UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL

Estruturação genética de *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) no Oceano Atlântico

MYLLA CARLA CESCON FREIRE

São Mateus
Abril de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL

ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *STENELLA COERULEOALBA* (MEYEN, 1833) NO OCEANO ATLÂNTICO

MYLLA CARLA CESCON FREIRE

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Paula Cazerta Farro da Rosa

São Mateus
Abril de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

F866e

Freire, Mylla Carla Cescon, 1993-
Estruturação genética de Stenella coeruleoalba (Meyen, 1833) no Oceano Atlântico / Mylla Carla Cescon Freire. – 2017.
56 f. : il.

Orientador: Ana Paula Cazerta Farro da Rosa.
Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Citocromo b. 2. Diversidade biológica. 3. DNA. 4. Golfinho. 5. Delphininae. I. Rosa, Ana Paula Cazerta Farro da. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. III. Título.

CDU: 502

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por ter me sustentado, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente e nunca desistir.

À minha família que sempre me incentivou, me apoiou nas minhas escolhas e soube compreender a minha ausência durante vários feriados prolongados e datas comemorativas. Mãe, a minha vitória é reflexo da sua dedicação e preocupação em me dar sempre o melhor. Obrigada por tudo que fez por mim, sem você eu não teria chegado até aqui! Agradeço também a minha irmã, por toda a paciência e por torcer sempre por mim. Obrigada por terem feito do meu sonho, o nosso sonho! Amo vocês!

Ao meu namorado que mesmo quando distante sempre se mostrou presente na minha vida, por compreender os meus estresses, sempre procurando me acalmar e me aconselhar nos momentos difíceis. Obrigada pelo apoio, pela amizade, companheirismo, paciência, alegria e amor que permitiram com que este trabalho fosse concretizado.

À minha orientadora, Ana Paula Cazerta Farro, pela paciência, por todo o aprendizado, pelo incentivo, pelas experiências enriquecedoras, pela amizade e principalmente por todo o crescimento pessoal e profissional que tive durantes estes anos.

À Drienne Messa, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência, incentivo, preocupação, pela amizade e por nunca ter medido esforços para me ajudar. Dri, você foi essencial para a conclusão deste trabalho! Muuuuito obrigada por tudo!!!

Aos melhores amigos que a Biologia poderia me dar, Carol, Patrick, Gean e Láiza. Muito obrigada por todo companheirismo, pelos conselhos, pelos desabafos coletivos, pela amizade e por mesmo distante estarem sempre tão presentes.

As minhas amigas, Lorrana, Ana Paula, Letícia Calvi, Katriny, Gleici e Morgana. Obrigada pela paciência (principalmente nos últimos meses rs), pela parceria, amizade, pelas risadas, pelos conselhos, pelas ajudar e por sempre acreditar no meu potencial.

As meninas do laboratório de genética, Dri, Kamila, Nálita, Gabrielly e Dahiani. Obrigada pelas conversas de corredor, pela ajuda com as análises, pela companhia nos momentos de “boia-fria” e por tentarem sempre me manter calma nos momentos de “desespero” rs.

Ao GECON, em especial a Cecília Kierulff, por todas as conversas, sugestões, críticas construtivas e por colaborarem para a realização deste trabalho.

Ao Colégio Porta do Sol, em especial aos professores do Fundamental II e a equipe gestora. Obrigada por toda a compreensão, paciência, carinho e por não medir esforços para que esta etapa fosse concluída. Vocês são FERAS!!!

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao CEUNES e ao programa de pós-graduação em Biodiversidade Tropical pela oportunidade. Obrigada a todos os professores desta instituição que colaboraram para a minha formação.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização e a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

Sumário

1. Resumo **3**

2. Abstract **4**

3. Introdução **5**

4. Objetivos **12**

5. Material e Métodos **12**

5.1 Extração e quantificação de DNA **14**

5.2 Amplificação por PCR **15**

5.3 Purificação e sequenciamento **16**

5.4 Alinhamento e edição das sequências **17**

5.5 Análises de diversidade e estruturação genética **17**

6. Resultados **19**

6.1 Amplificação e sequenciamento **19**

6.2 Identificação molecular das amostras utilizadas neste estudo **19**

6.3 Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* no litoral brasileiro **20**

