

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

**MONITORAMENTO TEMPORAL DA DIVERSIDADE E
ESTRUTURA GENÉTICA DOS GOLFINHOS-
ROTADORES DE FERNANDO DE NORONHA/PE,
BRASIL**

MANOELA DA SILVA PEREIRA

**SÃO MATEUS/ES
MAIO/2021**

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

**MONITORAMENTO TEMPORAL DA DIVERSIDADE E
ESTRUTURA GENÉTICA DOS GOLFINHOS-
ROTADORES DE FERNANDO DE NORONHA/PE,
BRASIL**

MANOELA DA SILVA PEREIRA

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: Dra Ana Paula Cazerta Farro

SÃO MATEUS/ES

MAIO/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Manoela da Silva Pereira**

Título: Monitoramento temporal da diversidade e estrutura genética dos golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha - PE, Brasil

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
defendida e aprovada em 04/05/2021,

com nota **nove e meio (9,5)** pela comissão julgadora:

(Dra Ana Paula Cazerta Farro / CEUNES-UFES)

(Dra Ana Lucia Cypriano / Socioambiental)

(Dr Jose Martins da Silva Junior / ICMBio)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por todas as graças concedidas a mim ao decorrer desses anos de faculdade, por ter me dado forças durante o período distante da minha família, e por me permitir chegar até aqui.

Agradeço imensamente a minha família. Obrigada pai e mãe, por acreditarem em mim e principalmente por não terem medido esforços para investir na minha educação, isso tudo é fruto da dedicação de vocês. Agradeço a minha vó Izaura, por ter me criado e por ter moldado com tanto carinho a pessoa que sou hoje. Obrigada a minha vó Fátima, às minhas tias Nuna, Neca, Lorena e Cirleia, aos meus tios Júnior e Leonilson, aos meus irmãos e aos meus primos, por todo apoio e carinho. Amo vocês!

Agradeço ao meu namorado, Breno, por me passar tanta tranquilidade e, principalmente, por segurar a minha mão nas horas mais difíceis. Muito obrigada por acreditar e ver potencial em mim, até mesmo nas horas que nem eu mesma vejo. Te amo!

Agradeço à minha orientadora, Ana Paula, por ter me acolhido de uma forma tão carinhosa e gentil desde o primeiro momento. Ana, obrigada por todo apoio, conhecimento e paciência durante esses anos, você me inspira!

Agradeço aos parceiros do Laboratório, Fernanda, Karla, Paulo, Vanessa, Dahiani, Mylla, Drienne e Fábio, por todo conhecimento passado e por terem me auxiliado no desenvolvimento da monografia. Agradeço também ao GECOM e a equipe da RRDM, por todas as experiências compartilhadas.

Agradeço as minhas Geneticisters, Fê e Karlinha. Fê, muito obrigada pela paciência e carinho ao me ensinar a desenvolver os procedimentos laboratoriais e análises, mas principalmente, obrigada pela amizade e parceria que desenvolvemos ao longo desses anos. Karlinha, você sempre me acolhe de uma forma inexplicável, obrigada por sempre me ouvir e por me dar os melhores conselhos. Vocês duas são incríveis e sou imensamente grata pela amizade de vocês.

Agradeço aos meus amigos da UFES, Júlia, Ricardo, Laura, Paulo, Caio Castro, Lucas e Rafael, por toda parceria e momentos engraçados que vivemos juntos naquela universidade. Obrigada por sempre estarem perto e por serem a família que eu construí em São Mateus.

Agradeço a minha dupla Júlia pela nossa amizade. Ju, obrigada pela conexão inexplicável que temos, você é uma verdadeira irmã para mim, e quero ter você sempre ao meu lado. Te agradeço por ter sido família e morada durante estes anos. Amo você!

Agradeço aos amigos que a biologia me presenteou, Mathielo, Thaís, Hugo, Luíza Monalisa, Stefani, Fabrício, Andressa, Jorge, Rhayan, Tassi, João e Lyra. Obrigada por toda troca e carinho.

Agradeço aos meus amigos de vida Tayná, Mayara, Bárbara, Gustavo, Thaís, David, Keviin, Rodolfo, Sayonara, Ludmila, Vitor, Marcelo, Letycia e Charles. Obrigada por sempre me apoiarem e compreenderem os meus períodos de ausência por conta da faculdade. Amo vocês!

Agradeço ao grupo PET ProdBio, cujo foi crucial para minha formação não só profissional, mas também pessoal. Agradeço às tutoras Mônica e Marielce por todos os conhecimentos e orientações compartilhados.

Agradeço a todos os professores da biologia que colaboraram com a minha formação.

Agradeço a minha banca de Monografia, por terem aceitado meu convite e por contribuírem com o meu trabalho.

Agradeço as fundações de pesquisa FAPES e FEST, pelas bolsas de auxílio às minhas Iniciações Científicas.

Agradeço ao projeto Golfinho Rotador, por viabilizarem as coletas de tecidos analisados neste estudo.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a realização desta monografia.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS	VII
SUMÁRIO DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3.1. Coleta e armazenamento das amostras	4
3.2. Extração e Quantificação do DNA	5
3.3. Certificação da espécie com citocromo b	6
3.4. Sexagem Molecular via PCR.....	6
3.5. Amplificação da Região Controle do DNA Mitocondrial.....	7
3.6. Purificação e Sequenciamento.....	7
3.7. Alinhamento e Edição	7
3.8. Análise da Diversidade e Construção da Rede de Haplótipos.....	7
4. RESULTADOS.....	8
5. DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÃO	18
7. REFERÊNCIAS	18
8. ANEXOS	24

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. <i>Stenella longirostris</i> (golfinhos-rotadores). Imagem: Projeto Golfinho Rotador.	1
Figura 2. Distribuição geográfica dos golfinhos-rotadores (BRAULIK & REEVES, 2018).....	2
Figura 3. Mapa da rota de coleta de tecido de golfinhos-rotadores no arquipélago de Fernando de Noronha, PE, Brasil.	5
Figura 4. Fragmentos de DNA amplificados para sexagem molecular de seis espécimes de <i>S. longirostris</i> . Duas bandas representam machos e uma banda fêmeas. A primeira e última coluna correspondem ao ladder e ao branco, respectivamente. Gel de agarose à 2,5%.....	8
Figura 5. Fragmentos de DNA amplificados para a região de controle do mtDNA em golfinhos-rotadores. A primeira coluna corresponde ao ladder e a segunda corresponde ao branco. Gel de agarose à 1%.....	9
Figura 6. Rede de haplótipos de <i>S. longirostris</i> , correspondente a coleta de 2019, realizada no arquipélago de Fernando de Noronha, PE. Cada círculo representa um haplótipo, cujo seus tamanhos demonstram suas frequências na população. Já os traços demonstram número de passos mutacionais entre os haplótipos.	10
Figura 7. Índices de diversidades haplotípicas (D-loop) encontrados em diferentes anos de coleta para os golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha/PE.....	11
Figura 8. Rede de haplótipos temporal de <i>S. longirostris</i> correspondente às coletas dos anos de 2006, 2009, 2012 e 2019 em Fernando de Noronha, PE. Os círculos coloridos representam um haplótipo, cujo seus tamanhos demonstram suas frequências na população. Cada traço indica os paços mutacionais entre os haplótipos e os círculos pretos demonstram haplótipos não amostrados.....	13
Figura 9. Distribuição de Mismatch para das amostragens 2006 e 2009, 2012, 2019 e para a população geral de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha. Os eixos X e Y de cada gráfico representam o número de Mismatch e a frequência destes, respectivamente.	14

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Sítios polimórficos, Frequência Absoluta (FA) e Frequência Relativa (FR) dos haplótipos (Nor) encontrados para a espécie <i>S. longirostris</i> utilizando-se o marcador D-loop (612bp).	10
Tabela 2. Número amostral (n), número de haplótipos (N), diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (h) e teste de neutralidade (Tajimas' D e Fu's Fs) de <i>S. longirostris</i> para os diferentes anos de coleta, 2006, 2009, 2012 e 2019, em Fernando de Noronha. Em destaque os menores valores de π e h.	11
Tabela 3. Haplótipos correspondentes à pesquisa realizada por FARIA <i>et al.</i> , 2020 e suas frequências absolutas (FA). Em destaque o novo haplótipo encontrado neste estudo para a população.	12
Tabela 4. Valores de estruturação temporal (Fst), abaixo da diagonal, encontrados para os quatro anos de amostragem: 2006, 2009, 2012 e 2019; acima da diagonal encontram-se os valores de P. Em destaque os valores significativos.....	14

