. Na filogenia baseada na região de controle do DNA mitocondrial, *S. clymene* é provavelmente grupo irmão de *S. coeruleoalba* e *S. frontalis* (NARA, 2015; FARIA et al., 2022).

O DNA mitocondrial possui menos recombinações que o DNA nuclear e é um material genético haploide de herança materna (WAN et al., 2004). Esse tipo de marcador tem sido amplamente utilizado em estudos de diversidade genética, devido a sua eficiência em análises com amostras com DNA de baixa qualidade, como oriundos de encalhe (FRANKHAM et al., 2008). Uma das regiões mais variáveis no DNA mitocondrial é a região controle não codificadora chamada D-loop (*displacement loop*), sendo amplamente utilizada em estudos genéticos envolvendo cetáceos (TEIXEIRA, 2021; OLIVEIRA et al., 2020; SILVA, 2021) e outros organismos, como peixes (MACHADO et al., 2016; BARROS, 2020).

Sobre a genética populacional da espécie, Nara et al. (2017) apontaram a possibilidade de existir pelo menos três populações bem definidas de *Stenella clymene*, uma no Oceano Atlântico Norte, outra no Golfo do México e a última no Oceano Atlântico Sul. Alta diversidade haplotípica foi encontrada para a espécie no Atlântico Sul (NARA et al., 2017; FARIA et al., 2022). No hemisfério norte a espécie é bem conhecida (BAUMGARTNER et al., 2001; FERTL et al., 2003; MULLIN et al., 2004; WEIR, 2006), no entanto, o estudo de Nara et al. (2017) foi o primeiro estudo populacional com a espécie no hemisfério sul, entretanto, essa população até aquele momento só foi representada por oito indivíduos do Nordeste brasileiro, de amostras oriundas de encalhes usando o marcador D-loop.

Diante disso, estudos genéticos populacionais com amostras de outras localidades tornam-se necessários, para melhor compreensão das populações do golfinho-de-Clymene em sua área de ocorrência, principalmente no Atlântico Sul.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a diversidade e estruturação genética de golfinhos-de-Clymene de diferentes localidades da costa brasileira, focando principalmente o Oceano Atlântico Sul Ocidental.

Objetivos específicos

- Estimar a diversidade genética por meio de marcador mitocondrial (D-loop) de animais coletados no Atlântico Sul Subtropical;
- Inferir a existência de estruturação entre os indivíduos amostrados na região sul subtropical, comparando com os da região sul tropical já avaliados em outro estudo;
- Avaliar as relações entre as populações do Oceano Atlântico das porções norte e sul, com sequências disponibilizadas no GenBank.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de pele dos golfinhos foram coletadas pelo Programa de Monitoramento de Cetáceos, realizado na Bacia de Santos (PMC-BS) pela Socioambiental Consultores Associados junto à PETROBRAS, como condicionante ambiental do Licenciamento Ambiental Federal do Pólo Pré-Sal da Bacia de Santos implementado pelo IBAMA. A coleta foi através do método de biópsia com balestras (120 e 150 bar de pressão) e dardos flutuantes (corpo de fibra de carbono e flutuador de poliuretano) com ponteiros de aço inoxidável, e estas foram desenvolvidas especialmente para amostragem de cetáceos (CETA-DART, Copenhagen, Dinamarca). As sequências de DNA foram definidas e cedidas pela equipe do PMC-BS. Com isso, foram obtidas 14 sequências da região controle do DNA mitocondrial de *S. clymene* da região Sul do Brasil (Figura 4; Tabela 1).

Outras 14 sequências de *D-loop* de golfinho-de-Clymene foram obtidas no banco de dados do Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES-UFES. Essas sequências correspondem a amostras coletadas na região Nordeste do Brasil (Figura 4), oriundas de encalhes, cedidas pelos parceiros Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), Instituto Mamíferos Aquáticos (IMA), Centro Mamíferos Aquáticos (CMA) – ICMBio e Projeto Golfinho Rotador (PGR) (Tabela 1), já utilizadas em estudos anteriores (NARA et al., 2017; FARIA et al., 2022).

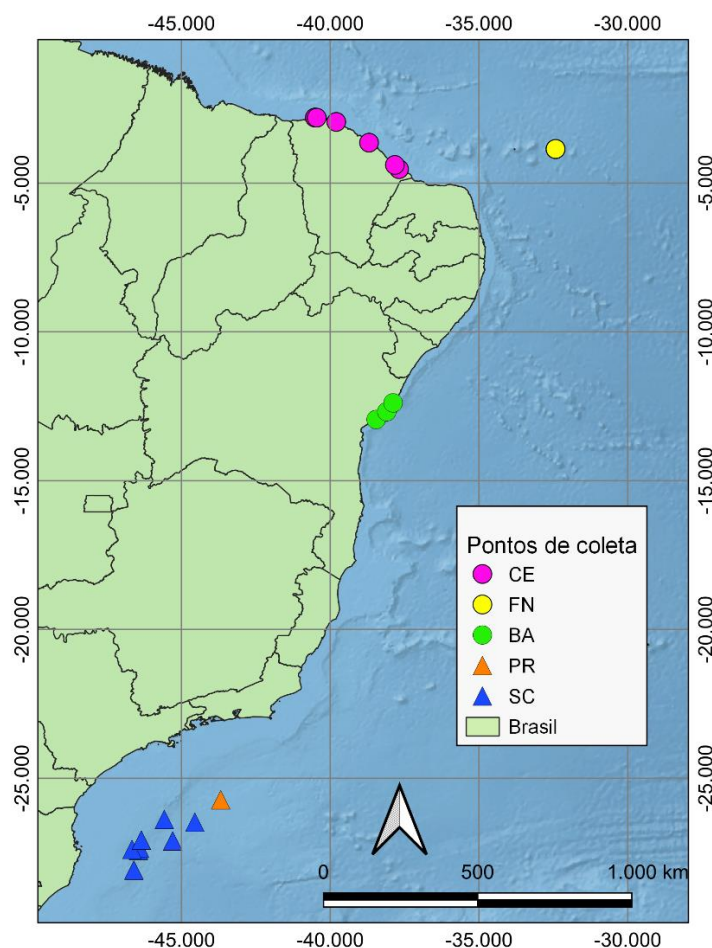


Figura 4 – Mapa dos locais de coleta das amostras de *Stenella clymene* do Brasil. Círculos indicam amostras oriundas de encalhes e triângulos amostras de biópsia.