6.4 Região controle do mtDNA (D-loop) **20**

6.5 Região do citocromo b (Cit-b) **22**

6.6 Concatenado entre D-loop e Cit-b **24**

6.7 Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico (D-loop) **27**

6.8 Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* em quatro unidades amostrais do Oceano Atlântico (D-loop) **29**

6.9 Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico (Cit-b) **31**

7. Discussão **33**

7.1 Amplificação e sequenciamento **33**

7.2 *Stenella coeruleoalba* no litoral brasileiro **34**

7.3 *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico Norte e Sul **35**

7.4 *Stenella coeruleoalba* em quatro unidades amostrais do Oceano Atlântico (D-loop) .. **36**

8. Conclusão **39**

9. Referências **40**

10. Anexos **49**

Lista de tabelas

Tabela 1: Amostras de *Stenella coeruleoalba* do litoral brasileiro com seus respectivos sexos (determinados na necropsia) e localização de encalhe..... **13**

Tabela 2: Testes de estruturação realizados, bem como o número de sequências que os compõe, o local de coleta das amostras e as regiões do mtDNA avaliadas, D-loop, Cit-b e um concatenado entre estas duas regiões..... **17**

Tabela 3: Diversidade genética nucleotídica (π) e haplotípica (h), número de indivíduos analisados (N) e os índices de neutralidade seletiva: D de Tajima e FS de Fu ($P<0,02$), para os marcadores mitocondriais D-loop (470 bp), Cit-b (570 bp) e para o concatenado (1075 bp) em unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* do litoral brasileiro **26**

Tabela 4: Diversidade genética nucleotídica (π) e haplotípica (h), número de indivíduos analisados (N) e os índices de neutralidade seletiva: D de Tajima e FS de Fu ($P<0,02$), para os marcadores mitocondriais D-loop (470 bp) e Cit-b (570 bp) em unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico **28**

Tabela 5: Análise de divergência genética (FST) ($P<0,05$) das quatro unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico (Brasil= BR, oeste do Oceano Atlântico Norte= OAN, Mediterrâneo 1= MED1 e Mediterrâneo 2= MED2), com base no marcador mitocondrial D-loop..... **30**

Tabela 6: Análise de divergência genética ($P<0,05$) das quatro unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico (Brasil= BR, oeste do Oceano Atlântico Norte= OAN, Mediterrâneo 1= MED1 e Mediterrâneo 2= MED2), com base no marcador mitocondrial D-loop..... **31**

Lista de figuras

Figura 1: *Stenella coeruleoalba* (golfinho-listrado)**.....6**

Figura 2: Distribuição geográfica dos golfinhos-listrados (IUCN, 2017)**.....6**

Figura 3: Localidades do Oceano Atlântico onde foram obtidas as amostras de *Stenella coeruleoalba*. As cores representam as diferentes unidades amostrais avaliadas**.....14**

Figura 4: Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Brasil para a região D-loop **.....21**

Figura 5: Distribuição *Mismatch* (multimodal) para a região do mtDNA D-loop de *Stenella coeruleoalba* no litoral do Brasil. O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto o y mostra a frequência das diferenças. Colunas indicam valores observados e linhas os valores simulados**.....22**

Figura 6: Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Brasil para a região Cit-b **.....23**

Figura 7: Distribuição *Mismatch* (multimodal) para a região do mtDNA Cit-b de *Stenella coeruleoalba* no litoral do Brasil. O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto o y mostra a frequência das diferenças **.....24**

Figura 8: Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Brasil. Regiões mitocondriais D-loop e Cit-b concatenadas**.....24**

Figura 9: Distribuição *Mismatch* (multimodal) para as regiões do mtDNA D-loop e Cit-b concatenadas de *Stenella coeruleoalba* no litoral do Brasil. O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto o y mostra a frequência das diferenças **...25**

Figura 10: Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico Norte e Sul para a região controle do mtDNA (D-loop)**.....27**

Figura 11: Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* em quatro unidades amostrais do Oceano Atlântico para a região controle do mtDNA (D-loop)**.....29**

Figura 12: Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico Norte e Sul para a região do citocromo b (Cit-b)**.....32**