RESUMO

O monitoramento temporal de populações pode oferecer informações valiosas a respeito das alterações genéticas ao longo do tempo, que podem ser potencializadas principalmente em virtude de pressões ambientais e antrópicas. Neste estudo, foi realizada uma análise temporal da diversidade genética da população de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*) de Fernando de Noronha, PE, Brasil. As coletas de tecido de 223 animais vivos foram feitas no Mar de Dentro do arquipélago de Fernando de Noronha, por meio do método pouco invasivo de raspagem de pele, nos anos de 2006, 2009, 2012 e 2019. A partir de fragmentos de 612 bp da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) foram encontrados 12 haplótipos, sendo que um deles apresentou alta frequência (0,935). Foram verificados baixos índices de diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00508$) e haplotípica ($h = 0,3138$). As análises temporais revelaram redução significativa no número de haplótipos ao longo dos anos de amostragem (2006= 7 haplótipos; 2009 = 4; 2012 = 6; 2019 = 4) e, conseqüentemente, na diversidade genética, sendo o maior índice de diversidade haplotípica encontrado para o ano de 2006 ($h = 0,5647$) e o menor para o ano de 2019 ($h = 0,1791$). O teste de estruturação temporal exibiu uma leve divergência quando comparado 2006 e 2009 com 2012 ($F_{st} = 0,03904$ e $P = 0,03119$) e uma maior estruturação entre 2006 e 2009 com 2019 ($F_{st} = 0,08824$ e $P = 0,03119$). Em 2006 e 2009 a frequência do haplótipo principal era 74%, em 2019 essa passou para 93,5%. Estes achados sugerem uma mudança na composição genética da população nos últimos 10 anos, com uma redução na diversidade genética ao longo do tempo. Essa diminuição de diversidade pode estar sendo ocasionada, por um menor número de golfinhos visitantes à Fernando de Noronha ou um aumento da mortalidade para os animais que frequentam o arquipélago. Com isso está diminuindo a frequência de alelos diferenciados. Tais mudanças observadas podem estar relacionadas com o aumento do turismo no arquipélago ou com mudanças das condições ambientais na área. Os resultados apresentados neste estudo indicam a necessidade de acompanhamento e atenção à espécie na região.

Palavras-chave: Cetáceos, Delphinidae, D-loop, *Stenella longirostris*, Variabilidade genética.

ABSTRACT

The temporal monitoring of populations can offer valuable information regarding genetic changes over time, which can be enhanced mainly due to environmental and human pressures. In this study, a temporal analysis of the genetic diversity of the spinner dolphins' populations (*Stenella longirostris*) from Fernando de Noronha, PE, Brazil, was carried out. The tissue collections of 223 live animals were carried out in Mar de Dentro in Fernando de Noronha archipelago, using the less invasive method of skin scraping, in the years 2006, 2009, 2012 and 2019. From 612bp fragments of the mitochondrial DNA control region (D-loop), 12 haplotypes were found, one of which had a high frequency (0.935). Low levels of nucleotide ($\pi = 0.00508$) and haplotype ($h = 0.3138$) diversities were found. Temporal analysis revealed a significant reduction in the number of haplotypes over the sampling years (2006 = 7 haplotypes; 2009 = 4; 2012 = 6; 2019 = 4) and, consequently, in genetic diversity, with the highest index of haplotype diversity found for the year 2006 ($h = 0.5647$) and the lowest for the year 2019 ($h = 0.1791$). The temporal structuring test showed a slight divergence when comparing 2006 and 2009 with 2012 ($F_{st} = 0.03904$ and $P = 0.03119$) and a greater structuring between 2006 and 2009 with 2019 ($F_{st} = 0.08824$ and $P = 0.03119$). In 2006 and 2009 the frequency of the main haplotype was 74%, in 2019 it increased to 93.5%. These findings suggest a change in the genetic composition of the population in the past 10 years, with a reduction in genetic diversity over time. This decrease in diversity may be caused by a smaller number of dolphins visiting Fernando de Noronha or an increase in mortality for animals that frequent the Archipelago. As a result, the frequency of differentiated alleles is decreasing. Such changes observed may be related to the increase in tourism in the archipelago or to changes in environmental conditions in the area. The results presented in this study indicate the need for monitoring and care for this population.

Keywords: Cetaceans, Delphinidae, D-loop, Genetic variability, *Stenella longirostris*.

1. INTRODUÇÃO

A família Delphinidae abrange um total de 33 espécies de cetáceos, sendo representada por 17 gêneros (LEDUC *et al.*, 1999; LEDUC, 2009). Os golfinhos do gênero *Stenella* estão distribuídos em regiões tropicais, subtropicais e em oceanos temperados. Atualmente são reconhecidas cinco espécies deste gênero, sendo elas: *Stenella attenuata* (GRAY, 1846) golfinho-pintado-pantropical; *Stenella clymene* (GRAY, 1850) golfinho-de-Clymene; *Stenella coeruleoalba* (MEYEN, 1833) golfinho-listrado; *Stenella frontalis* (CUVIER, 1829) golfinho-pintado-do-atlântico; e *Stenella longirostris* (GRAY, 1828) denominado popularmente como golfinho-rotador (PERRIN, 1989).

Os golfinhos-rotadores (Figura 1) são assim nomeados devido à capacidade de girar em torno do seu próprio eixo longitudinalmente (PERRIN, 2009). Estes apresentam hábitos pelágicos, com a preferência de águas profundas, contudo também se aproximam de ilhas, bancos e atóis (PERRIN & GILPATRICK JR, 1994). São caracterizados por possuir rostro alongado e fino, com padrão de coloração de tons de cinza. Os adultos maduros sexualmente desta espécie apresentam variação de peso entre 28 a 73 Kg, e comprimento entre 129 e 235 cm. Além disso, o tamanho dos grupos desta espécie é variável, visto que estes alternam-se de forma dinâmica (COSTA, 2011).



Figura 1. *Stenella longirostris* (golfinhos-rotadores). Imagem: Projeto Golfinho Rotador.

Estes cetáceos estão distribuídos em águas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (LEDUC *et al.*, 1999), sendo menos comuns em águas temperadas (Figura 2). Devido a essa ampla distribuição, são reconhecidas quatro subespécies de *S. longirostris*, sendo elas: *S. longirostris centroamericana* (golfinho-rotador centro-americano), onde a distribuição contempla águas Costeiras do Oceano Pacífico na América Central; *S. longirostris longirostris* (golfinho-rotador pantropical), associada a ilhas dos Oceanos

Atlântico, Índico e Pacífico; *S. longirostris orientalis* (golfinho-rotador oriental), presente no Oceano Pacífico Oriental; e *S. longirostris roseiventris* (golfinho-rotador anão), presente em águas do Golfo, Indonésia e Tailândia (PERRIN *et al.*, 1990). Estes golfinhos apresentam uma ampla distribuição no litoral brasileiro (MORENO *et al.*, 2005), sendo muito comuns para o arquipélago de Fernando de Noronha/PE.

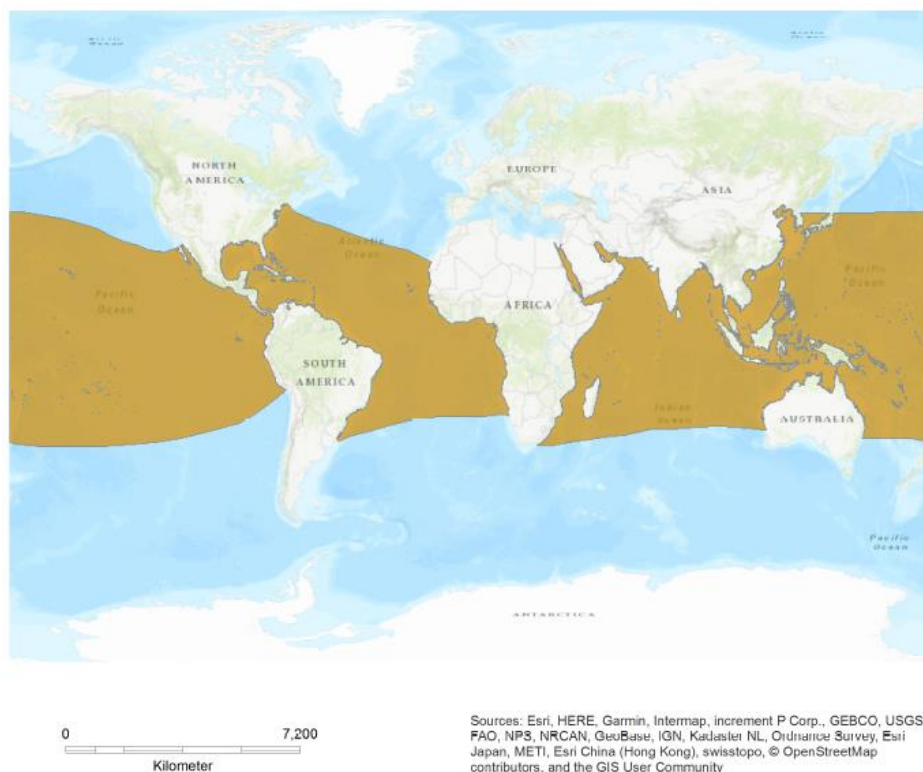


Figura 2. Distribuição geográfica dos golfinhos-rotadores (BRAULIK & REEVES, 2018).