Ademais, 14 sequências da região de controle mitocondrial da espécie foram baixadas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), correspondendo ao Oceano Atlântico Norte Ocidental de um estudo realizado por Kingston et al. (2009), com amostras de animais encalhados. Outra sequência, também extraída do GenBank, de um animal encalhado recentemente no Mar do Caribe, na Colômbia (MIGNUCCI-GIANNONI et al., 2021) foi incluída no estudo (Figura 5; Tabela 1). O código de acesso do GenBank dessas sequências pode ser visualizado no anexo 1.

Tabela 1 – Amostras de *S. clymene* deste estudo, com as localidades divididas em Atlântico Sul Tropical (AST), Atlântico Sul Subtropical (ASS) e Atlântico Norte (AN).

Nº amostral	Local de amostragem	Região	Método de coleta	Procedência
03	Costa da BA	AST	Encalhe	IMA
06	Costa do CE	AST	Encalhe	AQUASIS e CMA
05	Fernando de Noronha/PE	AST	Encalhe	PGR
13	Litoral de SC	ASS	Biópsia	PMC-BS
01	Litoral do PR	ASS	Biópsia	PMC-BS
14	Atlântico Norte Ocidental	AN	Encalhe	GenBank
01	Mar do Caribe, Colômbia	AN	Encalhe	GenBank

Conjuntos amostrais foram formados de acordo com os locais de coleta. As amostras oriundas da região Sul do Brasil foram agrupadas em Atlântico Sul Subtropical (ASS) e as provenientes do Nordeste brasileiro foram unidas em oceano Atlântico Sul Tropical (AST), ambos representando o Atlântico Sul (AS). As demais foram incluídas em Atlântico Norte (AN), como ilustrado na Figura 5.

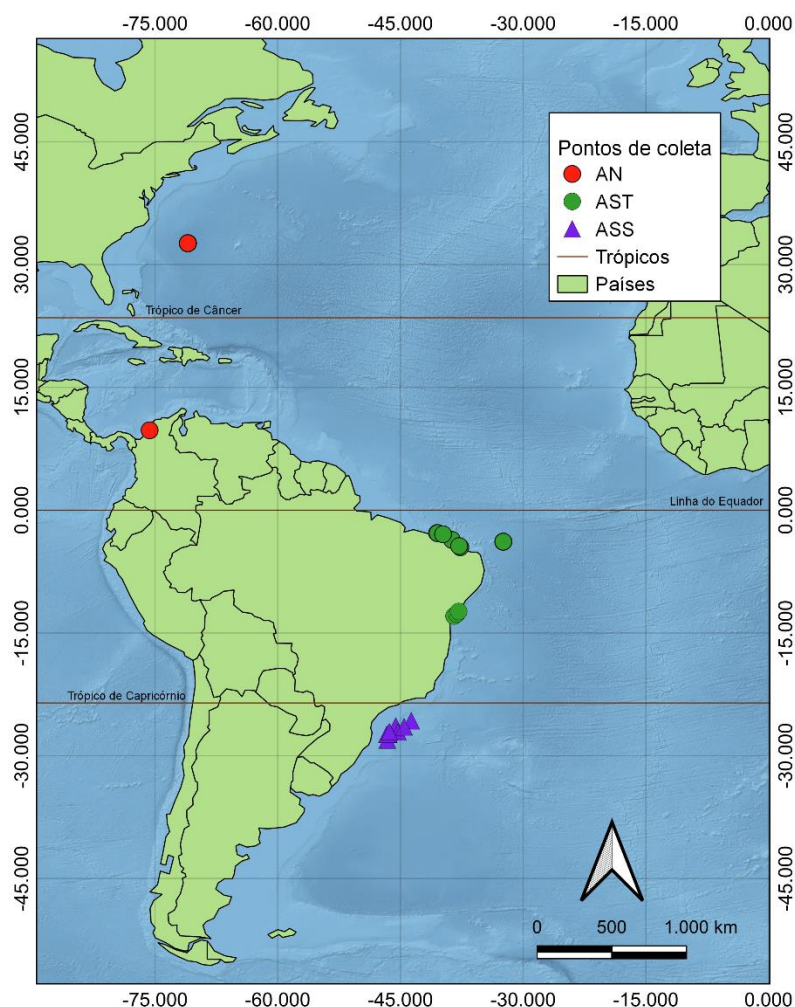


Figura 5 – Mapa da localidade das amostras de *S. clymene* estudadas, divididas em Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul Tropical (AST) e Atlântico Sul Subtropical (ASS). Círculos indicam amostras oriundas de encalhes e triângulos amostras de biópsia.

Extração, amplificação e sequenciamento do material genético

As amostras de pele de biópsia do PMC-BS foram analisadas no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em Porto Alegre – RS. O DNA foi extraído utilizando o *Dneasy Blood and Tissue Kit* da Qiagen, seguindo o protocolo do fabricante. A amplificação da região de controle do DNA mitocondrial foi realizada com os *primers* Dlp1.5 (BAKER et al., 1998) e Dlp8G (PICHLER et al., 2001). Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 2,5 Mm de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μM de cada *primer*, 0,3 u da enzima Platinum Taq DNA

Polymerase (Invitrogen), 1 X o tampão de reação (Invitrogen) e 1 µl de DNA. O perfil da PCR no termociclador foi de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 40 segundos, e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram enviados para a Macrogen Inc. para purificação e sequenciamento em duas direções (*forward* e *reverse*), em um sequenciador ABI 3730XL (*Applied Biosystems*).

A análise das amostras de músculo provenientes de encalhes do Nordeste brasileiro foi feita no LGCA, anteriormente. A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo de solução salina de Bruford et al. (1992). Após a extração, o DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria no Nanodrop-One. A amplificação da região do marcador *D-loop* foi realizada com os *primers* Dlp1.5 e Dlp8G (BAKER et al., 1998; PICHLER et al., 2001). As reações da PCR foram conduzidas com um volume final de 20µl com 20 ng de DNA, tampão de PCR 10 X (Invitrogen), 1 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada *primer*, 0,4 mM de dNTPs e 0,14 u de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O perfil da PCR consistiu de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 40 segundos, com extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose corados com Bluejuice e Gelred, depois foto-documentados. A purificação do material amplificado foi realizada com 1 µL da enzima ExoSap-IT (USB Corporation) e os fragmentos foram enviados para sequenciar, em ambas as direções.

Assim que todas as sequências foram recebidas, para a confirmação da espécie, as sequências foram comparadas com outras disponíveis nos bancos de dados GenBank, através da ferramenta BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), e DNA Surveillance (ROSS et al., 2003). Todas as sequências obtidas foram alinhadas e cortadas em um tamanho consenso usando o *software* MEGA X (KUMAR et al., 2018), totalizando 43 indivíduos amostrados com um fragmento de 317 pares de base (pb) em cada sequência.