RESUMO

O *Stenella coeruleoalba* é um pequeno cetáceo pelágico da família Delphininae que apresenta uma ampla distribuição e pode ser encontrado em águas tropicais e temperadas dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, bem como em mares adjacentes, como o Mar Mediterrâneo. O presente estudo teve por objetivo analisar a região do citocromo b (Cit-b) e a região controle (D-loop) do DNA mitocondrial de indivíduos do Nordeste e do Sul do Brasil (Oceano Atlântico Sul), além de compará-las com sequências de golfinhos-listrados provenientes do Oceano Atlântico Norte, e com isso avaliar os índices de diversidade e a presença ou a ausência de estruturação genética entre as diferentes localidades. Os *S. coeruleoalba* do Brasil apresentaram uma alta diversidade genética para ambos os marcadores mitocondriais analisados (D-loop: h= 0,984; π= 0,294; Cit-b: h= 0,848; π= 0,249) e considerando o marcador Cit-b constituem duas populações (FST= 0,180; P= 0,045). Uma diferenciação significativa entre as unidades amostrais de *S. coeruleoalba* do Atlântico Norte e do Atlântico Sul foi verificada a partir dos dois marcadores mitocondriais avaliados (D-loop: FST= 0,034/ P= 0,009; Cit-b: FST= 0,130/ P= 0,026). Ademais, com a região D-loop, foi possível evidenciar estruturação genética entre dois grupos de golfinhos-listrados do Mar Mediterrâneo (FST= 0,0913/ P= 0,000). Não foi possível identificar estruturação entre os indivíduos do oeste do Oceano Atlântico Norte com as unidades amostrais do Brasil, mesmo estes não apresentando compartilhamento de haplótipos. Tal fato sugere que estas unidades possam ter surgido de linhagens próximas geneticamente e ainda fazem parte de uma mesma população. Até então, nenhum estudo genético populacional com a espécie *S. coeruleoalba* havia sido realizado no Oceano Atlântico Sul. Entender como os golfinhos-listrados encontram-se estruturados é de suma importância para compreender a genética destes indivíduos e assim definir estratégias de conservação adequadas para cada população identificada.

Palavras-chave: Citocromo b, Diversidade genética, D-loop, Delphininae, golfinho-listrado.

ABSTRACT

The *Stenella coeruleoalba* is a small pelagic cetacean from the Delphininae family that is widely distributed and can be found in tropical and temperate waters of the Atlantic, Pacific and Indian Oceans, as well as in adjacent seas, such as the Mediterranean Sea. The present study aimed to analyze the cytochrome b (Cit-b) region and the control region (D-loop) of the mitochondrial DNA of individuals from the Northeast and South of Brazil (South Atlantic Ocean), as well as comparing them with Sequences of striped dolphins from the North Atlantic Ocean, and with that to evaluate the diversity indexes and the presence or absence of genetic structuring between the different localities. The *S. coeruleoalba* of Brazil presented a high genetic diversity for both mitochondrial markers analyzed (D-loop: h = 0.984, π = 0.294, Cit-b: h = 0.848, π = 0.249) Two populations (FST = 0.180, P = 0.045). A significant difference between the sample units of *S. coeruleoalba* of the North Atlantic and South Atlantic was verified from the two mitochondrial markers evaluated (D-loop: FST = 0.034 / P = 0.009; Cit-b: FST = 0.130 / P = 0.026). In addition, with the D-loop region, it was possible to evidence genetic structure between two groups of striped dolphins of the Mediterranean Sea (FST = 0.0913 / P = 0.000). It was not found structuring between the individuals of the western North Atlantic Ocean with the sample units of Brazil, even though these did not present haplotype sharing. This fact suggests that these units may have arisen from genetically close lineages and are still part of the same population. Until then, no population genetic study with the *S. coeruleoalba* species had been carried out in the South Atlantic Ocean. Understanding how the striped dolphins are structured is of paramount importance in order to understand the genetics of these individuals and thus to define adequate conservation strategies for each species.

Key words: Cytochrome b, Genetic diversity, D-loop, Delphininae, striped dolphin.

INTRODUÇÃO

Os cetáceos encontram-se subdivididos em dois grupos dentro da Ordem Cetartiodactyla: Mysticeti e Odontoceti. Os misticetos possuem como representantes o grupo das baleias e são caracterizados por apresentarem estruturas denominadas barbatanas, que são responsáveis por filtrar o alimento encontrado na água. Esse grupo possui quatro famílias e 14 espécies, sendo todas com distribuição exclusivamente marinha.