O arquipélago de Fernando de Noronha, é considerado um refúgio natural da espécie e a claridade da água permite a observação de um grande número destes animais (SILVA & SILVA-JR, 2009). Com relação ao comportamento destes nesta área, SILVA-JR *et al.* (2005) relataram à similaridade destes cetáceos com os rotadores do Havaí, os quais se destacam as interações com golfinhos de outras espécies, comportamento de cópula, amamentação e brincadeiras por meio de jogos. Além disso, no que se refere ao comportamento dos grupos avistados em Fernando de Noronha, FARRO (2006) verificou que 70% dos indivíduos identificados molecularmente no estudo eram do sexo masculino, ou seja, que em sua maioria foram os machos desta espécie que acompanharam os botes de coleta, o que corrobora com a hipótese de outros pesquisadores de que os grupos de machos se aproximam das embarcações com o intuito de proteger as fêmeas e seus filhotes (NORRIS & DOHL, 1979; SILVA-JR, 2010).

No que tange a conservação destes golfinhos, segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza, o status de *S. longirostris*

é classificado como Pouco Preocupante, uma vez que é um dos cetáceos mais numerosos em nível mundial (BRAULIK & REEVES, 2018). Contudo, de acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBio, 2018), esta espécie é categorizada como Deficiente de Dados (DD), devido a sua ampla distribuição e a falta de informações das populações no Atlântico Sul.

Neste contexto, vale mencionar que alguns estudos genéticos já foram realizados com a espécie no Sudoeste do Oceano Atlântico utilizando marcadores moleculares (FARRO, 2006; FARRO *et al.*, 2008a; FARRO *et al.*, 2008b; VOLPI, 2012; FARIA, 2013; FARIA, 2018; FARIA *et al.*, 2020). A utilização de marcadores moleculares em pesquisas relacionadas à conservação, potencializa o entendimento da estrutura das populações, relações filogenéticas, diversidade genética, compreensão das vertentes biológica e evolutiva dos animais, além de auxiliar na gestão e manejo das populações (DIZON *et al.*, 1991; WILSON *et al.*, 1985). Ademais, o DNA mitocondrial (mtDNA) é muito utilizado em estudos populacionais de cetáceos, uma vez que se trata de uma região de rápida evolução, com altas taxas de substituição de bases (ARIAS *et al.*, 2003). Se destaca a região de controle do mtDNA (D-loop), a qual é altamente polimórfico (BINI *et al.*, 2003) e capaz de fornecer dados relacionados a estrutura populacional, diversidade genética e fluxo gênico (AVISE, 1998).

ANDREWS *et al.* (2010) avaliaram sequências da região de controle do DNA mitocondrial D-loop e locos de microssatélites, dos golfinhos-rotadores do arquipélago do Havaí. Com base nisso, constataram que tanto a estruturação quanto a diversidade genética se diferenciam ao longo das ilhas do arquipélago. Ademais, verificaram que as populações com estrutura social mais consistente, apresentaram maior fluxo gênico. Tais autores sugerem que estes achados são influenciados principalmente pela disponibilidade de recursos e habitats ao longo do arquipélago.

No Brasil, VOLPI (2012) avaliou a variabilidade genética dos golfinhos-rotadores ao longo do litoral brasileiro, por meio dos marcadores mitocondriais D-loop e Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) em quatro unidades amostrais, sendo elas: Nordeste (G1), Fernando de Noronha (G2 e G3) e no Sudeste e Sul do Brasil (G4). Neste estudo foi encontrada estruturação entre os grupos e fluxo gênico restrito.

Quanto aos estudos que contemplam o arquipélago de Fernando de Noronha, FARIA *et al.* (2020) analisaram a diversidade e estruturação genética dos golfinhos-rotadores da região, através dos marcadores D-loop e microssatélites, com amostras coletadas nos anos de 2004, 2006, 2009 e 2012. No que tange ao marcador mitocondrial, foi revelada baixa diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), as quais corresponderam respectivamente, a 0,3747 e 0,006. Foram detectados também elevada diferenciação e isolamento entre a população de Fernando

de Noronha quando comparada a outras populações de sua distribuição. Onze haplótipos foram identificados para a região, os quais dois foram mais frequentes, e poucos haplótipos exclusivos para os rotadores de Fernando de Noronha; além de estruturação temporal entre as coletas de 2006 e 2012. Já com relação aos marcadores nucleares, foi detectado polimorfismo em todos os locos microssatélites, bem como encontraram níveis moderados a altos de heterozigosidade, e o teste de estruturação temporal usado neste estudo não demonstrou valores de F_{st} significativos.

O presente trabalho visa dar continuidade ao monitoramento temporal genético dos golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha, através do marcador mitocondrial D-loop, uma vez que as amostras coletadas depois de 2012 não haviam sido avaliadas e modificações na composição populacional podem estar ocorrendo ao longo do tempo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Monitorar temporalmente a diversidade e estrutura genética dos golfinhos-rotadores do arquipélago de Fernando de Noronha/PE, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a diversidade genética da região controle do mtDNA da população em 2019;
- Averiguar a proporção sexual dos animais amostrados a partir de sexagem molecular;
- Comparar as diversidades haplotípicas e nucleotídicas encontradas nos diferentes anos de amostragem.
- Avaliar a existência de estruturação temporal entre os indivíduos amostrados em diferentes anos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e armazenamento das amostras

Um total de 242 amostras de tecido de pele de golfinhos-rotadores foram coletadas no arquipélago de Fernando de Noronha-PE nos anos de 2006 (N = 35), 2009 (N = 67), 2012 (N = 59), sendo estas já sequenciadas anteriormente em outro estudo (FARIA *et al.*, 2020), e 2019 (N = 81), sequenciadas e analisadas neste presente trabalho (Figura 3).

As campanhas foram feitas a partir do método de raspagem, utilizando-se bote inflável, com motor de popa. As coletas foram realizadas no Mar de Dentro do arquipélago (voltado para o continente brasileiro), principalmente na região “Entre Ilhas” (Figura 3).

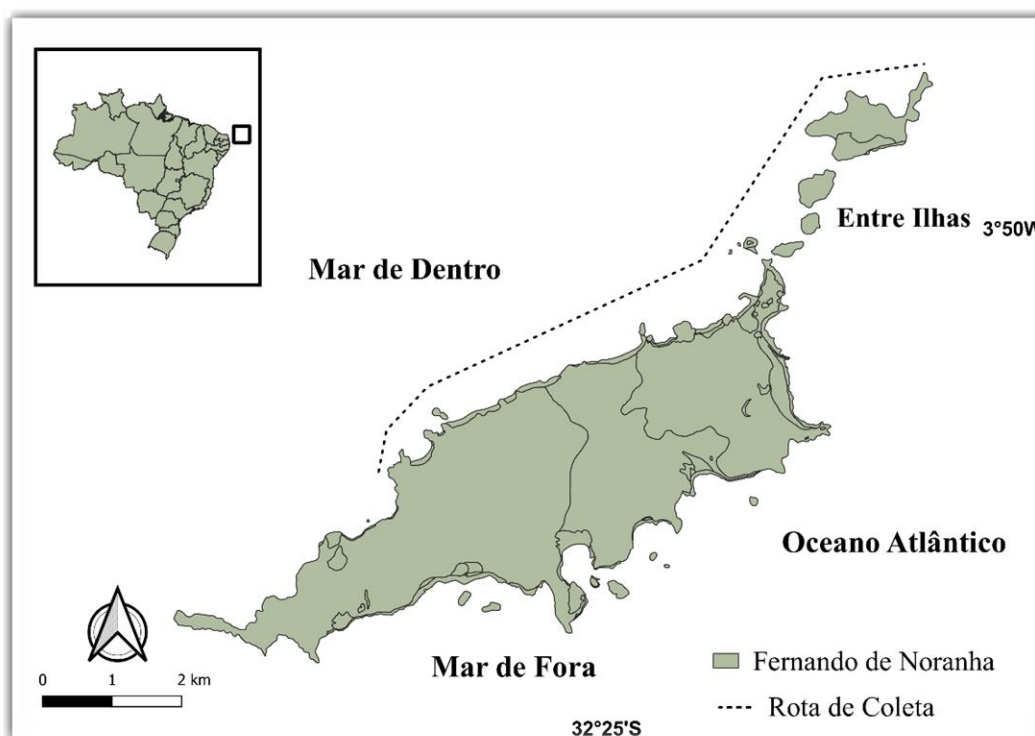


Figura 3. Mapa da rota de coleta de tecido de golfinhos-rotadores no Arquipélago de Fernando de Noronha, PE, Brasil.

O procedimento de coleta por raspagem consiste em uma técnica pouco invasiva, uma vez que não é necessário perfurar a pele do animal para obtenção do material epidérmico. Com isso, utilizam-se esponjas constituídas por material abrasivo e fibras sintéticas (HARLIN *et al.*, 1999), de tamanho 8x8 cm, firmados com prendedores de plástico em um mastro de madeira (denominado “amostrador”) de 130 cm, já testado e padronizado para *S. longirostris* (FARRO *et al.*, 2008a).

