

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

**GENÉTICA POPULACIONAL DO GOLFINHO-
CABEÇA-DE-MELÃO (*Peponocephala electra*,
Gray 1846) NAS DIFERENTES BACIAS
OCEÂNICAS**

SANDIELI DOS SANTOS SUDRE

**São Mateus/ES
Agosto/2022**

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

**GENÉTICA POPULACIONAL DO GOLFINHO-
CABEÇA-DE-MELÃO (*Peponocephala electra*,
Gray 1846) NAS DIFERENTES BACIAS
OCEÂNICAS**

SANDIELI DOS SANTOS SUDRE

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: **Sandieli dos Santos Sudre**

Título: **Genética populacional do golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*, Gray 1846) nas diferentes bacias oceânicas**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 09/08/2022

Com nota 9,2 pela comissão julgadora:

Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora

Examinador 1

Examinador 2

Centro Universitário Norte do Espírito Santo
Rodovia BR 101 Norte, Km. 60, Bairro Litorâneo, CEP 29932-540
São Mateus - ES
Site eletrônico: <http://www.ceunes.ufes.br>

“Assim Deus criou os grandes animais aquáticos e os demais seres
vivos que povoam as águas...E Deus viu que ficou bom”

Gn 1.21, NVI

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me sustentado até aqui. Por todo o teu cuidado com a minha vida, pela sua graça, bondade e misericórdia que me persegue todos os dias. Agradecer pelos momentos difíceis em que senti o Pai me levar nos braços, e hoje eu estou aqui escrevendo os meus agradecimentos. Obrigada Jesus por ser o meu melhor amigo e meu porto seguro, que toda honra e glória seja dada ao seu nome. O Senhor é bom!

Quero agradecer aos meus pais, Lucileia e Claudinei, por me apoiarem e estarem sempre comigo. Por terem me guiado no caminho certo e por todos os ensinamentos que me passaram. Obrigada por terem feito desses anos de longa distância algo mais fácil de suportar. Pelas inúmeras chamadas de vídeo e ligações para que eu pudesse matar a saudade de casa. E pelos imensos sacrifícios que vocês fizeram para que hoje eu pudesse estar aqui. Por vibrarem comigo a cada pequena conquista, essa é mais uma. Amo vocês!

Agradeço a toda minha família e amigos que ficaram em Caratinga, por todos os cafés, saídas para lanche e conversas que fazemos quando volto pra casa. E aos novos amigos que fiz em São Mateus, obrigada por me fazerem sentir como se eu estivesse em família.

Agradeço aos meus amigos de turma, aos meus íntimos por diversas vezes virarem a noite estudando comigo e pelos conselhos. Agradeço especialmente a Rayelle, Gabriela, Joice, que além de amigas de turma também fazem parte do mesmo laboratório. Obrigada pelas diversas ajudas nas matérias e no TCC, pelos ensinamentos, e pelas melhores risadas.

Agradeço à minha orientadora, Ana Paula, por todo conhecimento passado, atenção, compreensão, paciência, orientação e pelas oportunidades incríveis que tive. Obrigada por contribuir com o meu crescimento profissional e intelectual. Você é um exemplo de profissional e me inspira.

Agradeço a todos do laboratório GECOM, pela ajuda, acolhimento, e ensinamentos incríveis. Agradeço a Mylla, Drienne, Dahiani, Karla, Fernanda, Manu, Polly, Lorena, Heloisa por se dispuserem a me ensinar os procedimentos e por deixarem eu acompanhar a cada extração, pcr. Especialmente a Vanessa por ter me acompanhado nas análises do TCC e pelos ensinamentos para aprender cada programa. Agradeço a Jordana, Fábio e Paulo pelos ensinamentos do melhor campo da vida.

Aos membros da banca, Mylla Cescon e Vander Calmon, por terem aceitado o convite.

Agradeço aos colabores que cederam as amostras: equipes do Projeto de Monitoramento de Cetáceos na Bacia de Santos (PMC-BS), Instituto ORCA e Rede Rio Doce Mar (RRDM).

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo Geral.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3.MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Coleta das amostras.....	7
3.2 Extração e amplificação de DNA.....	7
3.3 Purificação e sequenciamento.....	8
3.4 Sequências adicionais.....	8
3.5 Alinhamento e edição.....	9
3.6 Análises das sequências e rede de haplótipos.....	9
4. RESULTADOS	10
4.1 Oceano Atlântico Sul (Brasil).....	10
4.2 Oceano Atlântico Sul (Brasil) X outras bacias oceânicas.....	11
4.3 Oceânico Pacífico.....	15
5. DISCUSSÃO	18
5.1 Oceano Atlântico Sul (Brasil).....	18
5.2 Diferentes bacias oceânicas.....	18
5.3 Oceânico Pacífico.....	19
5.4 Implicações de novos estudos genéticos.....	20
6. CONCLUSÕES	21
7. REFERÊNCIAS	22

8. APÊNDICES	27
---------------------------	-----------

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Reconstrução filogenética bayesiana de táxons selecionados dentro de Delphinidae. Fonte: (Vilstrup <i>et al.</i> , 2011).....	1
Figura 2. Diferenças morfológicas entre <i>P. electra</i> (A) e <i>F. attenuata</i> (B). Fonte: (Guia ilustrado de mamíferos marinhos do Brasil).....	2
Figura 3. Distribuição global de <i>Peponocephala electra</i> . Fonte: (Perryman, W. L., & Danil, K, 2018).....	3
Figura 4. <i>Peponocephala electra</i> . Fonte: Robin W. Baird - cascadiaresearch.org.....	4
Figura 5. Localização geográfica da coleta de amostras de pele dos golfinhos-cabeça-de-melão. Em cinza está destacada a área que abrange a Bacia de Santos. O ponto em laranja indica o local da coleta como indicado na legenda. Fonte da imagem da espécie: NOAA Fisheries.....	7
Figura 6. Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de <i>P. electra</i> no Oceano Atlântico Sul (Brasil). O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. A cor vermelha representa a localidade, conforme identificado na legenda.....	11
Figura 7. Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de <i>P. electra</i> nas diferentes bacias oceânicas. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. Cada cor representa uma localidade, conforme identificado na legenda.....	12
Figura 8. Distribuição <i>mismatch</i> da região controle do DNA mitocondrial de <i>P. electra</i> no Oceano Pacífico (A), Oceano Índico (B), Oceano Atlântico Norte (C) e Oceano Atlântico Sul (D). O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, e o eixo y mostra a frequência das diferenças. As colunas indicam os valores observados, enquanto a linha representa os valores simulados.....	15
Figura 9. Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de <i>P. electra</i> no Oceano Pacífico. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. Cada cor representa uma localidade, conforme identificado na legenda.....	17

SUMÁRIO DE TABELAS

- Tabela 1.** Localidades, número de sequências (N), acessos e referências das sequências do marcador D-loop da espécie *P. electra* obtidas no GenBank.....9
- Tabela 2.** Diversidade genética da região controle do DNA mitocondrial nas populações de *P. electra*. Populações do Oceano Pacífico (OP), Oceano Índico (OI), Oceano Atlântico Norte (OAN), Oceano Atlântico Sul (OAS) e Oceano Antártico (OA). N – número de amostras; S - sítios polimórficos; H – número de haplótipos; h – diversidade haplotípica; (π) - Diversidade nucleotídica. Índices de neutralidade: D de Tajima e FS de Fu ($p<0,02$). Valor significativo em negrito.....13
- Tabela 3.** F_{ST} par a par das populações de *P. electra*. Distância / Valor de p; $p= <0,05$. Populações do Oceano Pacífico (OP), Oceano Índico (OI), Oceano Atlântico Norte (OAN), Oceano Atlântico Sul (OAS) e Oceano Antártico (OA). Valores significativos em negrito.....14
- Tabela 4.** F_{ST} par a par das populações de *P. electra* no Oceano Pacífico. Distância / Valor de p; $p= <0,05$. Populações de Kohala (KO), Guam (GU), Johnston (JO), Ilhas Havaianas (IH), Palmyra (PA) e Pacífico (PAC). Valores significativos em negrito.....16
- Tabela 5.** Diversidade genética da região controle do DNA mitocondrial nas populações de *P. electra* no Oceano Pacífico. Populações de Kohala (KO), Guam (GU), Johnston (JO), Ilhas Havaianas (IH), Palmyra (PA) e Pacífico (PAC). N – número de amostras; S - sítios polimórficos; H – número de haplótipos; h – diversidade haplotípica; (π) - Diversidade nucleotídica. Índices de neutralidade: D de Tajima e FS de Fu ($p<0,02$).....16