Análises de diversidade e estruturação genética

No programa Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER et al., 2010) foram calculados os componentes de variância, como as diversidades haplotípica (*h*) e nucleotídica (π), os testes de estruturação (F_{ST}), a Análise de Variância Molecular (AMOVA), a distribuição *mismatch* e os testes de neutralidade *D* de Tajima (1989) e *F_s* de Fu (1997). O programa DnaSP v.5 (ROZAS et al., 2010) foi utilizado para calcular o número de haplótipos e gerar os arquivos de entrada para os programas Arlequin e Network. As redes de haplótipos foram construídas no programa Network com cálculos de Median-Joining (BANDELDT et al., 1999), com apoio da ferramenta

MP Calculation que simplificou as redes diminuindo os *median vectors*. Ao todo, duas redes de haplótipos foram obtidas, uma com as amostras do Atlântico Sul (AST e ASS) e outra com todas as sequências utilizadas no estudo (AN, AST e ASS). As imagens das redes foram editadas no software Inkscape (HARRINGTON, 2004-2005).

Haplótipo é uma região do DNA haploide herdada unitariamente. A diversidade haplotípica (h) estima a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso serem diferentes e equivalentes à heterozigosidade esperada em diploides (NEI & TAJIMA, 1981). Já a diversidade nucleotídica (π) é a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos retirados ao acaso serem diferentes em uma população (NEI, 1987).

A AMOVA avalia as informações sobre o conteúdo dos haplótipos, tal como suas frequências e relações. O F_{ST} é o índice de fixação e seus valores variam de 0 a 1. Quanto maior esse valor, maior é a diferenciação entre as populações ($F_{ST} < 0,05$ diferenciação baixa; $0,05 < F_{ST} < 0,25$ diferenciação moderada; $F_{ST} > 0,25$ diferenciação alta) (WRIGHT, 1978). O valor de p é o nível de significância e, para este estudo, somente os valores abaixo de 0,05 revelaram estruturação entre as populações.

A análise *mismatch* calcula a distribuição do número de diferenças entre pares de haplótipos para estimar parâmetros de demografia e expansão populacional. A distribuição unimodal caracteriza populações que passaram por expansão populacional recente, ao passo que a distribuição multimodal reflete populações em equilíbrio demográfico a longo prazo (ROGERS & HARPENDING, 1992).

O teste de Tajima compara o número de sítios polimórficos na amostra e no número médio de diferenças entre pares de haplótipos. Valores negativos de D sugerem expansão populacional e os positivos podem sinalizar a existência de um gargalo populacional recente (TAJIMA, 1989). O índice F_s de F_u é a probabilidade de observar alelos em uma amostra, dependendo do número das diferenças emparelhadas. Este teste é um indicador de mudança no equilíbrio da população. Valores negativos de F_s indicam seleção direcional recente, seleção de alelos ligeiramente deletérios ou expansão populacional. Os valores de p são considerados significativos quando menor que 0,02 (FU, 1997). Juntos, esses dois testes analisam a influência das mutações sobre a história de vida das populações.

4. RESULTADOS

Oceano Atlântico Sul Ocidental

A partir dos dados gerados pelo programa Arlequin, foi possível observar em AS os valores de 0,96 +/- 0,02 de diversidade haplotípica (h) e 0,17 +/- 0,09 de diversidade nucleotídica (π). Ao dividir AS em duas unidades amostrais, foram vistos os valores de $h = 0,97 \pm 0,03$ e $\pi = 0,21 \pm 0,11$ para AST e $h = 0,91 \pm 0,59$ e $\pi = 0,13 \pm 0,08$ para ASS, como indicado na Tabela 2.

Tabela 2 – Número amostral (N), Número de haplótipos (H), sítios polimórficos (Sp), diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π), D de Tajima e Fs de Fu para o Atlântico Sul Ocidental. Valor de p significativo em destaque.

	N	H	Sp	h	π	D	Fs
AS	28	20	30	0,963+/-0,02	0,171+/-0,09	-0,80503 (p=0,20)	-8,84764 (p=0,00)
AST	14	12	23	0,978+/-0,03	0,211+/-0,11	-0,39872 (p=0,34)	-4,27946 (p=0,02)
ASS	14	9	16	0,912+/-0,59	0,136+/-0,12	-0,19573 (p=0,47)	-1,53888 (p=0,19)

O número de haplótipos foi igual a 20, com apenas um compartilhamento. O haplótipo H_2 foi compartilhado entre um indivíduo da Bahia e quatro de Santa Catarina (Figura 6). A rede de haplótipos das amostras do Brasil está representada na Figura 6, e com ela foi possível observar um possível haplogrupo em Fernando de Noronha, com apenas um haplótipo distante dos demais. A maioria dos haplótipos se mostraram exclusivos, para alguns a separação por muitos passos mutacionais (Figura 6).

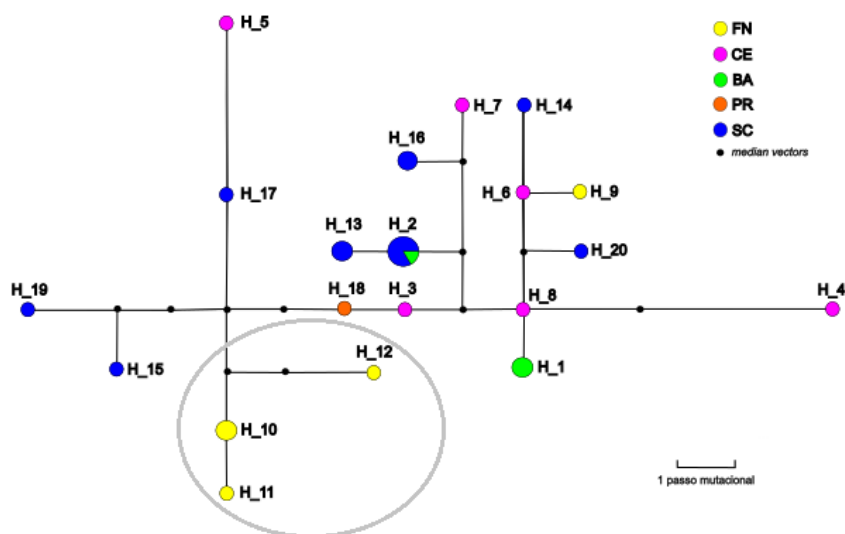


Figura 6 – Rede de haplótipos de *S. clymene* no Oceano Atlântico Sul, com os indivíduos agrupados de acordo com os locais de coleta no Brasil. Círculo cinza destacando o possível haplogrupo de FN.