Após a retirada do tecido, essas amostras foram armazenadas em microtubos contendo álcool 70%. Em laboratório, os microtubos foram armazenados à temperatura de -20°C.

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), São Mateus (ES).

3.2. Extração e Quantificação do DNA

O DNA de todas as 81 amostras, ainda não processadas, foi extraído através do protocolo de extração com a resina Chelex (SIGMA) a 5%, visto que este não precisa de grandes quantidades de tecido.

Para iniciar, com o auxílio de uma tesoura esterilizada com hipoclorito, álcool e flambada na chama, cortou-se a ponta de uma ponteira de 1000 µl. Esta foi utilizada para

colocar 200 µl da resina Chelex em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, os tecidos foram picotados e adicionados aos microtubos com a resina. As amostras foram então colocadas em banho-maria à 65°C por 16 hs e posteriormente à 95°C por 15 minutos. O produto foi centrifugado a 1400 rpm por 3 min e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo com o auxílio de uma ponteira de 20 a 200 µL. Após, o DNA extraído foi colocado na geladeira por 24 horas.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop – ND-2000, Uniscience), utilizando-se 1µL das soluções.

3.3. Certificação da espécie com citocromo b

Com o objetivo de desconsiderar qualquer falha na identificação da espécie *S. longirostris*, foi realizada uma análise molecular via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se marcador mitocondrial citocromo b (Cit-b). Este foi amplificado a partir dos *primers* L14724 (PALUMBI *et al.*, 1991) e H15387 (ROSEL *et al.*, 1994). O produto de PCR obteve um volume final de 20 µL e foi composto por: Tampão 10x para PCR (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂ (50 mM), 0,15mM de dNTP (10 mM), 0,3mM de cada primer (10 mM), 0,05 de unidades Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando o volume com água ultrapura. Em seguida as amostras foram direcionadas ao termociclador e os ciclos de PCR consistiram: 94°C em 30s, seguidos de 35 ciclos de 94°C em 30s, 45°C em 30s, 72°C em 30s consecutivos por extensão de 72 °C por 7 minutos.

Após isso, os fragmentos amplificados foram observados em gel de agarose 1%, com GelRed (Biotium).

3.4. Sexagem Molecular via PCR

Dado que não é possível realizar a identificação do sexo dos indivíduos durante as coletas, tais espécimes foram sexados via PCR. Para amplificação dos genes ZFX e SRY, foram utilizados os *primers* ZFX0582 e ZFX0923 (BÉRUBÉ & PALSBOLL, 1996); PMSRYF (RICHARD *et al.*, 1994) e TtSRYR (ROSEL, 2003), respectivamente.

As reações de PCR foram preparadas como sugerido por ROSEL, (2003), com alterações: Tampão 10x para PCR (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (50 mM), 1,5mM de dNTP (10 mM), 0,3 mM de cada *primer* (10mM), salvo o reverse para o SRY que foi aplicado 0,06 mM, 1,5 de unidades Taq DNA polimerase (Invitrogen) e o volume final foi de 25 µL. As condições no termociclador foram programadas para efetuar os seguintes passos: 92°C em 30 s, seguido de 35 ciclos de 94°C em 30 s, 51°C em 45 s e 72°C em 45 segundos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2,5% e corados com GelRed (Biotium).

Em seguida, foi calculado a proporção sexual (machos/fêmeas) e para determinar se algum dos sexos demonstrou maior evidência estatística, utilizou-se o teste exato binomial.

3.5. Amplificação da Região Controle do DNA Mitocondrial

Os *primers* DLp 1.5 (BAKER *et al.*, 1998) e DLp8 (PICHLER *et al.*, 2001) foram utilizados para amplificar a região de controle do mtDNA, também conhecida como D-loop, para gerar um fragmento de aproximadamente 600 pb.

As reações de PCR obtiveram um volume de 20 µL, contendo: 1 µL (10-100 ng/µL) de DNA, tampão 10x para PCR (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (50mM), 0,4 mM de cada dNTP (10mM), 0,035 de unidades Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,4 mM de cada primer (10 mM), completando o volume com água ultrapura. Após isso, as amostras foram direcionadas ao termociclador, para o qual os ciclos de PCR consistiram em: 94°C em 2 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C em 30s, 55°C em 45s, 72°C em 40s, consecutivos de uma extensão final de 72°C em 10 minutos.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% com GelRed (Biotium).

3.6. Purificação e Sequenciamento

Após o processo de PCR, os produtos que obtiveram as bandas amplificadas foram purificados com 1 µL da enzima ExoSap-IT (USB Corporation), com objetivo de remover os reagentes em excesso. Em seguida, foram encaminhados à empresa Macrogen para o sequenciamento dos fragmentos.

3.7. Alinhamento e Edição

Primeiramente, analisou-se as sequências provenientes da coleta de 2019 no programa MEGA 7.0 (KUMAR, *et al.*, 2016) e as ferramentas online BLAST e DNA *Surveillance* (ROSS *et al.*, 2003), foram utilizadas para a confirmação da espécie. Para a análise temporal, foram incluídos um total de 161 indivíduos sequenciados por FARIA *et al.* (2020) e publicadas no GenBank com os seguintes números de acesso: MK184992 a MK185002 (Anexo 1).

3.8. Análise da Diversidade Genética e Construção da Rede de Haplótipos

O programa DNAsp (ROZAS *et al.*, 2017) foi usado para gerar arquivos de entrada para os outros programas utilizados, bem como calcular número de mutações e sítios polimórficos.

O programa Arlequin v.3.11 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) foi utilizado para calcular as diversidades nucleotídicas e haplotípicas, número de haplótipos, análise de variância molecular (AMOVA), teste de estruturação temporal (F_{ST}), os testes de neutralidade seletiva (D de Tajima e F_s de Fu) e distribuição Mismatch. Além disso, o programa PopArt (LEIGH & BRYANT, 2015) foi utilizado para a construção de rede de haplótipos por meio dos cálculos de *Median-Joining*.

4. RESULTADOS

As concentrações de DNA das 81 amostras extraídas variaram de 3,4 a 146 ng/ μ L, com média de 3,6 ng/ μ L.

Para o marcador Cit-b, 61 sequências mostraram-se de qualidade para análises. Com as ferramentas online BLAST e/ou DNA *Surveillance*, confirmou-se a espécie de todos os indivíduos, sendo todos da espécie *S. longirostris*. Em caso de não amplificação para o Cit-b os espécimes foram verificados a partir das sequências do marcador D-loop.

Dentre os golfinhos-rotadores coletados, foi possível identificar molecularmente o sexo de 68 indivíduos, os quais 45 corresponderam a machos e 23 a fêmeas (Figura 4). A proporção sexual foi de 1,95 (machos/fêmeas) e o teste estatístico mostrou-se significativo para o sexo masculino ($P = 0,01$).



Figura 4. Fragmentos de DNA amplificados para sexagem molecular de seis espécimes de *S. longirostris*. Duas bandas representam machos e uma banda fêmeas. A primeira e última

coluna correspondem ao ladder e ao branco, respectivamente. Gel de agarose à 2,5%.

Das sequências geradas a partir da região de controle do DNA mitocondrial, 62 apresentaram qualidade para as análises. Deste modo, obteve-se um produto de aproximadamente 700 bp de DNA (Figura 5), que após o alinhamento e edição, o tamanho final ficou em 612 bp.

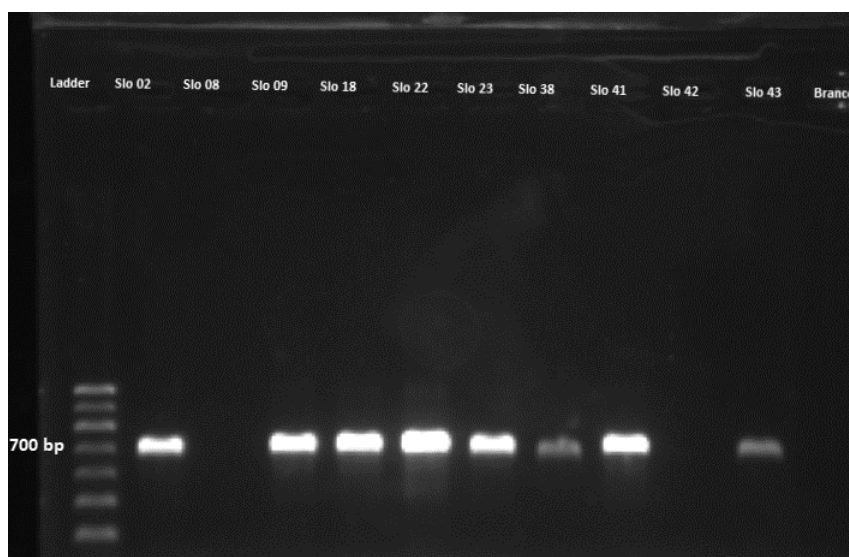


Figura 5. Fragmentos de DNA amplificados para a região de controle do mtDNA em golfinhos-rotadores. A primeira coluna corresponde ao ladder e a última corresponde ao branco. Gel de agarose à 1%.