RESUMO

O golfinho-cabeça-de-melão, *Peponocephala electra* (Gray, 1846), é uma espécie pelágica que ocorre em águas marinhas tropicais e subtropicais, encontrada principalmente em águas profundas e modificadas por ressurgência. Para a espécie já foram registrados diversos eventos de encalhes em massa. Eles são pouco conhecidos e não há muitos estudos genéticos publicados a seu respeito. A análise da diversidade genética de uma espécie é de suma importância para que se determine seu status de conservação ao longo de sua distribuição. Neste estudo, um total de 214 indivíduos da espécie *Peponocephala electra* foram analisados: cinco sequências recebidas do PMC-BS e 53 sequências provenientes do GenBank. Após o DNA das amostras ter sido extraído, quantificado e diluído a região controle do mtDNA (D-loop) foi amplificada. Para o Brasil foram analisadas seis sequências de 695 pb e quatro haplótipos foram encontrados. O índice de diversidade haplotípica foi alto ($h = 0,8667$) e o de diversidade nucleotídica foi baixo ($\pi = 0,004508$). Quando analisadas todas as bacias oceânicas 415 pb foram encontrados 29 haplótipos. Os índices de diversidade haplotípica variou de ($h = 0,8889$ a $1,0000$) e o de diversidade nucleotídica variou ($\pi = 0,000$ a $0,005770$). O teste de F_{st} foi significativo para todas as comparações entre os Oceano Atlântico Norte, Oceano Atlântico Sul, Oceano Pacífico e Oceano Índico. Os valores de D de Tajima não foram significativos, contudo, o teste de F_u 's para o Oceano Pacífico deu significativo, o que pode evidenciar uma expansão populacional. A rede haplotípica não revelou estruturação, os dois haplótipos mais comuns não são intimamente relacionados entre si, e foram encontrados em quase todas as localidades. Com resultados obtidos neste estudo, a espécie *Peponocephala electra* pode estar no início de um processo de expansão e estruturação populacional quando considerada sua distribuição nas diferentes bacias oceânicas. O presente estudo é o primeiro a realizar análises populacionais sobre a espécie no Atlântico Sul. No entanto, novos estudos devem ser realizados incluindo novas amostras.

Palavras-chave: Cetáceos; D-loop; Diversidade genética; Estruturação populacional.

ABSTRACT

The melon-headed dolphin, *Peponocephala electra* (Gray, 1846), is a pelagic species that occurs in tropical and subtropical marine waters, found mainly in deep and resurgence-modified waters. Several mass stranding events have been reported for the species. They are poorly known and there are not many genetic studies published about them. The genetic diversity analyses for a species is important to determine its conservation status throughout its distribution. In this study, a total of 214 individuals of the *Peponocephala electra* species was analyzed: five sequences received from PMC-BS and 53 sequences deposited in GenBank. After DNA from the samples was extracted, quantified and diluted, the control region of the mtDNA was amplified. For Brazil, six sequences of 695 bp were analyzed and four haplotypes were found. The haplotype diversity index was high for Brazil ($h = 0.8667$) and nucleotide diversity was low ($\pi = 0.004508$). When all 415 bp ocean basins were analyzed 29 haplotypes were found. The haplotype diversity index (h) ranged of 1.0000 to 0.8889 and the nucleotide diversity (π) ranged of 0.000 to 0.005770. The F_{st} test was significant for all comparisons among the North Atlantic Ocean, South Atlantic Ocean, Pacific Ocean and Indian Ocean. Tajima's D values were not significant, however, the F_u 's test for Pacific Ocean gave significant, which may evidence a population expansion. The haplotype network did not reveal any structure, the two most common haplotypes are not closely related to each other, and were found in almost all localities. With results obtained in this study, the species *Peponocephala electra* may be in the beginning of a process of population expansion and structure when considering its distribution in different ocean basins. The present study is the first population analyses of the species in the South Atlantic. However, further studies should be conducted including new samples.

Keywords: Cetaceans; D-loop; Genetic diversity; Population structure.

1.INTRODUÇÃO

O golfinho-cabeça-de-melão, *Peponocephala electra* (Gray, 1846), pertence a subfamília Globicephalinae, na qual as espécies são comumente referidas como peixe negro (blackfish) (Perryman, W. L., & Danil, K, 2018). A subfamília é composta de várias espécies de golfinhos grandes e de cor escura, incluindo *Orcinus orca*, *Pseudorca crassidens*, *Feresa attenuata*, *Globicephala melas*, *Globicephala macrorhynchus*, *Orcaella brevirostris*, *Orcaella heinsohni* e *Grampus griseus* (Vilstrup *et al.*, 2011, Martien *et al.*, 2017) (Fig. 1).

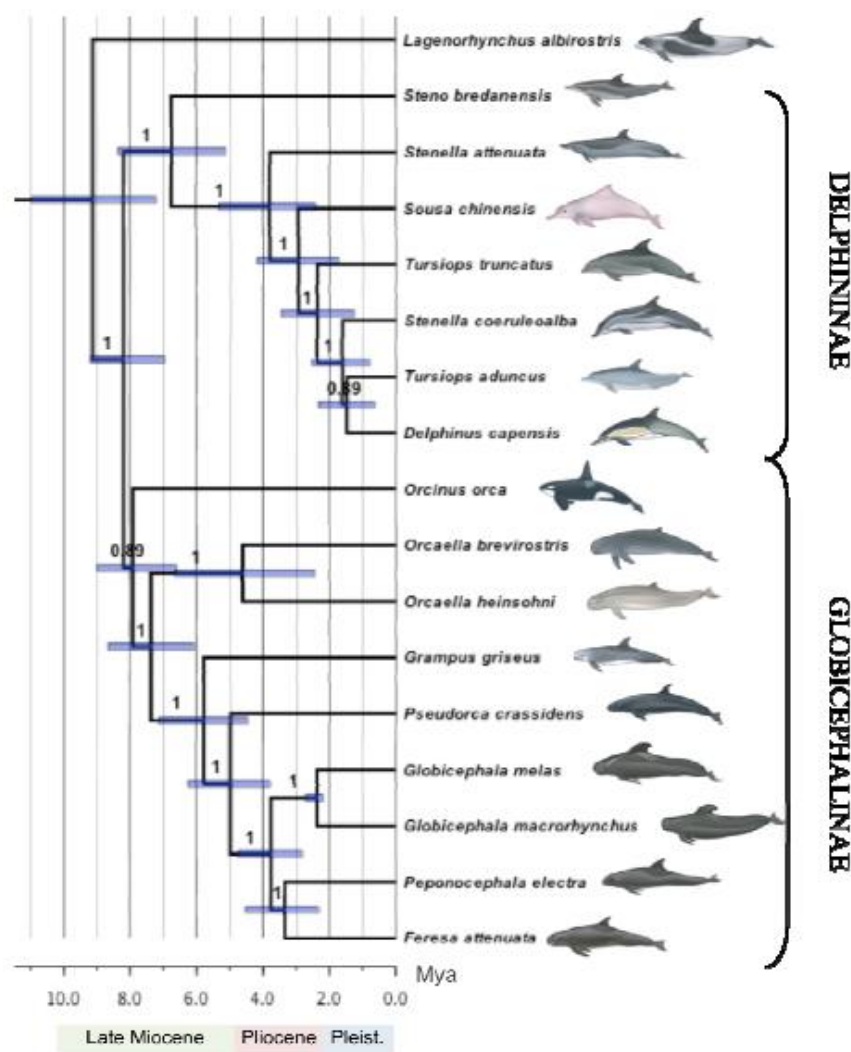


Figura 1. Reconstrução filogenética bayesiana de táxons selecionados dentro de Delphinidae. Fonte: (Vilstrup *et al.*, 2011).

A espécie *P. electra* possui características morfológicas parecidas com *F. attenuata* (orca pigmeu), a semelhança no tamanho do corpo, comportamento e pressuposta preferência de habitat causam confusão na identificação entre essas duas espécies, que no mar é difícil distinguir (Perryman, W. L., & Danil, K, 2018). O golfinho-cabeça-de-melão possui uma cabeça e pontas das nadadeiras mais pontiagudas, ambos possuem lábios brancos, mas na orca pigmeu essa área branca nos lábios estende-se até a cabeça (Fig. 2) (Siciliano & Brownell, 2015).

A. *Peponocephala electra*



B. *Feresa attenuata*



Figura 2. Diferenças morfológicas entre *P. electra* (A) e *F. attenuata* (B).

Fonte: (Guia ilustrado de mamíferos marinhos do Brasil).

O golfinho-cabeça-de-melão é uma espécie pelágica que ocorre em águas tropicais e subtropicais de todo o mundo (Klinowska, 1991) (Fig. 3). É encontrada principalmente em águas profundas e modificadas por ressurgência (Jefferson & Barros, 1997), sendo avistada perto da costa somente em regiões onde normalmente a plataforma continental é estreita e o relevo oceânico favorece a aproximação de espécies pelágicas (Perryman, 2002).

O primeiro registro no Brasil foi por meio de um crânio encontrado na barra de Caravelas, Sul da Bahia, em 1985 (Hetzl & Lodi, 1993). Apesar de ser um golfinho tipicamente pelágico, no litoral brasileiro ocorreram observações desse cetáceo próximo à costa (Hetzl & Lodi, 1993). Por ser uma espécie de hábitos oceânicos, há uma grande dificuldade de realizar estudos mais detalhados. O conhecimento acerca de sua distribuição no Oceano Atlântico ainda é considerado escasso (Mullin & Jefferson, 1994).