O teste de estruturação (F_{ST}) entre AST e ASS não revelou estruturação populacional ($F_{ST} = 0,02$ e $p > 0,05$), indicando a presença de uma população no AS. A AMOVA mostrou que o percentual de variação entre as populações (AST e ASS) foi de 2,18% enquanto que dentro das populações foi de 97,82% (Tabela 3).

Como não foi vista estruturação entre AST e ASS, ambos foram tratados como uma única população na análise de distribuição *mismatch*. O gráfico (Figura 7) apresentou uma curva unimodal, indicando que o que a população pode ter passado por uma recente expansão demográfica (ROGERS & HARPENDING, 1992). Os valores de D de Tajima e F_s de F_u para o AS, ASS e AST que foram negativos, com p significativo apenas no AS ($p < 0,02$) (Tabela 2), reafirmando uma possível expansão populacional.

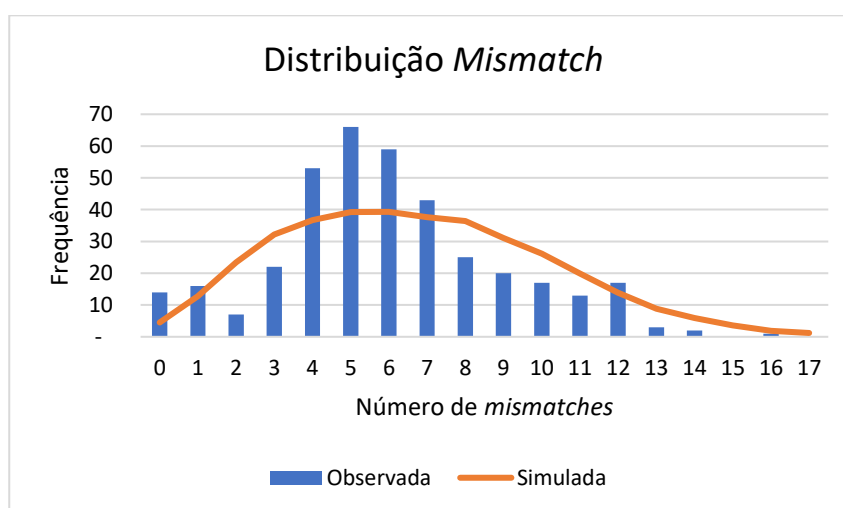


Figura 7 – Gráfico de distribuição *mismatch* de *S. clymene* no Oceano Atlântico Sul. No eixo x há o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto que no eixo y há a frequência das diferenças. Colunas exibem os valores observados e linhas os valores simulados.

Oceano Atlântico Ocidental

Não foi possível calcular os índices de diversidades haplotípica e nucleotídica para o AN, pois as sequências do Atlântico Norte Ocidental (KINGSTON et al., 2009) baixadas do GenBank não estavam acompanhadas da frequência dos haplótipos.

Um total de 33 haplótipos foram detectados, sendo três compartilhados. O haplótipo H_2 foi compartilhado entre quatro indivíduos de Santa Catarina (ASS) e um da Bahia (AST), o haplótipo H_10 uniu dois indivíduos de Fernando de Noronha (AST) e um do Atlântico Norte (AN) e, por último, o haplótipo H_20 foi compartilhado entre um indivíduo do Paraná (ASS) e um do oceano Atlântico Norte (AN) (Figura 8). A rede de haplótipos completa (Figura 8) apontou um possível haplogrupo para o AN, além do compartilhamento do H_10 entre um

indivíduo de FN e outro do AN, que antes havia formado um possível haplogrupo na rede do AS (Figura 6). Os demais haplótipos foram exclusivos, desfavorecendo a distinção de outros grupos. No apêndice A é possível observar os sítios polimórficos e as frequências de todos os haplótipos, bem como a localidade deles.

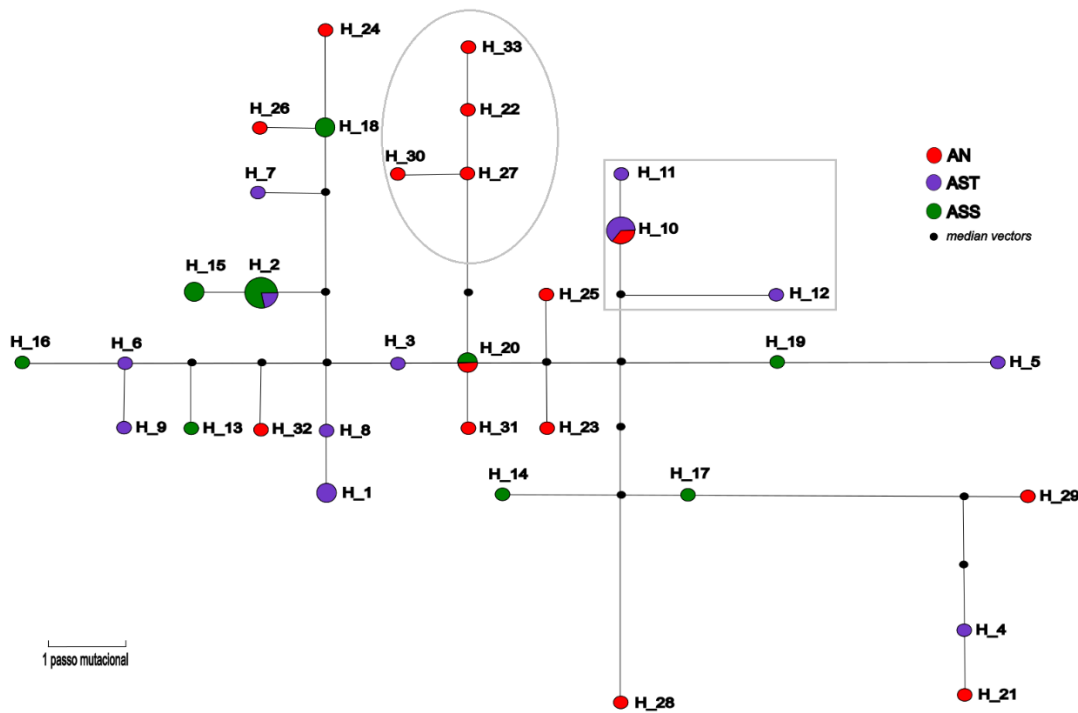


Figura 8 – Rede de haplótipos de *Stenella clymene* no Oceano Atlântico Ocidental, com os indivíduos agrupados em Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul Tropical (AST) e Atlântico Sul Subtropical (ASS). Círculo cinza destacando o possível haplogrupo do AN e quadrado cinza chamando atenção para o agrupamento de FN - AST e AN.