Os odontocetos são cetáceos caracterizados por possuírem dentes, uma única dentição permanente que, em geral, eclode durante o período de amamentação. Esses compõem a maior diversidade de espécies dentre os cetáceos, dividindo-se em 10 famílias e 74 espécies (Lodi e Borobia, 2013).

Dentre os odontocetos, o gênero *Stenella* (Gray, 1866), família Delphininae, apresenta cinco espécies de golfinhos encontrados mundialmente em áreas tropicais, subtropicais e em oceanos temperados. Duas espécies deste gênero são endêmicas do Oceano Atlântico, do Golfo do México e do Caribe: o *Stenella frontalis* (Cuvier, 1829), conhecido popularmente como o golfinho-pintado-do-Atlântico e o *Stenella clymene* (Gray, 1850), conhecido como golfinho-de-Clymene. As outras três espécies do gênero *Stenella* são o *S. attenuata* (Gray, 1846) golfinho-*pintado*-Pantropical, o *S. longirostris* (Gray, 1828) golfinho-rotador e o *S. coeruleoalba* (Meyen, 1833), conhecido popularmente como golfinho-listrado (Moreno *et al.*, 2005).

Stenella coeruleoalba é um pequeno cetáceo pelágico (Figura 1) que possui o plano corporal semelhante à maioria dos representantes oceânicos de pequeno porte da sua família: corpo fusiforme com focinho longo e bem demarcado, longas barbatanas dorsais e cauda com aletas finas (Perrin *et al.*, 1999). No entanto, os *S. coerulealba* possuem um padrão de coloração característico, que consiste em manto dorsal negro, lateral cinza e ventre branco, além de duas faixas negras que seguem perpendiculares ao corpo, uma do olho ao ânus e outra do olho às nadadeiras peitorais (Maia-Nogueira *et al.*, 2001).

Figura 1. *Stenella coeruleoalba* (golfinho-listrado).

Os indivíduos adultos desta espécie podem medir até 2,6 metros de comprimento, onde os machos são ligeiramente maiores que as fêmeas. Seu peso máximo é de cerca de 160 kg. Estes animais geralmente são encontrados em grupos de 25 a 100 indivíduos, mas já foram vistos em grupos maiores de centenas e até mesmo milhares. Os golfinhos-listrados se alimentam de uma dieta diversificada, composta por várias espécies de peixes e de cefalópodes presentes em toda a coluna de água (Jeferson *et al.*, 1994).

Os *S. coeruleoalba* estão amplamente distribuídos e podem ser encontrados em águas tropicais e temperadas dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, bem como em mares adjacentes, incluindo o Mar Mediterrâneo (IUCN, 2017) (Figura 2).

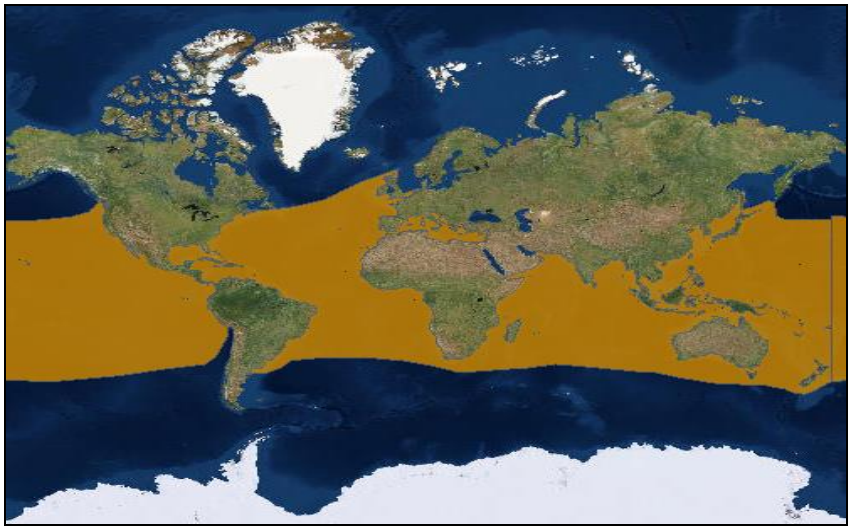

Figura 2. Distribuição geográfica dos golfinhos-listrados em amarelo (IUCN, 2017).