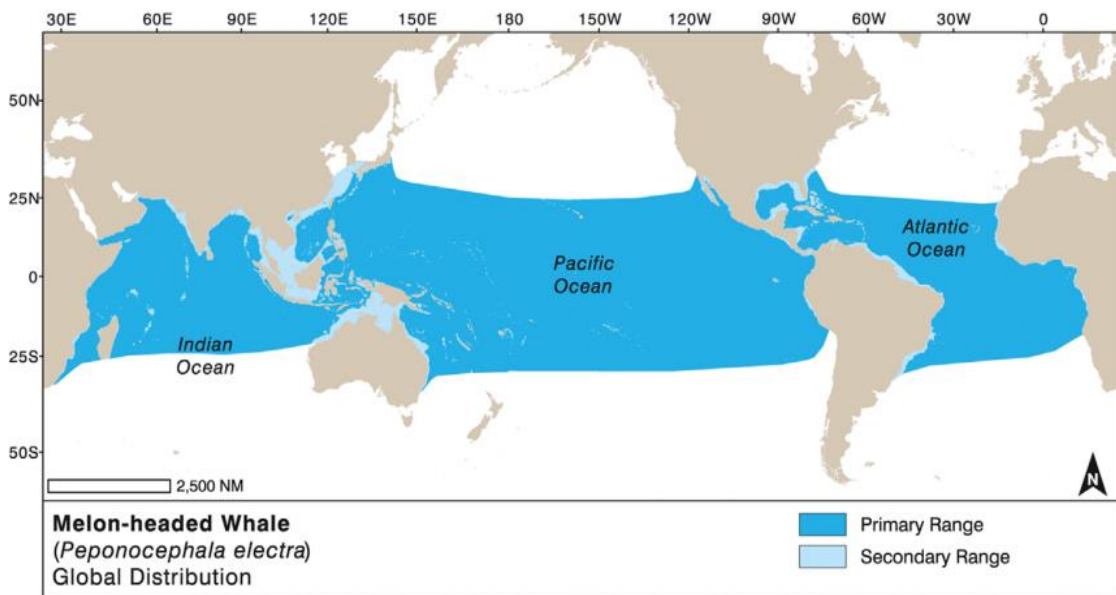


Figura 3. Distribuição global de *Peponocephala electra*.

Fonte: (Perryman, W. L., & Danil, K, 2018).

As principais características encontradas nesta espécie são que a sua cabeça é pequena com um aspecto cônico e arredondado (o que originou o nome cabeça de melão) (Fig. 4). Possuem um corpo delgado e as suas nadadeiras peitorais são longas

e pontiagudas (Carwardine, 2002). Além de terem uma coloração cinza escuro a preto, com lábios brancos e uma mancha urogenital branca. O golfinho-cabeça-de-melão pode atingir um comprimento máximo de 2,8 m (adulto) e 1,1 m (filhote- ao nascer). Seu peso máximo conhecido é de cerca de 210-275 kg (adulto) e 15-20kg (filhote) (Miranda *et al.*, 2019). São altamente sociais e ocorrem geralmente em grupos de 100 a 500 indivíduos (com um máximo de 2.000). Possuem preferência em predação lulas, pequenos peixes e camarões (Jefferson & Barros, 1997).

Sobre ameaças a sua sobrevivência, sabe-se que alguns indivíduos são capturados na pesca de cerco com retenida (pano de rede) e redes de deriva. Alguns são mortos na pesca de propulsão no Japão e outros na pesca dirigida em regiões tropicais do mundo. Vários indivíduos desta espécie já foram capturados para exibição em oceanaria (Jefferson *et al.*, 1993). Em abril de 1987, foi registrado o primeiro encalhe em massa desta espécie na América do Sul (Lodi, 1990).



Figura 4. *Peponocephala electra*. Fonte: Robin W. Baird - cascadiaresearch.org

O estudo de Martien (2014) relata que o golfinho-cabeça-de-melão é uma espécie relativamente pouco conhecida e que não há muitos estudos genéticos publicados. Em seu estudo o autor analisou dados de sequência de DNA mitocondrial para quatro espécies de cetáceos (*Globicephala macrorhynchus*, *Stenella*

longirostris, *Tursiops truncatus* e *Peponocephala electra*) para investigar a diversidade genética e a diferenciação populacional nas Ilhas Marianas no Pacífico Ocidental. O autor discutiu como as espécies se relacionam com outras populações de outras partes do Oceano Pacífico, e o porquê de ocorrer tantos encalhes em massa, relacionando com sua vulnerabilidade ao ruído antropogênico. No qual foi identificado que o *P. electra* encontrado nas ilhas Marianas compartilha haplótipos com indivíduos de outras partes do Oceano Pacífico. A espécie possui uma abundância global moderada e, embora haja pouca informação disponível, nenhuma grande ameaça foi identificada (Kiszka *et al.*, 2019).

As sensibilidades auditivas desempenham um papel significativo nos eventos de encalhe de cetáceos (Mann *et al.*, 2010). Os ruídos altos como sonar militar e exploração sísmica são grandes ameaças para a espécie (Miranda *et al.*, 2019), motivo pelo qual os golfinhos-cabeça-de-melão encalham em massa com frequência. Em 6 de julho de 2021, 11 de julho de 2021, 30 de setembro de 2021 e 3 de outubro de 2021 totalizaram 38 indivíduos da espécie encalhados na China (Zhi-tao wang *et al.*, 2021). Além de um evento em massa de 171 golfinhos-cabeça-de-melão vivos encalhados na cidade de Nakatane em 11 de março de 2001 e 85 encalhados na cidade de Kamisu, província de Ibaraki em 24 de fevereiro de 2002 (Amano *et al.*, 2014). A vocalização e a audição são indispensáveis para as funções de ecolocalização em cetáceos. Contudo, a poluição sonora antropogênica tem interferido nas funções vitais, como a ecolocalização de mamíferos marinhos (Wang *et al.*, 2021).

Os cetáceos são considerados componentes vitais da biodiversidade aquática marinha e fluvial. Tendo uma importância ecológica no ecossistema com a manutenção do equilíbrio da estrutura trófica (Katona e Whitehead, 1988; Parsons, 1992). Além disso, esses mamíferos marinhos se apresentam como potenciais bioindicadores da qualidade ambiental (*Marine Mammal Commission*, 1999; Van Bresselem *et al.*, 2003).

Os pequenos cetáceos enfrentam um número crescente de ameaças antrópicas, sendo as capturas acidentais e intencionais fatores que ocasionam a morte de milhares de indivíduos todos os anos. Além disso, sofrem com outras ameaças como, a poluição dos ambientes aquáticos, degradação de hábitat e o aumento do

tráfego de embarcações. Como dificultador, a maioria das espécies de cetáceos ainda carece de dados e informações científicas, como a sua distribuição e abundância. Essa falta de informação nos impossibilita saber o real estado de conservação dos cetáceos, acarretando o declínio de inúmeras espécies (ICMBio, 2011). De acordo com o livro vermelho da fauna brasileira, o golfinho-cabeça-de-melão foi classificado em 2012 como pouco preocupante (*Least Concern = LC*), não havendo uma nova atualização (ICMBio, 2018). E na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN de 2008, a classificação é a mesma.

Desde as décadas de 70 e 80, a molécula do DNA mitocondrial passou a ser muito utilizada em estudos de estrutura populacional (Baker *et al.*, 1998; Natoli *et al.*, 2004), relações filogenéticas (Dalebout *et al.*, 2002) e para o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos (Wilson *et al.*, 1985; Wooding *et al.*, 1997). O interesse surgiu pelas características apresentadas pelo genoma mitocondrial como: ser um genoma de herança materna, pequeno e circular, possuir ausência de recombinação, ter poucos genes, dispor de uma região não codificadora (D-loop) e ter uma taxa evolutiva alta, quando comparada com o genoma nuclear (Arias *et al.*, 2003). A caracterização e a análise da diversidade genética de uma espécie são de suma importância para que possamos avaliar se a mesma tem condições de se manter no ambiente, sendo que a diversidade genética é um dos principais aspectos da biodiversidade. Segundo Moritz (1994) manter a diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação porque fornece o potencial de adaptabilidade e evolução das espécies. Portanto, compreender a composição genética de uma espécie e sua organização (estrutura) na população é essencial para ações de manejo e conservação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade e estruturação genética do golfinho-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*) em diferentes bacias oceânicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os índices de diversidade genética para a região D-loop;
- Comparar as sequências do Brasil com sequências de outras bacias oceânicas publicadas do GenBank.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Para esse trabalho foram utilizadas amostras de pele, coletadas de cinco indivíduos da espécie *P. electra*. A amostragem foi realizada em animais vivos a partir de biópsias por balestras na área que abrange a Bacia de Santos, junto a atividades realizadas no PMC-BS (Fig. 5).