Dentre os espécimes coletados em 2019, encontrou-se um total de quatro haplótipos e 13 sítios polimórficos. A frequência absoluta (FA) variou de 1 a 58 e a frequência relativa (FR) de 0,016 a 0,935 (Tabela 1). A rede de haplótipos exibiu uma elevada frequência para o haplótipo 1 (Nor 1), distante a um passo mutacional dos haplótipos 8 e 12 (Nor 8 e Nor 12, respectivamente). Já o haplótipo 2 (Nor 2) se mostrou bem divergente, estando distante 10 passos mutacionais de Nor 8 (Figura 6).

Tabela 1. Sítios polimórficos, Frequência Absoluta (FA) e Frequência Relativa (FR) dos haplótipos (Nor) encontrados para a espécie *S. longirostris* utilizando-se o marcador D-loop (612bp).

Sítios Polimórficos			
D-loop 612 bp	1 2 2 3 3 3 3 4 4 5	FA	FR
	4 9 7 6 7 5 6 6 6 8 0 9 4		
	6 4 2 0 8 0 7 8 9 2 3 7 0		
Nor 1	CGAAGGGGAGTTC	58	0,935
Nor 2	TAGGAAAAGAC . .	2	0,032
Nor 8 T	1	0,016
Nor 12 G .	1	0,016

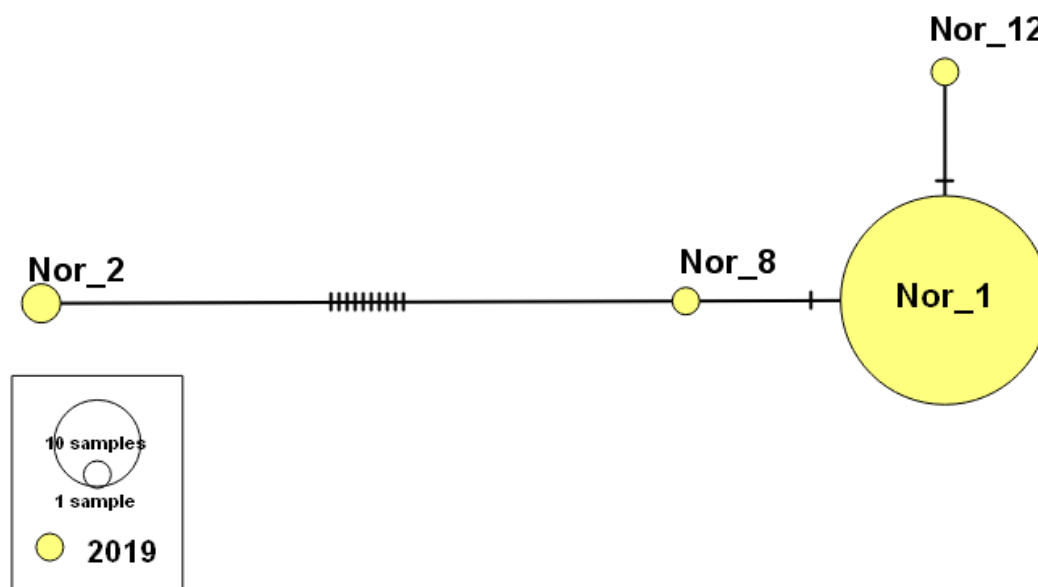


Figura 6. Rede de haplótipos de *S. longirostris*, correspondente a coleta de 2019, realizada no arquipélago de Fernando de Noronha, PE. Cada círculo representa um haplótipo, cujo seus tamanhos demonstram suas frequências na população. Já os traços demonstram número de passos mutacionais entre os haplótipos.

Considerando todos os indivíduos como uma única unidade amostral os índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) corresponderam a 0,001302 e 0,1791,

respectivamente. No que tange a análise temporal, foram encontrados maiores índices de diversidade haplotípica (h), nucleotídica (π) e número de haplótipos para a coleta de 2006 (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2. Número amostral (n), número de haplótipos (N), diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (h) e teste de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu) de *S. longirostris* para os diferentes anos de coleta, 2006, 2009, 2012 e 2019, em Fernando de Noronha. Em destaque os menores valores de π e h.

mtDNA						
Coletas	n	N	π	h	D de Tajima	Fs de Fu
2006	35	7	0,0102%	0,5647	-0,86681 (P=0,21800)	2,32104 (P=0,84000)
2009	67	4	0,006635%	0,37	0,09071 (P= 0,60400)	5,18870 (P= 0,95300)
2012	59	6	0,010030	0,2507	-1,41297 (P=0,06200)	0,83959 (P=0,070700)
2019	62	4	0,001302	0,1791	-2,09665 (P=0,00200)	0,33340 (P=0,58900)
Total	223					

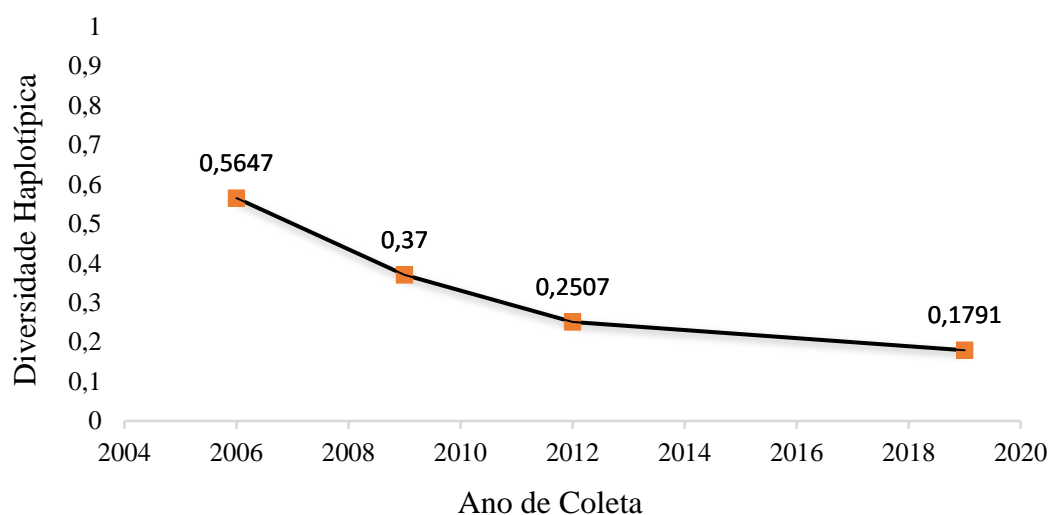


Figura 7. Índices de diversidades haplotípicas (D-loop) encontrados em diferentes anos de coleta para os golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha/PE.

Para a população total foram detectadas 12 haplótipos, com o acréscimo de um haplótipo (Nor 12) comparado ao estudo de FARIA *et al.*, 2020 (Tabela 3). A diversidade nucleotídica correspondeu à 0,005080 e haplotípica à 0,3138. Estes foram definidos por 25 sítios polimórficos, e o tamanho final do fragmento correspondeu a 391 bp.

Tabela 3. Haplótipos correspondentes à pesquisa realizada por FARIA *et al.*, 2020 e suas frequências absolutas (FA). Em destaque o novo haplótipo encontrado neste estudo para a população.

Haplótipos	2006	2009	2012	2019	FA
Nor 1	22	52	51	58	185
Nor 2	8	12	4	2	26
Nor 3	1	-	-	-	1
Nor 4	1	-	-	-	1
Nor 5	1	-	-	-	1
Nor 6	1	-	-	-	1
Nor 7	1	-	-	-	1
Nor 8	-	1	2	1	4
Nor 9	-	2	-	-	2
Nor 10	-	-	1	-	1
Nor 11	-	-	1	-	1
Nor 12	-	-	-	1	1
Total	35	67	59	62	223

O haplótipo denominado Nor 1 mostrou-se como mais frequente na rede de haplótipos temporal (Figura 8), sendo compartilhado por todos os anos de amostragem. Já o haplótipo Nor 2 apresentou-se o mais divergente dentre todos, distante oito passos mutacionais de Nor 1. O haplótipo Nor 8 foi compartilhado por quatro espécimes, coletados nos anos de 2009, 2012 e 2019 (Figura 8).

Foram encontrados para todos os anos de amostragem haplótipos exclusivos, sendo estes: Nor 3, Nor 4, Nor 5 e Nor 6, correspondentes a coleta de 2006; Nor 9 em 2009; Nor 10 e Nor 11 a 2012; e Nor 12 em 2019. Contudo, estes foram pouco frequentes, quando comparados com os haplótipos compartilhados entre os anos de amostragem.