Os valores de F_{ST} e p das supostas populações quando comparadas entre pares estão descritos na Tabela 3. Foi observada estruturação entre os conjuntos amostrais AN e AS ($F_{ST}=0,06$; $P<0,05$), AN e ASS ($F_{ST}=0,11$; $P<0,05$), e o agrupamento de AN+AST com ASS ($F_{ST}=0,05$; $P<0,05$). A análise de divergência genética (F_{ST}) apontou para baixa diferenciação entre esses pares, exceto para AN e ASS que apresentou um valor intermediário, indicando diferenciação moderada.

Tabela 3 – Valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) e p (acima da diagonal) calculados entre pares para Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul (AS), Atlântico Sul Tropical (AST), Atlântico Sul Subtropical (ASS) e Atlântico Norte mais Atlântico Sul Tropical (AN+AST), em negrito os valores significativos.

	AN	AS	AST	ASS	AN+AST
AN	*	0,00 +/- 0,00	0,21 +/- 0,04	0,01 +/- 0,01	-
AS	0,06820	*	-	-	-
AST	0,02059	-	*	0,16 +/- 0,04	-
ASS	0,11610	-	0,02508	*	0,01 +/- 0,01
AN+AST	-	-	-	0,05878	*

Com a AMOVA foi possível calcular o percentual de variação entre as populações e dentro delas, evidenciando baixa variabilidade interpopulacional e alta intrapopulacional em todos os agrupamentos, posto na Tabela 4.

Tabela 4 – Percentual de variação genética entre as populações e dentro das populações, resultante da AMOVA.

	Interpopulacional	Intrapopulacional
AN + AST + ASS	5,33%	94,67%
AN + AS	6,73%	93,27%
AST + ASS	2,18%	97,82%
(AN+AST) + ASS	5,80%	94,20%

5. DISCUSSÃO

Oceano Atlântico Sul Ocidental

Os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram altos para as duas unidades amostrais (AST e ASS) do litoral brasileiro, e ao analisar todas em um único grupo (AS) também. Esse dado foi encontrado por Nara et al. (2017) para *S. clymene* com outros marcadores mitocondriais (COI e Cyt B). Altos índices de h também foram relatados em outras espécies do gênero *Stenella* (FARIA et al., 2022): *S. longirostris* (VOLPI, 2012), *S. frontalis* (CABALLERO et al., 2013), *S. coeruleoalba* (FREIRE, 2017) e *S. attenuata* (TEIXEIRA, 2021). Dos valores de π para o AS e as unidades amostrais AST e ASS foram mais altos do que os encontrados por Nara et al. (2017). Tal resultado pode estar relacionado ao maior número amostral e as diferentes localidades incluídas neste estudo. O valor de π encontrado foi similar ao encontrado por Freire (2017) em *S. coeruleoalba* para o Oceano Atlântico Sul.

Foram encontrados 20 haplótipos para o AS, valor alto considerando-se o número amostral de 28 indivíduos. Com exceção do haplótipo H_2, a maioria foram haplótipos exclusivos ($H=19$). O H_2 foi compartilhado entre um indivíduo da BA e quatro de SC, sugerindo que a amostra coletada na BA, através de um encalhe, pode não ser exatamente desta localidade. Por tratar-se de uma espécie oceânica, com preferência por águas profundas (FERTL et al., 2003; WEIR, 2006), os eventos de encalhes são raros e, quando ocorrem, não se sabe exatamente de onde o indivíduo veio. A amostragem em áreas oceânicas, através de biópsia, traz uma maior confiabilidade quanto a real área de ocorrência da espécie e sua identificação molecular.

Na rede de haplótipos do AS ficou perceptível um possível haplogrupo em Fernando de Noronha, PE. Todas as amostras agrupadas em AST foram provenientes de encalhes e maior parte dos registros de observação de *S. clymene* no Oceano Atlântico Sul Ocidental são do Nordeste do Brasil (FERTL et al., 2003; MORENO et al., 2005). Os modelos de distribuição apontam para uma alta associação da espécie a áreas costeiras, porém profundas, com correntes quentes, seguindo a extensão e força da Corrente do Brasil ao sul, o que sugere que a distribuição diminui conforme se estende longitudinalmente (MORENO et al., 2005; DORNELES, 2015). Ademais, foi observado nos modelos que as correntes marinhas frias são delimitadoras de distribuição da espécie (DORNELES, 2015). Entretanto, considerando as amostras da região Sul deste estudo, as quais foram coletadas de indivíduos avistados entre o talude continental e a região oceânica (PETROBRAS, 2020b), há um aumento recente nos registros da espécie na região Sul, e até na Argentina, onde não havia sido registrada antes (HERNANDEZ-ORTS et al., 2021).

Não foi constatada estruturação entre as duas unidades amostrais AST e ASS. O que implica na possibilidade de haver apenas uma população no AS, como apontado por Nara et al. (2017). A distribuição *mismatch* sugeriu que a população pode estar em expansão e o índice de F_s de F_u indicou o mesmo para a população do AS. Haplótipos únicos e muitos passos mutacionais podem estar relacionados com um evento de expansão demográfica, visto que há certa distância genética entre os indivíduos amostrados.

Oceano Atlântico Ocidental

O número de haplótipos encontrados ($H=33$) também foi alto, dado o tamanho amostral de 43, sendo somente três compartilhados. O haplótipo H_10, que antes estava representado por dois indivíduos de Fernando de Noronha (AST), foi compartilhado entre um indivíduo do AN, dentro do possível haplogrupo de FN observado, evidenciando a existência de fluxo gênico entre os indivíduos dessas localidades, como já foi observado para *S. longirostris* (VOLPI, 2012). Ademais, o haplótipo H_20 agrupou um indivíduo do litoral do Paraná (ASS) e um do AN. Com isso, há a possibilidade de existir fluxo gênico entre os indivíduos do AST e AN, bem como entre ASS e AN, o que não havia sido visto antes por Nara et al. (2017), que apontou a população do Atlântico Norte como única, isolada do Atlântico Sul. Os cetáceos, de maneira geral, são animais que possuem alta mobilidade e se deslocam entre regiões distantes do ambiente marinho (PALUMBI & BAKER, 1994), sendo que *S. clymene* possui uma ampla distribuição e é uma espécie altamente móvel (VAN WAEREBEEK & PERRIN, 2007).

A rede de haplótipos para todo Atlântico Ocidental exibiu muitos passos mutacionais e haplótipos exclusivos de valor expressivo ($H=30$), o que indica quão distante estão esses indivíduos geneticamente. Além disso, os testes de neutralidade e distribuição *mismatch* apontaram para uma possível expansão populacional, o que corrobora com Dorneles (2015), a qual afirmou que *S. clymene* está susceptível a expandir sua distribuição no Atlântico Sul Ocidental, como já ocorre com *S. longirostris* (SECCHI & SICILIANO, 1995). Os registros recentes da espécie para o sul do Atlântico também reafirmam tal hipótese (SIMÕES-LOPES et al., 1994; MORENO et al., 2005; PETROBRAS, 2020b; HERNANDEZ-ORTS et al., 2021).