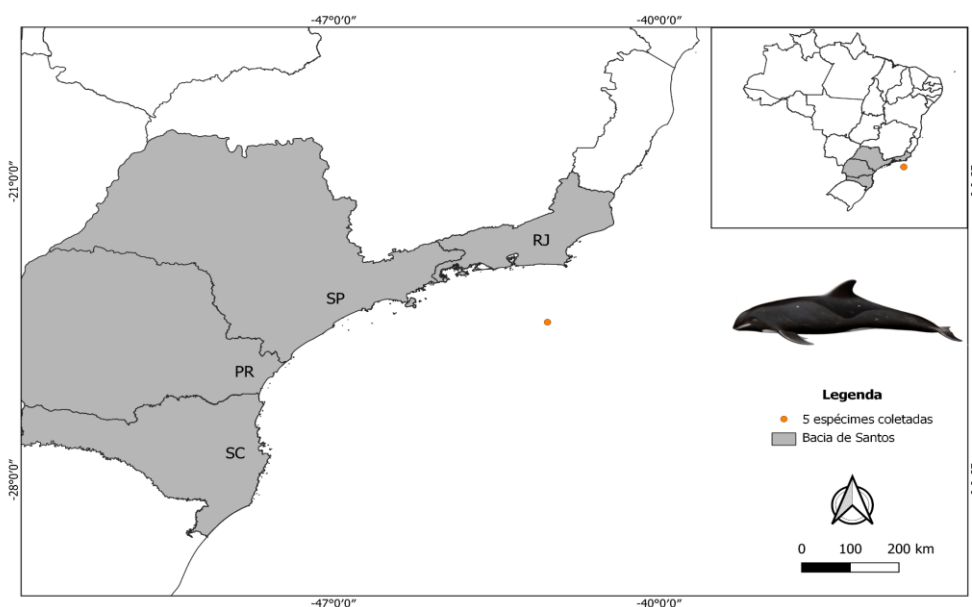


Figura 5. Localização geográfica da coleta de amostras de pele dos golfinhos-cabeça-de-melão. Em cinza está destacada a área que abrange a Bacia de Santos. O ponto em laranja indica o local da coleta como indicado na legenda. Fonte da imagem da espécie: NOAA Fisheries.

3.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA

Para as amostras de biópsia do PMC-BS a extração de DNA foi realizada utilizando-se kit *Dneasy Blood and Tissue* da Qiagen. As amostras de DNA foram

quantificadas em espectrofotômetro no Nanodrop-One.

A região controle do DNA mitocondrial (D-loop) foi amplificada utilizando-se os primers Dlp1.5 e Dlp8. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas com 10-100 ng de DNA, tampão de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTP e 0,3 u de Taq DNA polimerase. O perfil da PCR consistiu de 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 45s e 72°C por 40s e extensão final de 72°C por 40 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose corados com Bluejuice e Gelred.

3.3 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Após a amplificação, o produto total da PCR foi purificado e os fragmentos foram sequenciados, em ambas as direções (*forward* e *reverse*).

As sequências geradas junto ao PMC foram enviadas ao Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES, UFES, onde foram realizadas as próximas etapas de análise.

3.4 SEQUÊNCIAS ADICIONAIS

Além das sequências recebidas, foram adicionadas às análises 53 sequências baixadas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) que foram avaliadas no DNA *Surveillance* para confirmação da espécie (Tab. 1).

Tabela 1. Localidades, número de sequências (N), acessos e referências das sequências do marcador D-loop da espécie *P. electra* obtidas no GenBank.

LOCALIDADES	N	ACESSOS	REFERÊNCIAS
Oceano Pacífico	38	AB610388, AB610387, KT223050, KT223051, KT223052, KT223053, KT223054, KT223055, KT223056, KT223057, KT223058,KT223059, KT223060, KT223061, KT223062, KT223063,KT223064,KT223065, KT223066, KT223067, KT223068, KT223069, KT223070, KT223071, KT223072,	Martien KK <i>et al.</i> , 2017

		KT223073, KT223074, KT223075, KT223076, KT223079, KT223080, KT223086, KT223087, KT223088, KT223089, KT223090, KT223091, KT223092,	
Oceano Atlântico Norte	7	NC_019589, JF289176, JF289175, EU121127, EU121126, KT223077, KT223088	Vilstrup <i>et al.</i> , 2011, Caballero S <i>et al.</i> , 2008; Martien KK <i>et al.</i> , 2017
Oceano Atlântico Sul	1	KT223078	Martien KK <i>et al.</i> , 2017
Oceano Antártico	1	AY046904	Pichler FB <i>et al.</i> , 2001
Oceano Índico	6	KY963294, KY963282, KT223090, KT223089, KT223048, KT223049	Yusmalinda, Ni L. A <i>et al.</i> , 2018; Martien KK <i>et al.</i> , 2017

Considerando as frequências dos 53 haplótipos, encontradas nos seus respectivos artigos, o número de sequências a serem avaliadas passou para 214.

3.5 ALINHAMENTO E EDIÇÃO

As 214 sequências foram alinhadas e editadas no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013), o que permitiu a visualização das diferenças nucleotídicas entre os indivíduos. Foi utilizada a ferramenta online BLAST e a plataforma DNA *Surveillance* (Ross *et al.*, 2003) para a confirmação da espécie.

3.6 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS E REDE DE HAPLÓTIPOS

Foram feitos três testes de estruturação para comparar as bacias oceânicas, o primeiro analisando Oceano Atlântico Sul, o segundo Atlântico Sul comparado com o Oceano Pacífico, Oceano Índico, Oceano Atlântico Norte e Oceano Antártico e o terceiro teste realizando comparações de localidades no Oceano Pacífico.

O programa Arlequin v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2010) foi utilizado para calcular: os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica; o número de haplótipos

encontrados para cada localidade amostrada; realizar testes de estruturação populacional, segundo análise de variância molecular (AMOVA) e teste de estruturação (F_{ST}); a Distribuição *Mismatch*, que calcula a distribuição do número de diferenças entre pares de haplótipos podendo estimar parâmetros de demografia e expansão populacional; testes de neutralidade seletiva usando os testes D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997).

O programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2010) foi utilizado para calcular o número de haplótipos para a população total, número de mutações e sítios polimórficos, além de gerar os arquivos de entrada para os programas Arlequin e PopArt. As redes de haplótipos foram construídas por meio dos cálculos Median-Joining através do programa PopArt (Leigh & Bryant, 2015). Essas redes são usadas na análise de dados genéticos populacionais, para visualizar as relações genealógicas no nível intraespecífico, bem como para inferir sobre a biogeografia e a história evolutiva das populações (Bandelt *et al.*, 1999).

4. RESULTADOS

4.1 OCEANO ATLÂNTICO SUL (BRASIL)

As cinco sequências editadas e alinhadas resultaram em fragmentos de 700 pb. Após a adição de uma sequência do Brasil (Oceano Atlântico Sul) retirada do GenBank, os fragmentos ficaram com 695 pb, totalizando seis sequências. Com as ferramentas BLAST e DNA Surveillance foi comprovado que as amostras eram da espécie *P. electra*.

Para as amostras do Brasil foram encontrados quatro haplótipos e sete sítios variáveis. A frequência dos haplótipos 1 e 4 ocorreu em quatro dos seis indivíduos. Os outros dois haplótipos foram encontrados em apenas um indivíduo (Apêndice A). A diversidade haplotípica foi $0,8667 \pm 0,1291$ e a nucleotídica foi $0,004508 \pm 0,003131$. A rede de haplótipos também mostrou a frequência dos haplótipos 1 e 4 (Fig. 6).

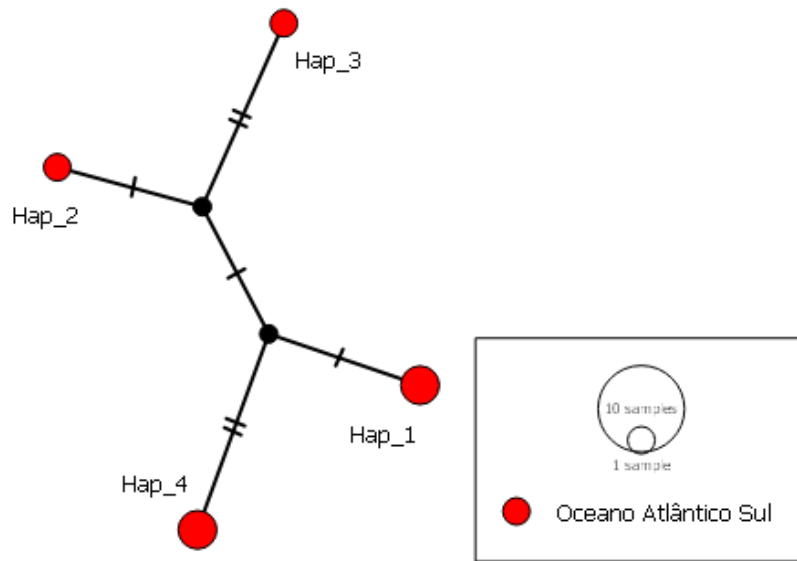


Figura 6. Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de *P. electra* no Oceano Atlântico Sul (Brasil). O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. A cor vermelha representa a localidade, conforme identificado na legenda.

4.2 OCEANO ATLÂNTICO SUL (BRASIL) X OUTRAS BACIAS OCEÂNICAS

No total foram 214 sequências analisadas, sendo 209 baixadas do GenBank e 5 foram geradas nesse estudo. Após o alinhamento e edição foram obtidos fragmentos de 415 pb. Com as ferramentas BLAST e DNA Surveillance todas as sequências adicionadas apresentaram alto percentual de homologia com a espécie *P. electra*, confirmando sua identificação.