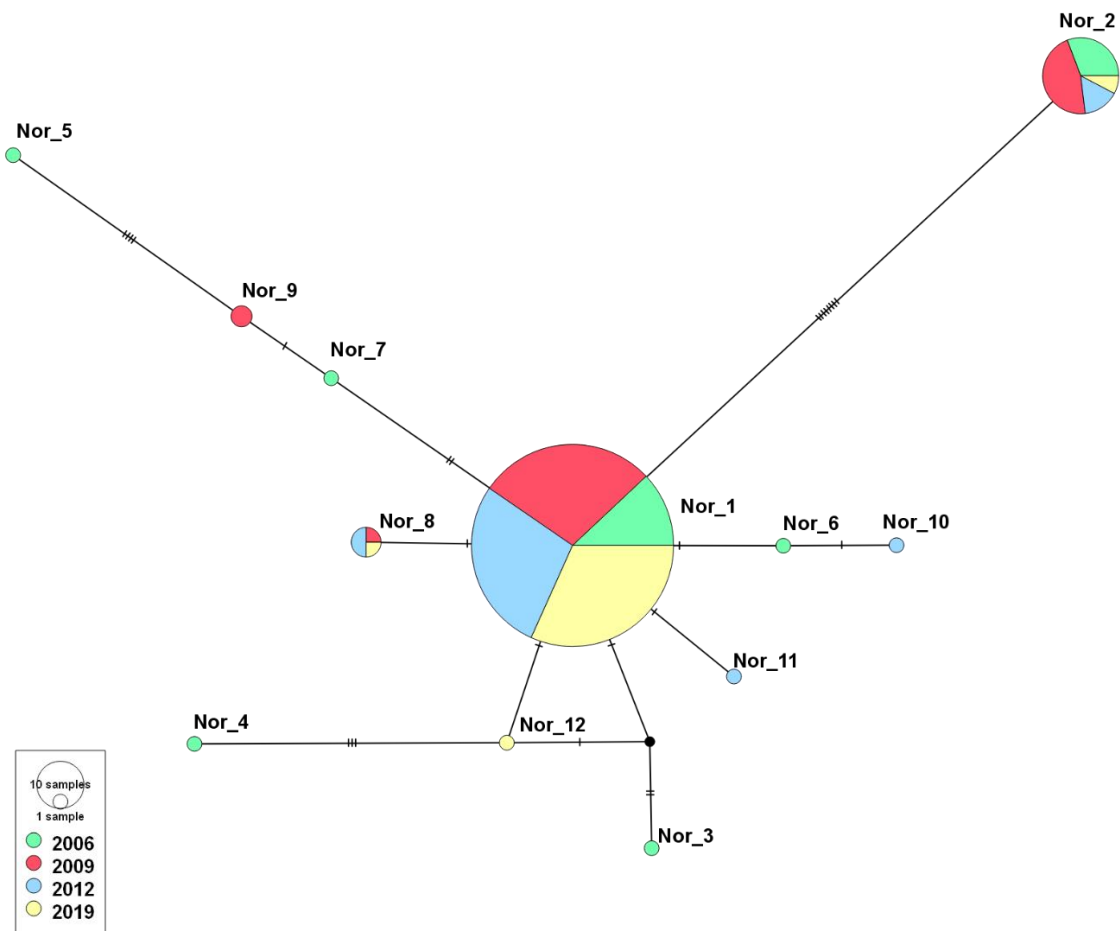


Figura 8. Rede de haplótipos temporal de *S. longirostris* correspondente as coletas dos anos de 2006, 2009, 2012 e 2019 em Fernando de Noronha, PE. Os círculos coloridos representam um haplótipo, cujo seus tamanhos demonstram suas frequências na população. Cada traço indica os paços mutacionais entre os haplótipos e os círculos pretos demonstram haplótipos não amostrados.

Os testes de estruturação temporal demonstraram valores significativos entre os anos de 2006 e 2012; 2006 e 2019; 2009 e 2019, uma vez que os valores de P desses anos foram menores que 0,05 (Tabela 4). Uma segunda análise de estruturação foi realizada com a junção das populações putativas de 2006 e 2009, já que não houve estruturação entre ambos os anos. Esta revelou uma pequena diferenciação genética quando comparada à 2012 ($F_{st} = 0,03904$ e $P = 0,03119$) e uma maior diferenciação com 2019 ($F_{st} = 0,08824$ e $P = 0,03119$).

A análise AMOVA revelou 0,05245 e 0,95418 de variância entre e dentro das populações, respectivamente.

Tabela 4. Valores de estruturação temporal (Fst), abaixo da diagonal, encontrados para os quatro anos de amostragem: 2006, 2009, 2012 e 2019; acima da diagonal encontram-se os valores de P. Em destaque os valores significativos.

Coletas	2006	2009	2012	2019
2006	*	0,42728	0,00040	0,00020
2009	-0,00665	*	0,08722	0,00475
2012	0,07349	0,02646	*	0,25413
2019	0,15667	0,08758	0,00436	*

Os testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu para a população corresponderam respectivamente a -1.43582 (P = 0,04900) e - 0,98853 (P = 0,42700). Já os testes de neutralidade para cada ano de coleta demonstraram valores não significativos, com exceção para 2019 (P < 0,02) (Tabela 2). A análise *mismatch* da região de controle do mtDNA apresentou uma curva bimodal tanto para a população total, quanto para as análises individuais de 2006, 2009 e 2012, com exceção do gráfico de 2019, que apresentou uma curva unimodal (Figura 9).

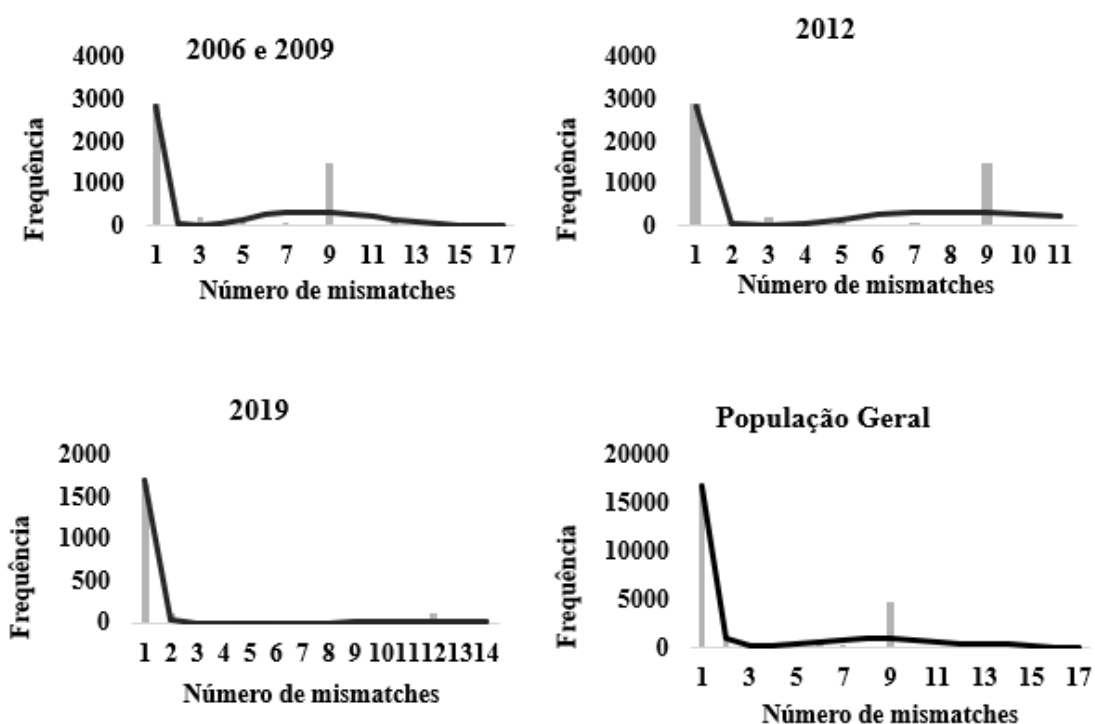


Figura 9. Distribuição de *Mismatch* para as amostragens 2006 e 2009, 2012, 2019 e para a população geral de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha. Os eixos X e Y de cada gráfico representam o número de *Mismatch* e a frequência destes, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de um monitoramento genético de mais de 15 anos da população de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha. Neste estudo aumentou-se o número amostral para a região de controle do DNA mitocondrial (N=62), com animais coletados em 2019, em relação ao trabalho realizado por FARIA *et al.* (2020), no qual foram analisados animais amostrados até 2012.

Com relação às sexagens moleculares, para as coletas de 2006, 2009 e 2012 foram detectados aproximadamente 70%, 60% e 53% de machos amostrados, respectivamente (FARRO, 2006; FARIA, 2018). Neste trabalho, o valor correspondente para este sexo foi de 66%. O significativo número de machos coletados corrobora com ideia de que em sua maioria são os golfinhos deste sexo que se aproximam dos botes de coleta em comportamento de guarda, com a finalidade de manter as fêmeas e seus filhotes afastados (NORRIS & DOHL, 1979; SILVA-JR, 2010).