Os testes de estruturação foram realizados incluindo os conjuntos amostrais AST e ASS, ainda que não tenha sido vista estruturação entre ambos, o que pode estar atrelado ao baixo tamanho amostral, sinalizando que esse dado precisa ser interpretado com cautela. Os valores de F_{ST} encontrados ressaltaram que há certa particularidade na unidade amostral do ASS, pois foi vista estruturação entre os conjuntos AN e ASS; AN e AS; AN+AST e ASS, com diferenciação moderada entre AN e ASS ($F_{ST}=11\%$). As correntes oceânicas podem estar relacionadas com essa distinção, visto que as correntes do Oceano Atlântico tropical e subtropical são influenciadas por centros de alta pressão, que na porção sul originam o Giro Subtropical do Atlântico Sul, com suas correntes superficiais (DORNELES, 2015), além de que já foi observada mudança na distribuição das espécies tropicais do gênero *Stenella* de acordo com a variação sazonal da convergência subtropical no Atlântico Sul (MORENO et al., 2005).

Os índices de diversidade genética encontrados neste estudo indicam que a espécie possui alta variabilidade genética, e não há ameaças preocupantes que fazem decair esse parâmetro (FRANKHAM et al., 2008; BARRETO et al., 2011). Do ponto de vista da genética da conservação, esse dado condiz com o atual *status* da espécie na lista nacional (ICMBIO, 2018) e internacional (IUCN, 2018), que é pouco preocupante, os quais ainda não são definitivos pois carecem de mais evidências populacionais (JEFFERSON & BRAULIK, 2018). Além do mais, os indivíduos do hemisfério norte foram bem estudados com trabalhos já realizados nos Estados Unidos e Golfo do México (BAUMGARTNER et al., 2001; FERTL et al., 2003; MULLIN et al., 2004; WEIR, 2006). Para o hemisfério sul, aumentou-se a quantidade de registros (WEIR et al., 2014; JEFFERSON et al., 2015; HERNANDEZ-ORTS et al., 2021) e não se descartou a possibilidade de existir uma população mais ao sul do Oceano Atlântico.

A continuação deste estudo se faz necessária, visto que o número amostral ainda é baixo para se caracterizar a população de *S. clymene* no Oceano Atlântico Sul. A continuidade das

coletas pelo método de biópsia e outras análises de estruturação e diversidade genética através marcadores nucleares poderão fornecer mais informações populacionais para a espécie.

6. CONCLUSÃO

Há altos índices de diversidade genética entre os indivíduos coletados no Sul do Brasil, representando o Atlântico Sul Subtropical. Os indivíduos amostrados na região Nordeste do Brasil, incluídos em Atlântico Sul Tropical, não apresentaram estruturação comparado aos demais amostrados no Sul do Brasil, do Atlântico Sul Subtropical. Entretanto, o grupo mais ao sul do Atlântico apresentou estruturação e índice moderado de diferenciação genética entre a população do Atlântico Norte. Com isso, uma maior investigação acerca da existência de uma outra população no Atlântico Sul, mais ao sul da distribuição da espécie, se faz necessária. O que reforçaria também a hipótese de estarem em expansão.

7. REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. R.; LOVEWELL, G.; COELHO, M. M.; AMATO, G.; ROSENBAUM, H. C. (2014). Hybrid speciation in a marine mammal: The clymene dolphin (*Stenella clymene*). **PLoS One** 9:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0083645
- BAKER, C. S.; FLÓREZ-GONZÁLEZ, L.; ABERNETHY, B.; ROSENBAUM, H. C.; SLADE, R. W.; CAPELLA, J.; BANNISTER, J. L. (1998). Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. **Marine Mammal Science**, 14(4), 721-737. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1998.tb00758.x>
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biotechnol** 37–48.
- BARRETO, A. S.; ROCHA-CAMPOS, C. C.; ROSAS, F. W.; JÚNIOR, J. S. (2011). Plano de Ação nacional para Conservação dos Mamíferos Aquáticos - Pequenos Cetáceos. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)**, Série Espécies Ameaçadas Nº 18.
- BARROS, K. E. M. (2020). Variabilidade genética de *Stellifer rastriifer* (Jordan, 1889) no litoral norte do Espírito Santo e sul da Bahia. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus.
- BAUMGARTNER, M. F.; MULLIN, K. D.; MAY, L. N. (2001). Cetacean habitats in the northern Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, v. 99, n.2, p. 219-239.
- BRUFORD, M. W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J. F. Y.; BURKE, T. (1992). Single-Locus and DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed) **Molecular genetic analyses of populations**. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp 225–269.

- CABALLERO, S.; SANTOS, M. C. O.; SANCHES A.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A. (2013). Initial description of the phylogeography, population structure and genetic diversity of Atlantic spotted dolphins from Brazil and the Caribbean, inferred from analyses of mitochondrial and nuclear DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, 48: 263–270.
- CAÑADAS, A.; SAGARMINAGA, R.; GARCÍA-TISCAR, S. (2002). Cetacean distribution related with depth and slope in the Mediterranean waters off southern Spain. **Deep-Sea Research I**, v. 49, p. 2053 – 2073.
- DORNELES, D. R. (2015). Caracterização do habitat e distribuição potencial de *Stenella clymene* (Odontoceti: Delphinidae) no Oceano Atlântico. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. (2010). 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.
- FARIA, D. M.; STEEL, D.; BAKER, C. S.; DA SILVA, J. M., DE MEIRELLES, A. C. O.; SOUTO, L. R. A. et al. (2022). Mitochondrial diversity and inter-specific phylogeny among dolphins of the genus *Stenella* in the Southwest Atlantic Ocean. **PLoS ONE** 17(7): e0270690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270690>.
- FERTL, D.; JEFFERSON, T. A.; MORENO, I. B. et al. (2003). Distribution of the Clymene dolphin *Stenella clymene*. 33:253–271.
- FERTL, D.; SCHIRO, A. J.; PEAKE, D. (1997). Coordinated feeding by Clymene dolphins (*Stenella clymene*) in the Gulf of Mexico. **Aquatic Mammals**, 23:111–112.
- FERTL, D.; WURSIG, B. (1995). Coordinated feeding by Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*) in the Gulf of Mexico. **Aquat Mamm** 21:3–5.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. (2008). Fundamentos de Genética da Conservação. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, São Paulo.
- FREIRE, M. C. C. (2017). Estruturação genética de *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) no Oceano Atlântico. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus.
- FU, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925.
- GRAY, J. E. (1850). Catalogue of the specimens of Mammalia in the collection of the British Museum, Part I. Ce. **Trustees of the British Museum**, London, United Kingdom.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. (2010). PhyML 3.0: new algorithms, methods and utilities. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321.
- HARRINGTON, B. et al (2004-2005). Inkscape. Disponível em: <<http://www.inkscape.org/>> Acessado em: 06 de julho de 2022.
- HERNANDEZ-ORTS, J. S.; HERNÁNDEZ-MENA, D. I.; PANTOJA, C.; KUCHTA, R.; GARCIA, N. A.; CRESPO, E. A.; LOIZAGA, R. (2021). A visitor of tropical waters: first

record of a clymene dolphin (*Stenella clymene*) off the patagonian coast of Argentina, with comments on diet and metazoan parasites. **Frontiers in Marine Science**, 8, 658975.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). (2018). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1. ed. Brasília, DF: ICMBio/MMA.