Foram encontrados 29 haplótipos e 20 sítios variáveis (Apêndice B). Os haplótipos 1 e 2 foram os mais frequentes, e a localidade com maior número de haplótipos foi o Oceano Pacífico (OP), sendo encontrados 20 haplótipos. Para o Oceano Atlântico Norte (OAN) foram encontrados três haplótipos. Para o Oceano Índico (OI) foram encontrados seis haplótipos. No Oceano Atlântico Sul (OAS) foram encontrados quatro haplótipos. Para o Oceano Antártico (OA) foi encontrado um haplótipo, pois só tinha uma amostra para essa localidade. A rede haplotípica demonstrou poucos compartilhamentos tais como, no Haplótipo 1: OP, OI e OAS. Haplótipo 2: OP e OAN; Haplótipo 13: OP e OA (Fig.7).

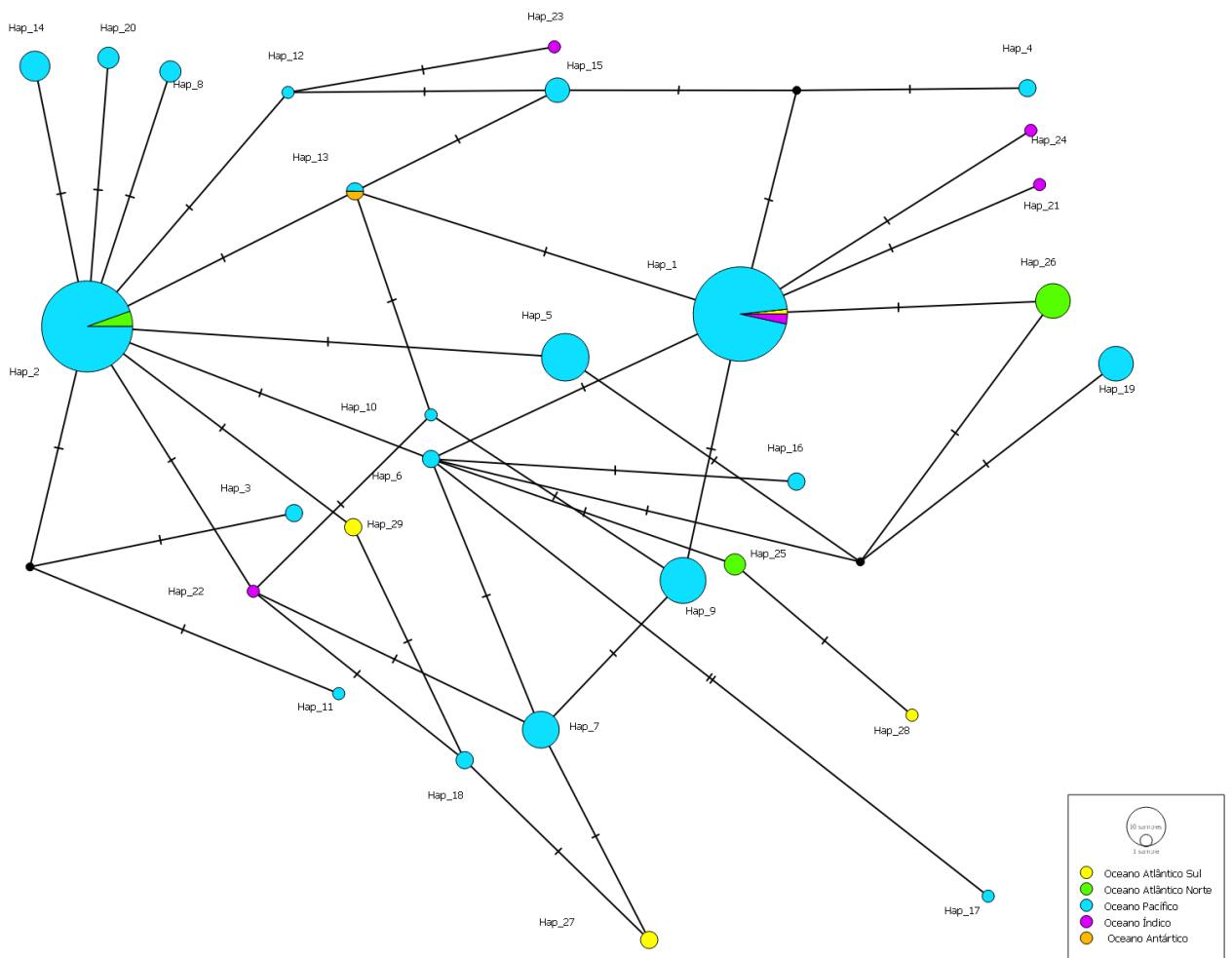


Figura 7. Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de *P. electra* nas diferentes bacias oceânicas. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. Cada cor representa uma localidade, conforme identificado na legenda.

A diversidade haplotípica total foi 0,8453 +/- 0,0161 e a nucleotídica foi 0,004808 +/- 0,003016. Os índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) do Oceano Antártico (OA) demonstraram valores zero, devido a presença de um haplótipo nessa localidade (Tab. 2).

Para o Oceano Antártico (OA) o valor de D de Tajima foi zero e o Fu'Fs não foi calculado por ter apenas uma amostra. Para as outras localidades os valores encontrados do teste de neutralidade D de Tajima e Fu'Fs foram de D= -1,08631 (p=0,127) e Fs= -18,77078 (p=0,00). Os valores de D de Tajima não foram significativos, contudo, o teste de Fu'Fs para o Oceano Pacífico (OP) deu significativo, o que pode evidenciar uma expansão populacional (Tab. 2).

Tabela 2. Diversidade genética da região controle do DNA mitocondrial nas populações de *P. electra*. Populações do Oceano Pacífico (OP), Oceano Índico (OI), Oceano Atlântico Norte (OAN), Oceano Atlântico Sul (OAS) e Oceano Antártico (OA). N – número de amostras; S - sítios polimórficos; H – número de haplótipos; h – diversidade haplotípica; (π) - Diversidade nucleotídica. Índices de neutralidade: D de Tajima e FS de Fu (p<0,02). Valor significativo em negrito.

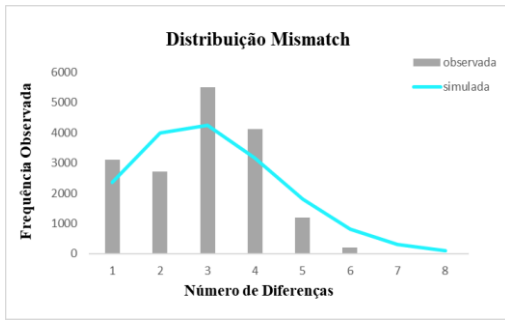
População	N	S	H	h	(π)	D	Fs de Fu
OP	184	16	20	0,8155 +/- 0,0183	0,004573 +/- 0,002902	D= -0,8188 (p=0,214)	Fs= -8,32339 (p= 0,008)
OI	9	7	6	0,8889 +/- 0,0910	0,005770 +/- 0,003920	D= -0,3233 (p=0,413)	Fs= -1,71693 (p=0,099)
OAN	14	4	3	0,6264 +/- 0,1045	0,004300 +/- 0,002967	D= 1,36817 (p=0,905)	Fs= 2,24952 (p=0,88)
OAS	6	7	4	0,8667 +/- 0,1291	0,004508 +/- 0,003131	D= -0,0604 (p= 0,474)	Fs= -0,02372 (p=0,412)
OA	1	0	1	1,0000 +/- 0,0000	0,00000 +/- 0,000000	D= 0,00000 (p=1,00)	-

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que o percentual de variação dentro das populações foi de 87,74%, e entre as populações houve um percentual de 12,26%, evidenciando que houve uma maior diversidade dentro das populações do que entre. Os valores de F_{ST} demonstraram valores significativos para algumas localidades (Tab. 3). O gráfico de distribuição *Mismatch* evidenciou uma curva multimodal para todas as populações (Fig. 8).

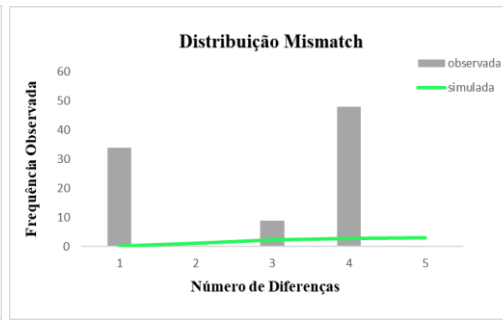
Tabela 3. F_{ST} par a par das populações de *P. electra*. Distância / Valor de p; $p < 0,05$. Populações do Oceano Pacífico (OP), Oceano Índico (OI), Oceano Atlântico Norte (OAN), Oceano Atlântico Sul (OAS) e Oceano Antártico (OA). Valores significativos em negrito.