Tratando da diversidade genética, desde o início do monitoramento, foram registrados doze haplótipos, sendo apenas um novo (Nor 12), apresentado neste estudo. A rede de haplótipos da análise temporal demonstrou maior frequência para dois haplótipos divergentes, assim como detectado por FARIA *et al.* (2020), o que pode indicar a colonização de pelo menos duas linhagens matrilineares em Fernando de Noronha. No entanto, em 2006 e 2009 a frequência do haplótipo principal (Nor 1) era de 74% (FARIA, 2010), já em 2019 esta porcentagem passou para 93,5%. Assim, observa-se um aumento significativo da amostragem dos indivíduos deste haplótipo e redução no número dos outros. FARIA *et al.* (2020) sugerem a ocorrência de uma provável população residente de golfinhos-rotadores em Fernando de Noronha, que permanece no arquipélago em virtude da disponibilidade de recursos e áreas de descanso, e outra população transiente, a qual se desloca para outras áreas, apenas visitando o arquipélago.

A elevada frequência de Nor 1 pode ser justificada pelo efeito fundador. Esta afirmação corrobora com os testes de neutralidade total e a curva bimodal apresentada pelo gráfico de *mismatch*, o qual indica que esta unidade populacional passou por uma expansão demográfica recente (ROGERS & HARPENDING, 1992; SLATKIN & HUDSON, 1991). Todavia, as análises isoladas da distribuição de *mismatch* de cada ano, revelaram curvas bimodais para as coletas de 2006, 2009 e 2012. Contudo, o gráfico de 2019, evidenciou uma curva unimodal, o que pode indicar um efeito de redução no tamanho populacional mais recente. Hipótese corroborada pelo teste de Tajima, que mostrou um valor significativo de P.

Índices decrescentes de diversidade genética foram encontrados para a população de golfinhos-rotadores ao longo do tempo. Os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica, que

já eram os mais baixos que qualquer outra população de *S. longirostris* ao longo da distribuição (FARIA *et al.*, 2020) foram ainda mais reduzidos para 2019.

Valores menores de diversidade foram encontrados para os golfinhos de Hector (*Cephalorhynchus hectori*) do Norte da Nova Zelândia ($h = 0$) (PICHLER & BAKER, 2000), para as toninhas (*Pontoporia blainvillei*) do Norte do Espírito Santo (FMAIa, Brasil) ($h = 0,041$) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020) e para os botos-cinzas, *Sotalia guianensis* da costa brasileira ($h = 0,284$) (CABALLERO *et al.*, 2018).

Com a diminuição da quantidade de haplótipos e o baixo índice de diversidade mitocondrial, sugere-se que a população de golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha possa estar tendendo a uma homogeneidade genética, como sugerido para *Phocoena phocoena* do mar negro (CHEHIDA *et al.*, 2020). Tal hipótese pode estar atrelada a uma redução no número de golfinhos-rotadores transientes, ou visitantes ao arquipélago, os quais poderiam vir de localidades distintas com alelos diferenciados, aumentando a variabilidade genética dos golfinhos do local. Uma outra possibilidade, é um provável aumento da mortalidade dos animais que frequentam o arquipélago, tendo como consequências a perda destes indivíduos.

No que tange às análises de estruturação, foram verificadas diferenças significativas entre as amostragens de 2006 e 2009, quando comparadas a 2019, o que indica uma possível alteração na composição populacional, que pode estar sendo potencializada por mudanças alélicas (HUTCHINSON *et al.*, 2003), neste caso com a perda de alelos.

Uma hipótese atrelada a estes achados, principalmente no que se refere a campanha de 2019, pode estar ligada ao turismo excessivo na região. Em uma pesquisa anterior realizada para o arquipélago do Havaí, foi demonstrado que o tráfego intenso de mergulhadores e navios provocou mudanças na área de descanso desses animais, além da diminuição de suas atividades aéreas (COURBIS, 2004). Já para o arquipélago de Fernando de Noronha, nos últimos dez anos houve uma intensificação no turismo. Somente no ano de 2015, aproximadamente 80.000 pessoas visualizaram golfinhos-rotadores a partir de passeios de barco (SILVA-JR, 2017), sendo este uma das mais importantes fontes econômicas do arquipélago. SILVA-JR. (2010) concluiu que a interação entre os barcos e os golfinhos-rotadores causou mudanças no comportamento destes cetáceos, de modo a provocar divisão dos grupos e aumento da velocidade de deslocamento. Este supõe que o turismo de observação dos golfinhos é produto de estresse nestes animais, e que pode acarretar a diminuição das taxas de reprodução e o aumento da mortalidade destes cetáceos. Já TISCHER *et al.* (2017) relataram mudança no uso do arquipélago, com o registro de ocupação de indivíduos para outras regiões, o que indica uma possibilidade destes animais procurarem áreas com menor impacto antrópico. Além desses

dados encontrados em literatura, foram observadas alterações no comportamento e ocupação da área durante as coletas realizadas ao longo dos anos (comunicação pessoal).

A partir desta perspectiva, vale ressaltar que mudanças nas condições ambientais também podem estar atuando sob esta área. Uma possibilidade atrelada a isto são alterações nas correntes oceânicas, visto que estas alternam-se constantemente (HAYS, 2017). POLOCZANSKA *et al.* (2007) evidenciaram a influência das mudanças na Corrente da Austrália Oriental sob a dinâmica de migração das baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*). Um outro fator pode estar atrelado aos efeitos das mudanças climáticas sob a região, dado que estas causam uma pressão adicional sob os ecossistemas marinhos (HOEGH-GULDBERG & BRUNO, 2010). SOUZA *et al.* (2019) analisou a vulnerabilidade de espécies de cetáceos em resposta as mudanças climáticas no Oceano Atlântico Nordeste, no arquipélago da Madeira, onde verificaram que tal efeito gera impactos na distribuição geográfica e migração sazonal destes animais.

GASPARI *et al.* (2019) encontraram diferenças populacionais de *S. coeruleoalba* consideráveis ao longo de 21 anos de amostragem. Estes indicam que os padrões de composição genética refletem nos tamanhos demográficos, e afirmam que os efeitos ambientais sob a genética populacional podem ser detectados a partir de estudos contínuos. Já de acordo com MENDEZ *et al.* (2010) às pressões antrópicas sob as populações de pequenos cetáceos, podem acarretar em mudanças significativas na composição das populações e em seus níveis de diferenciação quando comparadas a outras.

A baixa diversidade pode representar um risco para as populações, uma vez que tem potencial de indicar uma limitação por parte das espécies em reagir a diferentes ameaças (PICHLER & BAKER, 2000). No entanto, FARIA *et al.* (2020) encontraram valores de heterozigosidade moderados a altos para os rotadores de Fernando de Noronha, quando foram considerados marcadores nucleares. Nesse estudo esse tipo de marcador não foi contemplado, por isso, torna-se necessária uma análise futura incluindo avaliação de locos microssatélites das amostras de 2019.

O estudo temporal de populações pode revelar alterações genéticas em virtude de pressões ambientais (GASPARI *et al.*, 2019) e antrópicas (MENDEZ *et al.*, 2010). As coletas realizadas ao longo desses anos ofereceram a possibilidade de um valioso monitoramento da diversidade genética e de uma melhor compreensão acerca dos processos evolutivos atuantes sob os golfinhos-rotadores de Fernando de Noronha.

6. CONCLUSÃO

Este estudo apresenta dados de mais de 15 anos de monitoramento genético e reforça a baixa diversidade genética mitocondrial dos golfinhos-rotadores no arquipélago de Fernando de Noronha, bem como um acentuado declínio dessa diversidade ao longo do tempo. A população está sofrendo perdas em sua composição alélica e sugere-se que possa estar tendendo a uma homogeneidade genética, sendo então necessário maior atenção para a conservação desses cetáceos na região.

7. REFERÊNCIAS

ANDREWS, K. R.; KARCZMARSKI, L.; AU, W. W.; RICKARDS, S. H.; VANDERLIP, C. A.; BOWEN, B. W. & TOONEN, R. J. Rolling stones and stable homes: social structure, habitat diversity and population genetics of the Hawaiian spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Molecular Ecology*, v. 19, n. 4, p. 732-748, 2010.

ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; & SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropical* (GAR Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, p. 305-309, 2003.

AVISE, J. C. Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity*, v. 89, n. 5, p. 377-382, 1998.

BAKER, C. S; FLOREZ-GONZALEZ, L.; ABERNETH, B.; ROSENBAU, H. C.; SLADE, L. W.; CAPELLA, J.; BANNISTER, J. L. 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.

BÉRUBÉ, M. & PALSROLL, P. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, v. 5, n. 2, p. 283-287, 1996.

BINI, C.; CECCARDI, S.; COLALONGO, C.; FERRI, G.; FALCONI, M.; PELOTTI, S. & PAPPALARDO, G. Population data of mitochondrial DNA region HVIII in 150 individuals from Bologna (Italy). *International Congress Series*. Elsevier, p. 525-528, 2003.

BRAULIK, G. & REEVES, R. *Stenella longirostris*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2018.