JEFFERSON T. A. (2018). Clymene dolphin: *Stenella clymene*. **Encyclopedia of Marine Mammals**. p 197–200.

JEFFERSON, T. A.; BRAULIK, G. (2018). *Stenella clymene*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T20730A50373865. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T20730A50373865.en.>> Acessado em: 18 de maio de 2022.

JEFFERSON, T. A.; CURRY, B. E. (2003). *Stenella clymene*. **Mammalian Species**, 726, 1-5.

JEFFERSON, T. A.; PRUNIER, A.; DKO, T. K. (1995). Notes on the biology of the clymene dolphin (*Stenella clymene*) in the northern Gulf of Mexico. **Mar MAMMAL Sci** 11(4)564-573 1995 (Research note) 11:10.

KESSLER, A. (2019). Genômica da origem híbrida do golfinho *Stenella clymene*. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução da Biodiversidade), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KINGSTON, S. E.; ADAMS, L. D.; ROSEL, P. E. (2009). Testing mitochondrial sequences and anonymous nuclear markers for phylogeny reconstruction in a rapidly radiating group: molecular systematics of the Delphininae (Cetacea: Odontoceti: Delphinidae). **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-19.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549.

MACHADO, L. F.; DAMASCENO, J. S.; BERTONCINI, A. A.; FARRO, A. P. C.; HOSTIM-SILVA, M.; OLIVEIRA, C. (2017). Population genetic structure and demographic history of the spadefish, *Chaetodipterus faber* (Ephippidae) from Southwestern Atlantic. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 487, 45-52.

MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; AGUIRRE-GONZÁLEZ, A. M.; CABALLERO-GAITÁN, S. J.; CABRIAS-CONTRERAS, L. J.; CABRERA-PALLARES, J. A.; DENNIS, M. M.; ESPINOZA-FORERO, R. H.; MONÁ-SANABRIA, Y.; RESTREPO-GARZÓN, N.; REYES-RICARDO, S. M.; RIVERA-PÉREZ, C. I.; SANCHEZ-OKRUCKY, R.; CAICEDO-HERRERA, D.; TRUJILLO-GONZÁLEZ, F. (2021). Rescue, Veterinary Care, and Necropsy of a Stranded Clymene Dolphin (*Stenella clymene*) from the Caribbean Coast of Colombia. **Caribbean Naturalist**. n. 81. 1-18.

MORENO, I. B.; ZERBINI, A. N.; DANILEWICZ, D.; SANTOS, M. C. O.; SIMÕES-LOPES, P. C.; LAILSON-BRITO JR, J.; AZEVEDO, A. F. (2005). Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 300, p. 229-240.

- MULLIN, K. D.; FULLING, G. L. (2004). Abundance of cetaceans in the oceanic northern Gulf of Mexico, 1996–2001. **Marine Mammal Science**, v. 20, n. 4, p. 787-807.
- NARA, L. B. C. (2015). Estrutura genética populacional de *Stenella clymene* (Gray, 1850) e sua relação filogenética com o gênero. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus.
- NARA, L.; MEIRELLES, A. C. O.; SOUTO, L. R. A.; SILVA-JR, J. M.; FARRO, A. P. C. (2017). An Initial Population Structure and Genetic Diversity Analysis for *Stenella clymene* (Gray, 1850): Evidence of Differentiation Between the North and South Atlantic Ocean. **Aquatic Mammals**, v. 43, n. 5.
- NEI, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. **Columbia University Press**, New York.
- NEI, M.; TAJIMA, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, v. 97, n. 1, p. 145-163.
- OLIVEIRA, V. K.; FARIA, D. M.; CUNHA, H. A.; SANTOS, T. E.; COLOSIO, A. C.; BARBOSA, L. A.; FARRO, A. P. C. (2020). Low genetic diversity of the endangered franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in its northernmost, isolated population (FMAIa, Espírito Santo, Brazil). **Frontiers in Marine Science**.
- PALUMBI, S. R.; BAKER, C. S. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 426-435. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040115>
- PERRIN, W. F.; MITCHELL, E. D.; MEAD, J. G.; CALDWELL, D. K.; VAN BREE, P. J. H. (1981). *Stenella clymene*, a rediscovered tropical dolphin of the Atlantic. **J Mammal** 62:583–598.
- PETROBRAS. (2020b). Projeto de monitoramento de cetáceos na Bacia de Santos - PMC-BS: 5º relatório anual – Ciclos 1 a 10. E&P, Volume II: Guia de identificação e síntese do conhecimento sobre os Cetáceos da Bacia de Santos.
- PICHLER, F. B.; ROBINEAU, D.; GOODALL, R. N. P.; MEYER, M. A.; OLIVARRIA, C.; BAKER, C. S. (2001). Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). **Mol Ecol** 10:2215–2223.
- RICE, D. W. (2009). Classification (Overall). In: PERRIN, W.F., WÜRSIG, B., THEWISSEN, J.G. (eds) Encyclopedia of Marine Mammals, 2nd edn. **Elsevier**, San Diego, California, pp 235–237.
- ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences, **Molecular Biology and Evolution**, 9: 552- 559.
- ROSS, H. A.; LENTO, G. M.; DALEBOUT, M. L.; GOODE, M.; EWING, G.; MCLAREN, P.; RODRIGO, A. G.; LAVERY, S.; BAKER, C. S. (2003). DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. **Journal of Heredity**, 94: 111–114.
- ROZAS, J. P.; LIBRADO, J. C.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, X.; ROZAS, R. (2010). DnaSP version 5.10. 1 (Self extracting file of 4.6 Mb). Universitat de Barcelona.