Populações	OP	OI	OAN	OAS	OA
OP	-	-	-	-	-
OI	0,05540 / 0,09910	-	-	-	-
OAN	0,13572 / 0,00000	0,15623 / 0,03604	-	-	-
OAS	0,19731 / 0,01802	0,19660 / 0,01802	0,29769 / 0,00000	-	-
OA	-0,20128 / 0,99099	-0,34375 / 0,99099	0,10989 / 0,99099	0,08235 / 0,99099	-

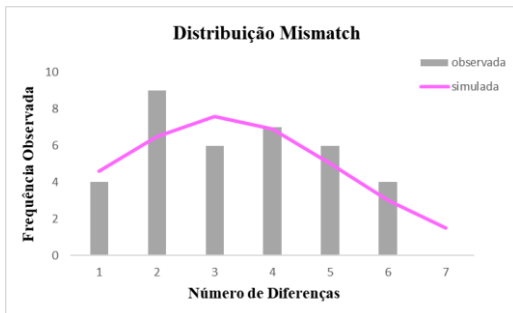
A. Oceano Pacífico



C. Oceano Atlântico Norte



B. Oceano Índico



D. Oceano Atlântico Sul

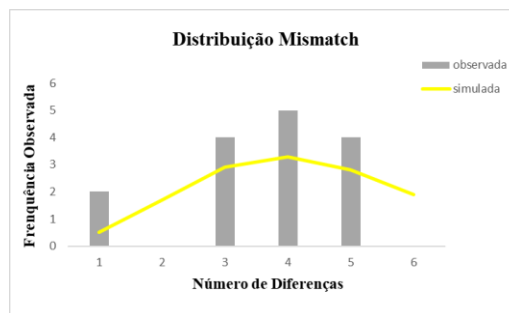


Figura 8. Distribuição *mismatch* da região controle do DNA mitocondrial de *P. electra* no Oceano Pacífico (A), Oceano Índico (B), Oceano Atlântico Norte (C) e Oceano Atlântico Sul (D). O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, e o eixo y mostra a frequência das diferenças. As colunas indicam os valores observados, enquanto a linha representa os valores simulados.

4.3 OCEANO PACÍFICO

No Oceano Pacífico foram avaliadas seis localidades, Kohala, Guam, Johnston, Ilhas Havaianas, Palmyra e Pacífico, no qual o Pacífico são sequências que não possuía localização definida. O teste de AMOVA evidenciou uma maior variação dentro das populações, sendo de 90,26%. Os valores de F_{ST} obtiveram alguns valores significativos (Tab.4).

Os testes de neutralidade D de Tajima mesmo dando valores negativos não obtiveram significância. O F_u 's não demonstrou valores significativos. As localidades demonstraram alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica, entretanto, os índices para Guam foram baixos devido ao baixo número de haplótipos (Tab. 5).

Tabela 4. F_{ST} par a par das populações de *P. electra* no Oceano Pacífico. Distância / Valor de p; $p < 0,05$. Populações de Kohala (KO), Guam (GU), Johnston (JO), Ilhas Havaianas (IH), Palmyra (PA) e Pacífico (PAC). Valores significativos em negrito.

Populações	KO	GU	JO	IH	PA	PAC
KO	-	-	-	-	-	-
GU	0,34523 / 0,00000	-	-	-	-	-
JO	0,30529 / 0,00000	0,58435 / 0,05405	-	-	-	-
IH	0,08274 / 0,00000	0,14932 / 0,10811	0,22491 / 0,00000	-	-	-
PA	0,05143 / 0,02703	0,18347 / 0,11712	0,28703 / 0,00000	0,03171 / 0,01802	-	-
PAC	0,16562 / 0,10811	0,04545 / 0,79279	0,47239 / 0,02703	0,00579 / 0,34234	-0,02399 / 0,36036	-

Tabela 5. Diversidade genética da região controle do DNA mitocondrial nas populações de *P. electra* no Oceano Pacífico. Populações de Kohala (KO), Guam (GU), Johnston (JO), Ilhas Havaianas (IH), Palmyra (PA) e Pacífico (PAC). N – número de amostras; S - sítios polimórficos; H – número de haplótipos; h – diversidade haplotípica; (π) - Diversidade nucleotídica. Índices de neutralidade: D de Tajima e FS de Fu ($p < 0,02$).

População	N	S	H	h	(π)	D	Fs de Fu
KO	43	6	6	0,6401 +/- 0,0532	0,003418 +/- 0,002276	D= 0,51983 (p=0,711)	Fs= 0,32630 (p=0,652)
GU	2	2	2	1,0000 +/- 0,5000	0,004115 +/- 0,005040	D= 0,00000 (p=1,00)	Fs= 0,69315 (p=0,375)
JO	10	4	4	0,7111 +/- 0,1175	0,002652 +/- 0,002046	D= -0,3395 (p=0,361)	Fs= -0,34778 (p=0,313)
IH	70	12	14	0,8484 +/- 0,0248	0,004129 +/- 0,002610	D= -0,5436 (p= 0,349)	Fs= -4,68227 (p=0,026)
PA	56	10	8	0,7364 +/- 0,0384	0,003843 +/- 0,002477	D= -0,3983 (p=0,405)	Fs= -0,49653 (p=0,461)
PAC	3	2	2	0,6667 +/- 0,3143	0,002743 +/- 0,002819	D= 0,00000 (p=0,928)	Fs= 1,06087 (p=0,601)

A rede haplotípica demonstrou que os haplótipos 1 e 2 foram os mais frequentes, e a localidade com maior número de haplótipos foi as Ilhas Havaianas, sendo encontrados 14 haplótipos, oito compartilhamentos foram evidenciados, tais como, no Haplótipo 1: KO, GU, JO e IH. Haplótipo 2: PA, IH, GU, KO e PAC; Haplótipo 3: GU e IH; Haplótipo 5: KO e IH; Haplótipo 7: IH, JO e KO; Haplótipo 8: JO e IH; Haplótipo 9: IH, PA e JO; Haplótipo 17: PA e PAC (Fig. 9).

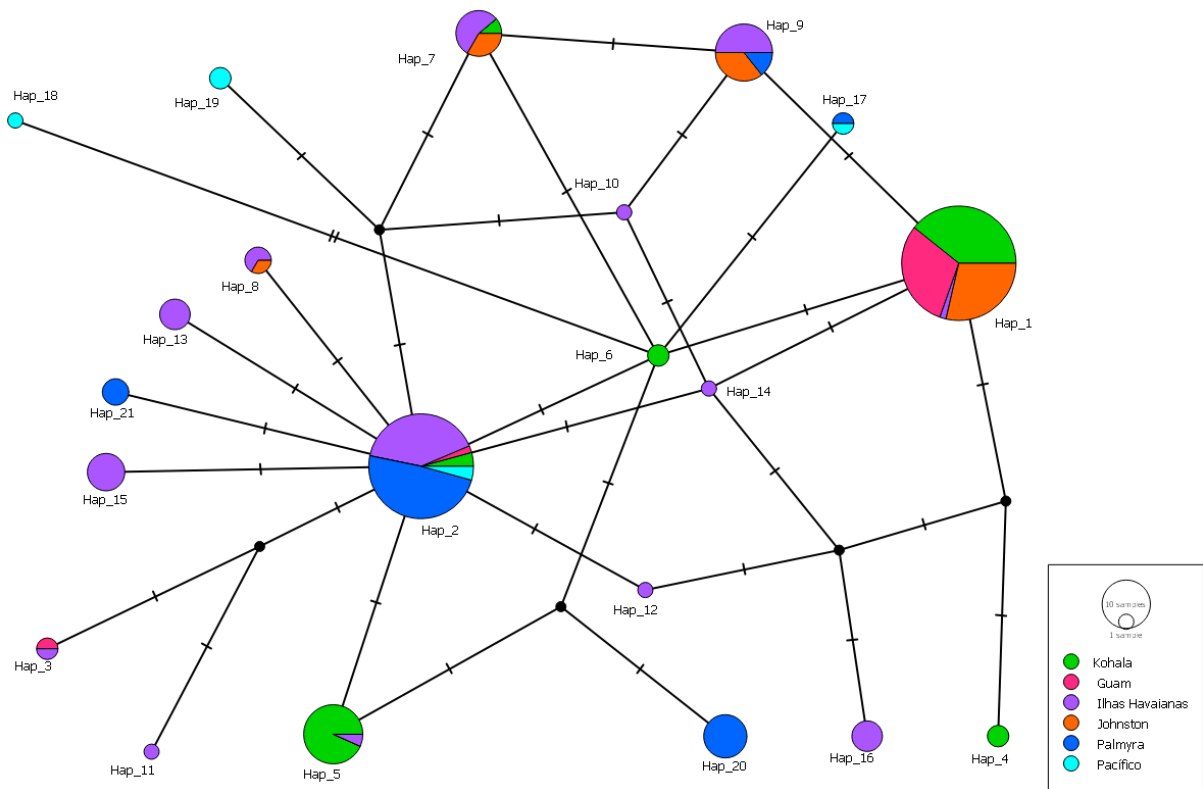


Figura 9. Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de *P. electra* no Oceano Pacífico. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. Cada cor representa uma localidade, conforme identificado na legenda.

5. DISCUSSÃO

5.1 OCEANO ATLÂNTICO SUL (BRASIL)

Como a espécie *P. electra* é pouco conhecida ainda não é possível se inferir o real estado de conservação de suas populações. Contudo, sugere-se que essa espécie pode apresentar populações regionais diferenciadas (Aschettino *et al.*, 2012).

Os parâmetros genéticos de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica da região controle do mtDNA podem contribuir com a avaliação do estado atual da população de uma determinada espécie (Bandelt *et al.*, 1999). Valores de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica indicam que essa população pode ter sofrido uma expansão (Hedrick, 2005). Nas análises genéticas deste estudo foi detectado esse padrão, no entanto, devemos nos atentar que esse dado não é robusto, uma vez que temos poucos indivíduos amostrados até o momento.