- CABALLERO, S.; HOLLATZ, C.; RODRÍGUEZ, S.; TRUJILLO, F. & BAKER, C. S. Population Structure of Riverine and Coastal Dolphins *Sotalia fluviatilis* and *Sotalia guianensis*: Patterns of Nuclear and Mitochondrial Diversity and Implications for Conservation. *Journal of Heredity*, v. 109, n. 7, p. 757-770, 2018.
- CHEHIDA, Y. B.; THUMLOUP, J.; VISHNYAKOVA, K.; GOL'DIN, P. & FONTAINE, M. C. Genetic homogeneity in the face of morphological heterogeneity in the harbor porpoise from the Black Sea and adjacent waters (*Phocoena phocoena relicta*). *Heredity*, v. 124, n. 3, p. 469-484, 2020.
- COSTA, T. E. B. Variações horárias na entrada e saída dos golfinhos-rotadores e sua relação com fatores ambientais, na Baía dos Golfinhos em Fernando de Noronha PE. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.
- COURBIS, S. S. Behavior of Hawaiian spinner dolphins (*Stenella longirostris*) in response to vessels/swimmers. Tese de Doutorado. San Francisco State University, 2004.
- DE OLIVEIRA, V. K.; FARIA, D. M.; CUNHA, H. A.; DOS SANTOS, T. E.; COLOSIO, A. C.; BARBOSA, L. A.; FREIRE, M. C. C. & FARRO, A. P. C. Low genetic diversity of the endangered franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in its northernmost, isolated population (FMAIa, Espírito Santo, Brazil). *Frontiers in Marine Science*, 2020.
- DIZON, A. E.; SARKA O. S.; PERRIN, W. F. Molecular analysis of mtDNA types in exploited populations of spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Rep. Int. Whal. Commn*, v. 13, p. 183-202, 1991.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FARIA, D. M.; DA SILVA J-R, J. M.; PIRES COSTA, L.; REZENDE PAIVA, S.; MARINO, C. L.; ROLLO JR, M. M.; BAKER, C. S. & FARRO, A. P. C. Low mtDNA diversity in a highly differentiated population of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Plos One*, v. 15, n. 4, p. e0230660, 2020.
- FARIA, D. M. Estruturação genética de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris* Gray, 1828) no litoral brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

- FARIA, D. M. Diversidade e estruturação genética de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*, GRAY 1828) baseada em uma região do DNA mitocondrial. Monografia. Universidade Federal do Espírito Santo, 2010.
- FARIA, D. M. Padrões de diversidade, diferenciação e hibridação do gênero *Stenella*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2018.
- FARRO, A. P. C. Variabilidade genética de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*) a partir de marcadores microssatélites. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2006.
- FARRO, A. P. C., ROLLO JR, M. M., SILVA-JR, J. M. & MARINO, C. L. A simple protocol for a low invasive DNA accessing in *Stenella longirostris* (Cetacea: Delphinidae). Pan-American Journal of Aquatic Sciences, p. 130-134, 2008a.
- FARRO, A. P. C.; ROLLO, M. M.; SILVA-JR, J. M. & MARINO, C. L. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for spinner dolphin (*Stenella longirostris*). Conservation Genetics, v. 9, n. 5, p. 1319-1321, 2008b.
- GASPARI, S.; MARSILI, L.; NATALI, C.; AIROLDI, S.; LANFREDI, C.; DEEMING, C. & MOURA, A. E. Spatio-temporal patterns of genetic diversity in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, v. 57, n. 3, p. 721-734, 2019.
- HARLIN, A. D.; WÜRSIG, B.; BAKER, C. S. & MARKOWITZ, T. M. Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). Marine Mammal Science, v. 15, n. 2, p. 409-425, 1999.
- HAYS, G. C. Ocean currents and marine life. Current Biology, v. 27, n. 11, p. R470-R473, 2017.
- HOEGH-GULDBERG, Ove; BRUNO, John F. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. Science, v. 328, n. 5985, p. 1523-1528, 2010.
- HUTCHINSON, W. F.; OOSTERHOUT, C. V.; ROGERS, S. I. & CARVALHO, G. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 270, n. 1529, p. 2125-2132, 2003.

ICMBio – INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Livro vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF: ICMBio/ MMA. V.1, n. 1, p. 87, 2018.

KUMAR, S.; STECHER, G. & TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEDUC, R. G. Delphinids, overview. *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, p. 298-302, 2009.

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

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

MENDEZ, M.; ROSENBAUM, H. C.; WELLS, R. S.; STAMPER, A. & BORDINO, P. Genetic evidence highlights potential impacts of by-catch to cetaceans. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. e15550, 2010.

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

NORRIS, K. S. & DOHL, T. P. Behavior of the Hawaiian Spinner Dolphin '*Stenella longirostris*' (Schlegel, 1841). *California Univ Santa Cruz Center for Coastal Marine Studies*, 1979.

PALUMBI, S., MARTIN, A., ROMANO, S., MCMILLAN, W. O., STICE, L., GRABOWSKI, G., & MACMILLAN, W. O. The simple fool's guide to PCR, ver. 2.0. University of Hawaii, Honolulu, p. 25-28, 1991.

PERRIN, W. F. & MIYAZAKI KASUYA, T. A dwarf form of the spinner dolphin (*Stenella longirostris*) from Thailand. *Marine Mammal Science*, v. 5, p. 213-227, 1989.

- PERRIN, W. F. Spinner Dolphin: *Stenella longirostris*. Encyclopedia of marine mammals, v. 5, p. 1100-1103, 2009.
- PERRIN, W. F. Subspecies of *Stenella longirostris* (Mammalia: Cetacea: Delphinidae). Proceedings of the Biological Society of Washington, v. 103, p. 453-463, 1990.
- PERRIN, W. F.; GILPATRICK J., J.W. Spinner dolphin *Stenella longirostris* (Gray, 1828). Handbook of marine mammals, v. 5, p. 99-128, 1994.
- PICHLER, F. B.; ROBINEAU, D.; GOODALL, R. N. P.; MEYER, M. A.; OLIVARRIA, C. & BAKER, C. S. Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). Molecular Ecology, v. 10, n. 9, p. 2215-2223, 2001.
- PICHLER, F. B. & BAKER, C. S. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 267, n. 1438, p. 97-102, 2000.
- POLOCZANSKA, E. S., BABCOCK, R. C., BUTLER, A., HOBDAV, A. J., HOEGH-GULDBERG, O., KUNZ, T. J. & RICHARDSON, A. J. Climate change and Australian marine life. Oceanography and Marine Biology, v. 45, p. 407, 2007.
- RICHARD, K. R.; MCCARREY, S. W. & WRIGHT, J. M. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. Canadian Journal of Zoology, v. 72, n. 5, p. 873-877, 1994.
- ROGERS, A. R. & HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution, v. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.
- ROSEL, P. E.; DIZON, A. E. & HEYNING, J. E. Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). Marine Biology, v. 119, n. 2, p. 159-167, 1994.
- ROSEL, P. E. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. Conservation Genetics, v. 4, p. 647-649, 2003.
- ROSS, H. A.; LENTO, G. M.; DALEBOUT, M. L.; GOODE, M.; EWING, G.; MCLAREN, P.; RODRIGO, A. G.; LAVERY, S. & BAKER, C. S. DNA Surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. Journal of Heredity, v. 94, n. 2, p. 111-114, 2003.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S. E. & SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.

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

DA SILVA JUNIOR, J. M. Turismo de observação de mamíferos aquáticos: benefícios, impactos e estratégias. *Revista Brasileira de Ecoturismo (RBEcotur)*, v. 10, n. 2, 2017.

SILVA-JR, J. M. Os Golfinhos de Noronha. Bambu, São Paulo, 2010.

SILVA-JR, J. M.; SILVA, F. J. L. & SAZIMA, I. Rest, nurture, sex, release, and play: diurnal underwater behaviour of the spinner dolphin at Fernando de Noronha Archipelago, SW Atlantic. *Aqua*, v. 9, n. 4, p. 161-176, 2005.

SLATKIN, M. & HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genética*, v. 129, n. 2, pág. 555-562, 1991.

SOUSA, A.; ALVES, F.; DINIS, A.; BENTZ, J.; CRUZ, M. J. & NUNES, J. P. How vulnerable are cetaceans to climate change? Developing and testing a new index. *Ecological indicators*, v. 98, p. 9-18, 2019.

TISCHER, M. C.; CARLI, R. D. C. D.; SILVA, F. J. D. L. & SILVA JR, J. M. D. Tourism growth altering spinner dolphins' area of occupation in Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 45, n. 4, p. 807-813, 2017.

VOLPI, T. A. Filogeografia de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*, Gray, 1828) no litoral brasileiro a partir de marcadores mitocondriais. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; CARR, S. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M & STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 26, n. 4, p. 375-400, 1985.

8. ANEXOS

Anexo 1. Código de acesso, haplótipos e referências das sequências de D-loop obtidas no GenBank de *S. longirostris*.

Haplótipos	Acesso no GenBank	Referência
Nor 1	MK184992	
Nor 2	MK184993	
Nor 3	MK184994	
Nor 4	MK184995	
Nor 5	MK184996	
Nor 6	MK184997	Faria <i>et al.</i> , (2020)
Nor 7	MK184998	
Nor 8	MK184999	
Nor 9	MK185000	
Nor 10	MK185001	
Nor 11	MK185002	