- RUSSELL, N.; SMITH, J. A.; HEATHER, M.; TABISOLA, H. M.; TEIXEIRA, A.; VERMEULEN, E.; VINES, J.; WILLIAMS, A. (2014). Clymene dolphins (*Stenella clymene*) in the eastern tropical Atlantic: distribution, group size, and pigmentation pattern. Source: **Journal of Mammalogy**, 95(6):1289-1298.
- SAKYI, R. L.; OFORI-DANSON, P. K.; ADDO, S.; NYARKO, E. (2019). Stomach Content Analysis and Concentrations of Chemical Pollutants in the Clymene Dolphin (*Stenella clymene*, Gray 1846) from the Coastal Waters of Ghana. **Fisheries and Aquaculture Journal**, 10(1).
- SECCHI, E. R.; SICILIANO, S. (1995). Comments on the southern range of the spinner dolphin (*Stenella longirostris*) in the western South Atlantic. **Aquat Mamm** 21:105–108.
- SILVA, J. M. JR, SILVA, F. J. L.; SAZIMA I. (2005). Two Presumed Interspecific hybrids in the genus *Stenella* (Delphinidae) in the Tropical West Atlantic. **Aquat. Mamma**. 2005; 31: 467–471.
- SILVA, T. L. (2021). Estruturação populacional e diversidade genética de golfinho-rotador (*Stenella longirostris*) da Baía de Santos, Atlântico Sul. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SIMÕES-LOPES, P. C.; PRADERI, P.; PAULA, G. S. (1994). The clymene dolphin, *Stenella clymene* (Gray, 1846), in the southwestern south Atlantic Ocean. **Marine Mammal Science**, v. 10, n. 2, p. 213-217.
- TAJIMA, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595.
- TEIXEIRA, F. L. (2021). Diversidade e estruturação genética do golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*) no Sudoeste e Norte do Oceano Atlântico e no Oceano Pacífico. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- VAN WAEREBEEK, K.; PERRIN W. F. (2007). Conservation status of the Clymene dolphin in West Africa. 789 Paper CMS/ScC14/Doc.5, **14th Meeting of the CMS Scientific Council**, 14–17 March 2007, Bonn, 790 Germany.
- VOLPI, T. A. (2012). Filogeografia de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*, Gray, 1828) no litoral brasileiro a partir de marcadores mitocondriais. Dissertação (Mestrado em biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus.
- WAN Q. H.; WU H.; FUJIHARA T.; FANG S. G. (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? **Electrophoresis**, v. 25, n. 14, p. 2165-2176.
- WEIR, C. R. (2006). First confirmed records of Clymene dolphin. **Ketos Ecol** 41:297–300.
- WEIR, C. R.; COLES, P.; FERGUSON, A.; MAY, D.; BAINES, M.; FIGUEIRDO, I.; REICHEL, M.; GONCALVES, L.; BOER, M. N.; ROSE, B.; EDWARDS, M.; TRAVERS, S.; AMBLER, M.; FÉLIX, H.; WALL, D.; AZHAKESAN, V. A. A.; BETENBAUGH, M.; FENNELLY, L.; HAALAND, S.; HAK, G.; JUUL, T.; LESLIE, R. W.; MCNAMARA, B.;
- WRIGHT, S. (1978). Evolution and the genetics of populations IV. Variability withing and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.

APÊNDICE A – Tabela de haplótipos para *Stenella clymene* com os sítios polimórficos e frequências absolutas das regiões do Oceano Atlântico Ocidental - Atlântico Norte (AN), Atlântico Sul Tropical (AST) e Atlântico Sul Subtropical (ASS).

	Sítios Polimórficos	Frequência Absoluta		
		AN	AST	ASS
<i>D-loop</i> 317 pb	111111122222222222222223 255678913377892234556666777890 2626632682905785707151345145436			
H_1	ACAAATCCGACAATATTGGCCCTCCACCGGA	-	2	-
H_2 A A T . . TT . . .	-	1	4
H_3 T T TT . . .	-	1	-
H_4	. T . . GGT C . . . TT . . T . TTA . .	-	1	-
H_5 A . TTG . . G . . A . . T TTA . .	-	1	-
H_6 GC TT . . .	-	1	-
H_7	. . . C A . . . T . . . TT . . G	-	1	-
H_8 T TT . . .	-	1	-
H_9 GCG TT . . .	-	1	-
H_10 T . G A . . T . T . TTA . G	-	2	-
H_11 G T . G A . . TTT . TTA . G	-	1	-
H_12	C T . G A . . TTT . TTTA .	-	1	-
H_13 C T . . . TT . . .	-	-	1
H_14 T CAA TTA . .	-	-	1
H_15 A A . . . T . T . TT . . .	-	-	2
H_16 GC T . . . T . . TT . . .	-	-	1
H_17 T C . A . TTT . T . TTA . .	-	-	1
H_18 A TTT . TTA . G	-	-	2
H_19 A . T . G A . . T . T . . TTA . .	-	-	1
H_20 T . G T . T . TT . . .	1	-	1
H_21	. T . . GA . T C . . . TT . . . TTA . .	1	-	-
H_22 GT . GC . . . A . . . TTT . TT . . .	1	-	-
H_23 G TTT . TTA . .	1	-	-
H_24 T A . . . TTTGTTA . G	1	-	-
H_25 T . GC TTT . TTA . .	1	-	-
H_26	. . T A . . . TTT . TTA . G	1	-	-
H_27 GT . GC . . . A . . . TTT . TT . . .	1	-	-
H_28 GT C . A . . TTT	1	-	-
H_29	. T . . G T C . . . TT . . T . TT . . .	1	-	-
H_30 GT . GC . . . AA . . . TTT . TT . . .	1	-	-
H_31 T . . . T . G TTT . TT . . .	1	-	-
H_32 C T . TTT . TT . . .	1	-	-
H_33 GT . GC . . . A TT . . .	1	-	-

ANEXO 1 – Sequências de *Stenella clymene* de *D-loop* incluídas neste estudo, baixadas do GenBank com seus respectivos números de acesso, totalizando 14 amostras.

Localidade	Identificação	Nº de acesso	Referência
Atlântico Norte Ocidental	SCL1	GQ504137.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL2	GQ504142.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL3	GQ504143.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL4	GQ504144.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL5	GQ504145.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL6	GQ504146.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL7	GQ504147.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	Scl8	DQ845446.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL9	DQ845446.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL10	GQ504138.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL11	GQ504139.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	Scl12	DQ845447.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL13	GQ504140.1	KINGSTON et al., 2009
Atlântico Norte Ocidental	SCL14	GQ504141.1	KINGSTON et al., 2009
Costa do Caribe, Colômbia	-	MT470364.1	MIGNUCCI-GIANNONI et al., 2021