O baixo número amostral das sequências do Brasil nos impossibilitou de realizar testes adequados de AMOVA e F_{ST} , o que não nos permite conclusões robustas sobre como a dinâmica populacional da espécie se encontra. No entanto, foram registrados os haplótipos encontrados para a Bacia de Santos até o momento e apresentados dados iniciais sobre a diversidade genética da espécie, principalmente se esses haplótipos são compartilhados com outras localidades, como será apresentado no tópico a seguir.

5.2 DIFERENTES BACIAS OCEÂNICAS

A espécie *P. electra* para as bacias oceânicas, Oceano Atlântico Sul, Oceano Índico e Oceano Pacífico apresentou uma diversidade haplotípica alta e nucleotídica baixa, o que sugere que essa população sofreu uma expansão. Tal fato pode ser também complementado quando a rede haplotípica gerada apresenta uma estrutura em formato de estrela (Slatkin & Hudson, 1991), como encontrado nesse estudo.

Os testes de AMOVA evidenciaram que o percentual de variação foi maior dentro das populações do que entre elas. Os valores de F_{ST} foram significativos para todas as comparações entre os Oceano Atlântico Norte, Oceano Atlântico Sul,

Oceano Pacífico e Oceano Índico, demonstrando que a população possa ter uma estruturação entre as diferentes bacias.

Os testes de neutralidade também indicam se a população está em expansão ou não. Os valores negativos de D de Tajima sugerem expansão populacional, e os valores positivos podem sugerir a existência de um gargalo populacional recente (Tajima, 1989). Para que os valores do F_u ' F_s sejam considerados significativos eles terão que estar abaixo de 0,02 (Fu, 1997). Os testes de neutralidade D de Tajima mesmo dando valores negativos não obteve significância. O gráfico de Distribuição *Mismatch* exibiu uma curva multimodal para todas as localidades, o que sugere que as populações não estejam em expansão e sim em equilíbrio. A rede de haplótipos possui uma conformação de estrela com haplótipos de maior frequência dando origem a haplótipos de menor frequência e únicos, no qual, os haplótipos mais comuns não estão intimamente relacionados entre si, sendo encontrados em quase todas as localidades, um formato de demonstra expansão. Apenas quatro haplótipos foram compartilhados entre as bacias, o Haplótipo 1 encontrado no Oceano Pacífico, Índico e Atlântico Sul, o Haplótipo 2 no Oceano Pacífico e Oceano Atlântico Norte (haplótipos de maior frequência), o Haplótipo 13 compartilhado entre os Oceano Pacífico e Oceano Antártico. O mesmo padrão de rede foi encontrado no estudo Martien (2017).

5.3 OCEANO PACÍFICO

Como o Oceano Pacífico demonstrou um alto número amostral, uma alta diversidade haplotípica sendo a única população a obter um valor significativo do teste F_u ' F_s , fez-se necessário análises para averiguar se nessa localidade continham populações diferentes e se estavam estruturadas. Entretanto, os valores de F_{ST} demonstraram que as populações tiveram uma diferenciação baixa entre si e o teste de AMOVA evidenciou que houve uma maior variação genética dentro das populações do que entre elas. A rede de haplotipos não demonstrou separação em haplogrupos, sendo que haplótipos foram compartilhados em todas as regiões, indicando fluxo gênico entre as localidades. Os testes de neutralidade não obtiveram significância e o gráfico de distribuição *Mismatch* exibiu uma curva multimodal, sugerindo que a espécie *P. electra* no Oceânico Pacífico encontra-se em equilíbrio.

5.4 IMPLICAÇÕES DE NOVOS ESTUDOS GENÉTICOS

As populações mais bem estudadas desta espécie são aquelas ao redor das principais ilhas havaianas, tendo vários estudos sobre o comportamento e a estrutura da espécie. Para avaliar a estrutura populacional dessas, Aschettino *et al.*, (2012) utilizaram fotoidentificação e monitoramento do uso do habitat da espécie a fim de descrever a existências de várias populações nesse local. Todos os esforços foram feitos para identificação com fotos de todos os indivíduos dentro de um grupo. A estrutura populacional foi avaliada com base em associações de indivíduos entre grupos. Neste estudo citado, as associações, avistamentos e locais de encontro foram fundamentais para que os autores evidenciassem a existência de pelo menos duas populações do golfinho-cabeça-de-melão nas águas havaianas. As quais eles classificaram como população residente (a menor) e população principal (a maior). Eles ainda abordam que a existência de uma população residente sugere que pode haver outras populações de golfinhos-cabeça-de-melão associadas a ilhas no Havaí, e caso houver, de fato, outras pequenas populações da espécie podem estar usando exclusivamente nichos específicos da ilha. Esses animais podem estar em maior risco, ameaçados por fatores diferentes, incluindo interações de pesca e ruído antropogênico de alta intensidade. Como esses resultados foram obtidos por meio da fotoidentificação, os próprios autores relatam que análises genéticas são necessárias para avaliar o nível de diferenciação entre essas populações.

Martien e colaboradores (2017) realizaram um estudo genético pioneiro no Oceano Pacífico, Oceano Atlântico Norte e Oceano Pacífico, principalmente nas regiões das Ilhas Havaianas a fim de avaliar a estrutura populacional de *P. electra* a nível regional e global, bem como identificar se esses animais apresentam padrões de diferenciação genética semelhante a outras espécies da subfamília Globicephalinae, tendo avaliado também as populações das Ilhas Havaianas citada no estudo anterior. O estudo concluiu que o golfinho-cabeça-de-melão não possui os mesmos padrões de divergências mitocondriais das outras espécies da subfamília. Ademais as duas populações nas ilhas havaianas realmente possuem uma diferenciação, entretanto quando analisaram as bacias oceânicas, concluíram que a espécie possui haplótipos intimamente relacionados, que mesmo sendo de diferentes bacias oceânicas eles podem ser da mesma população. Os autores ainda reforçam que novas análises de amostras globais seriam valiosas para elucidar os padrões de

conectividade entre as populações de *P. electra* particularmente entre populações oceânicas, sendo o primeiro estudo a fazer análise genética para *P. electra*.

O presente estudo é o segundo a realizar estudos genéticos populacionais da região controle do DNA mitocondrial sobre a espécie *P. electra* em bacias oceânicas, e o primeiro a trazer informações iniciais sobre análises genéticas da espécie no Brasil. Novos estudos devem ser realizados incluindo novas amostras, para melhor esclarecimento sobre os padrões de estruturação, e como as populações estão intimamente ligadas.

6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho a apresentar dados sobre a genética da espécie no Brasil, no qual a população apresentou uma alta diversidade haplotípica e baixa nucleotídica e que está diferenciada das populações das outras bacias oceânicas. As informações sobre a diversidade genética da espécie *Peponocephala electra* adquiridas neste estudo são fundamentais para uma compreensão futura de como a espécie se encontra e como as populações se relacionam ao longo de sua distribuição.

7. REFERÊNCIAS

ARIAS MC, FRANCISCO FO, SILVESTRE D (2003). **O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos**. Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure. Editora UNESC, Criciúma.

ASCHETTINO, J.M., BAIRD, R.W., MCSWEENEY, D.J., WEBSTER, D.L., SCHORR, G.S., HUGGINS, J.L., MARTIEN, K.K., MAHAFFY, S.D. AND WEST, K.L. (2012). **Population structure of melon-headed whales (*Peponocephala electra*) in the Hawaiian Archipelago: Evidence of multiple populations based on photo identification**. Marine Mammal Science, 28: 666-689. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2011.00517.x>

BANDELT HJ, FOSTER P, ROHL A (1999). Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16: 37-48.

BAKER CC, MEDRANO-GONZALEZ L, CALAMBOKIDIS J, PERRY A, PICHLER F, ROSEMBAUM H, STRALEY JM, URBAN-RAMIREZ J, YAMAGUCHI M, VON ZIEGESAR O (1998). **Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the North Pacific**. Molecular Ecology, 7: 695–707.

CABALLERO S, JACKSON J, MIGNUCCI-GIANNONI AA, BARRIOS-GARRIDO H, BELTRÁN-PEDREROS S, MONTIEL-VILLALOBOS MA, ROBERTSON KM, BAKER CS. (2008). **Molecular systematics of South American dolphins *Sotalia*: sister taxa determination and phylogenetic relationships, with insights into a multi-locus phylogeny of the Delphinidae**. Mol Phylogenet Evol. Jan;46(1):252-68. doi: 10.1016/j.ympev.2007.10.015. Epub 2007 Oct 25. PMID: 18053749.

CARWARDINE, M. (2002). **Whales, Dolphins and porpoises**. Smithsonian Handbooks. Dorling Kindersley Publishing, Inc., United States of America, 156157 pp.

DALEBOUT ML, MEAD JG, BAKER CS, BAKER AL, VAN HELDEN AL (2002). A new species of beaked whale *Mesoplodon perrini* sp. N. (Cetacea: Ziphiidae) discovered through phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences. **Marine Mammal Science**, 18(3): 577-608.

EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S (2010). Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis', **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1: 47-50.

FU YX (1997). **Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection**. Human Genetics Center, University of Texas, Houston, Texas 77225.

HEDRICK, P. (2005). **Genetics of populations**. Jones e Bartlett Learning.

HETZEL, B.; LODI, L. (1993). Baleias, Botos e Golfinhos: **guia de identificação para o Brasil**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 279 p.

ICMBio (2011) **Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: pequenos cetáceos**/ANDRE SILVA BARRETO et al.; organizadores: CC Rocha-Campos; IG Câmara e DJ Pretto – Brasília: 132 p.

ICMBio (2018) **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I** / -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 492 p.

JEFFERSON, T.A. & BARROS, N.B. (1997). *Peponocephala electra*. Mammalian Species. **American Society of Mammalogists**, 553: 1-6.

JEFFERSON, THOMAS A, MARC A. (1993). Webber, and Stephen Leatherwood. **Marine Mammals of the World**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Print.

KATONA, S., WHITEHEAD, H. (1988). **Are cetacea ecologically important?** Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. 26: 553-568.

KISZKA, J. & BROWNELL JR., R.L. (2019). *Peponocephala electra*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2019**: e.T16564A50369125. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T16564A50369125.en>

KLINOWSKA, M. (1991). **Dolphins, Porpoises and Whales of the World: The IUCN Red Data Book**. The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K., 429 p.

LEIGH, JESSICA W.; BRYANT, David (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110-1116.

LODI, L., SICILIANO, S. And CAPISTRANO, L. (1990). Mass stranding of *Peponocephala electra* (Cetacea, Globicephalinae) on Piracanga beach, Bahia, Northeastern Brazil. **Scientific Reports of Cetacean Research**, 1: 79-84.

MANN D, HILL-COOK M, MANIRE C, GREENHOW D, MONTIE E, POWELL J, et al. (2010). **Perda Auditiva em Golfinhos e Baleias Odontocetos Encalhados**. PLoS ONE 5(11): e13824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013824>

M. AMANO, T.K. YAMADA, T. KURAMOCHI, A. HAYANO, A. KAZUMI, T. SAKAI (2014). **Life history and group composition of melon-headed whales based on mass strandings in Japan** Mar. Mammal Sci., 30, pp. 480-493, 10.1111/mms.12050

MARINE MAMMAL COMMISSION. (1999). **Marine Mammals and persistent ocean contaminants**. In: O’Shea, T.J.; Reeves, R.R., Long, A.K., editors. Proceedings of the Marine Mammals Commission Workshop. Bethesda: MMC.

MARTIEN KK, HANCOCK-HANSER BL, BAIRD RW, KISZKA JJ, ASCHETTINO JM, OREMUS M, HILL MC (2017). **Unexpected patterns of global population structure in melon-headed whales *Peponocephala electra***. Mar

MARTIEN, KAREN K, MARIE C. HILL, CISE A. M. VAN, KELLY M. Robertson, SAMUEL M. WOODMAN, LOUELLA DOLAR, VICTORIA L. (2014). Pease, and ERIN M. Oleson. **Genetic Diversity and Population Structure in Four Species of Cetaceans Around the Mariana Islands.**

MIRANDA, A. V. de, LUNA, F. de O., SOUSA, G. P. de, FRUET, P. F., & ZANONI, S. A. (2019). **Guia Ilustrado de Identificação de Cetáceos e Sirênios do Brasil ICMBio / CMA.** In ICMBio.

MONTEIRO-FILHO E. L. A *et al.* (2021). **Guia ilustrado de mamíferos marinhos do Brasil.** Instituto de Pesquisas Cananéia (IPec), SP, ed. 2.

MORITZ, C. (1994). **Defining “Evolution Significant Units” for conservation.** Trends Ecology Evolution, v. 9, p. 373-375.

MULLIN, K.D. & JEFFERSON, T.A (1994). **First sightings of melonheaded whales (*Peponocephala electra*) in the Gulf of Mexico.** Marine Mammal Science, 10 (3): 342-348.

NATOLI A, PEDDEMORS VM, HOELZEL AR (2004). **Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial analyses,** 17: 363-375.

PARSONS, T.R (1992). **The removal of marine predators by fisheries and the impacts of thopic structure.** Marine Pollution Bulletin. 25(1/4): 51-53.

PERRYMAN, W. L., & DANIL, K. (2018). Melon-headed whale: *Peponocephala electra*. In **Encyclopedia of marine mammals** (pp. 593-595). Academic Press.

PERRYMAN, W.L (2002). Melon-Headed Whale (*Peponocephala electra*). In: W.F. Perrin, B. Würsig, & H. Thewissen (ed). **Encyclopedia of Marine Mammals.** Academic Press, San Diego, CA. 733-735 pp.

PICHLER, F. B. et al. (2001). **Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*).** Molecular Ecology, v. 10, n. 9, p. 2215-2223.

ROZAS, J. P. et al. (2010). DnaSP version 5.10. 1 (Self extracting file of 4.6 Mb). **Universitat de Barcelona.**

ROSS HA, LENTO GM, DALEBOUT ML, GOODE M, EWING G, MCLAREN P, RODRIGO AG, LAVERY S, BAKER CS (2003). DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. **Journal of Heredity, 94:** 111–114.

SICILIANO, SALVATORE; BROWNELL JR, ROBERT L (2015). Getting to know you: Identification of pygmy killer whales (*Feresa attenuata*) and melon-headed

whales (*Peponocephala electra*) under challenging conditions. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 63, p. 511-514.

SLATKIN, M. & HUDSON. R.R (1991). **Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations**. *Genetics* 129, 555- 562.

TAJIMA F (1989). **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism**. *Genetics*, 123: 585–595.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 2725-2729.

VAN BRESSEM, M.F., WAEREBEEK, K.V., RAGA, J.A., GASPAR, R., DI BENEDITTO, A.P., RAMOS, R., SIEBERT, U. (2003). **Tattoo diseases of odontocetes as a potential indicator of a degrading or stressful environment: a preliminary report**. Berlin: International Whaling Commission.

VILSTRUP, J.T., HO, S.Y., FOOTE, A.D. *et al.* (2011). **Mitogenomic phylogenetic analyses of the Delphinidae with an emphasis on the Globicephalinae**. *BMC Evol Biol* 11, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-65>

WILSON AC, CANN RL, GEORGE M, GYLLENSTEN UB, HELMBYCHOWSKI KM, HIGUSHI RG, PALUMBI EM, Sage RD, STONEKING M (1985). **Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics**. *Biological Journal of Linnean Society*, 26: 375-400.

WOODING A, WARD R (1997). **Phylogeography and Pleistocene Evolution in the North American Black Bear**. *Society for Molecular Biology*, 14(11): 1096-1105.

YUSMALINDA N.LA, ANGORO A. W., SUHENDRO D. M., RATHAL. MJ, SUPRAPTID., KREBD., & CAHYANIN. KD (2018). **Identifikasi jenis pada kejadian cetacea terdampar di indonésia dengan teknik molekuler**. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*, 9 (2),465-474. <https://doi.org/10.29244/jitkt.v9i2.19283>

Z.-T. WANG, P.X. DUAN, T. AKAMATSU, Y.W. CHEN, X. AN, J. YUAN, P.Y. LEI, J. LI, L. ZHOU, M.C. LIU, Y.N. YANG, F. FAN, K.X. WANG, D. WANG (2021). **Riverside underwater noise pollution threaten porpoises and fish along the middle and lower reaches of the Yangtze River, China** *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 226, Article 112860, 10.1016/j.ecoenv.2021.112860

ZHI-TAO WANG, ALEXANDER YA SUPIN, TOMONARI AKAMATSU, PENG-XIANG DUAN, YI-NING YANG, KE-XIONG WANG, DING WANG (2021). **Auditory evoked potential in stranded melon-headed whales (*Peponocephala electra*): With severe hearing loss and possibly caused by anthropogenic noise pollution**, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 228, 113047, ISSN 0147-6513,<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113047>.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Sítios variáveis de 695 pb da região controle do DNA mitocondrial de *P. electra* determinando quatro haplótipos e suas respectivas frequências.

Haplótipos	97	233	302	304	370	394	604	Frequência
1	T	C	G	C	T	T	G	2
2	-	-	A	T	C	-	-	1
3	C	-	A	-	C	C	-	1
4	-	T	-	-	C	-	A	2

APÊNDICE B. Sítios variáveis de 415 pb da região controle do DNA mitocondrial de *P. electra* quando analisados os Oceanos Atlântico Norte, Oceano Atlântico Sul, Oceano Pacífico, Oceano Índico e Oceano Antártico. Estão apresentados 29 haplótipos com suas respectivas frequências. H: haplótipos; F: frequência

H	16	55	78	87	139	201	223	234	253	258	272	292	294	300	315	347	360	381	384	395	F
1	A	T	C	T	A	G	C	T	T	T	C	A	T	T	A	C	C	T	T	C	59
2	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	55
3	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	2
4	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	2
5	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	15
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	2
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	T	-	-	-	9
8	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	3
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	14
10	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	1
11	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	T	-	C	-	-	-	-	-	-	-	1
12	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	1
13	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
14	-	-	-	-	-	-	T	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	6
15	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	4
16	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	2

17	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	T	1
18	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	G	C	-	-	-	T	-	-	-	2
19	-	-	T	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	8
20	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	3
21	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
22	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	-	-	T	-	-	-	1
23	G	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	1
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	1
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	3
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	-	-	-	T	-	-	-	2
28	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	1
29	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	2