Os cetáceos, de modo geral, enfrentam um número crescente de ameaças antrópicas. Milhares de odontocetos morrem todos os anos devido às capturas acidentais e intencionais em todo o mundo. Além disso, esses sofrem com outras ameaças, como a degradação do hábitat, condições climáticas desfavoráveis, a poluição dos ambientes aquáticos e o aumento do tráfego de embarcações. Como agravante, o conhecimento sobre este grupo ainda é limitado. Esta falta de informação ofusca, muitas vezes, o real estado de conservação dos pequenos cetáceos, sendo responsável pelo declínio de inúmeras espécies (ICMBio, 2011). De acordo com o Plano Nacional para a Conservação de Pequenos Cetáceos, os golfinhos-listrados apresentam sérias ameaças, como as capturas intencionais devido à caça, a captura incidental em redes de pesca, a sobrepesca dos recursos comuns e a poluição química (ICMBio, 2011).

Mundialmente, a espécie *S. coeruleoalba* está categorizada segundo os critérios da IUCN (2017) como pouco preocupante, pois sua população estimada é de mais de dois milhões de indivíduos em todo o mundo. Contudo, pouco se sabe sobre a estruturação populacional desta espécie. Na Europa, os golfinhos-listrados possuem um status variado. Os indivíduos que habitam o Mar Mediterrâneo estão categorizados como vulneráveis, pois foram, e estão atualmente, sujeitos a uma série de ameaças, que cumulativamente reduziram seu tamanho populacional (IUCN, 2017). Dentre estas ameaças pode-se citar uma infecção epizoótica causada por um morbilivírus (DMV), que em 1990 matou milhares de golfinhos-listrados no Mar Mediterrâneo (Domingo *et al.*, 1992; Domingo *et al.*, 1995; González *et al.*, 2002), a presença de poluentes organoclorados com potencial para efeitos imunossupressores (Aguilar *et al.*, 1994) e elevadas concentrações de compostos químicos diagnosticados nos tecidos destes indivíduos (Andre *et al.*, 1991; Marsili *et al.*, 1996; Monaci *et al.*, 1998; Cardellicchio *et al.*, 2002).

Os golfinhos-listrados do Atlântico Norte Oriental, costa do continente europeu, não mostram evidência de declínio populacional, mesmo com os problemas ocorridos no Mediterrâneo. No entanto, pouco se sabe sobre este grupo e o tamanho desta população é desconhecido, o que faz com que a espécie no Atlântico Norte Oriental seja mantida na categoria "DD" (deficiente de dados) (IUCN, 2017).

Alguns fatores dificultam os estudos com cetáceos ao redor do mundo. A dificuldade de visualização desses animais e de coleta de material para pesquisa são os principais fatores limitantes. Devido às adversidades para o acesso ao animal *in vivo*, estudos genéticos com carcaças têm sido realizados a fim de ampliar o conhecimento dessas espécies.

Desde as décadas de 70-80, a molécula do DNA mitocondrial (mtDNA) passou a ser muito utilizada em estudos de estrutura populacional (Baker *et al.,* 1998; Bérubé *et al.,* 1998; Natoli *et al.,* 2004), relações filogenéticas (Dalebout *et al.,* 2002; Balard & Rand, 2005) e quanto ao entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos (Wilson *et al.,* 1985; Moritz *et al.,* 1987; Wooding *et al.,* 1997, Jackson *et al.,* 2009; Archer *et al.,* 2013). Este interesse surgiu principalmente pelas características apresentadas pelo genoma mitocondrial, tais 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).

Em estudos populacionais e evolutivos, o emprego do mtDNA ocorre por este apresentar alterações no tamanho total da molécula devido a inserções e deleções, possuir uma alta taxa de substituições de base e devido a alta frequência de translocações de genes codificadores de tRNA, o que ocasiona alterações na ordem gênica entre organismos filogeneticamente relacionados (Arias *et al.,* 2003) e torna os marcadores mitocondriais mais sensíveis para detectar subdivisões de populações do que os marcadores nucleares.

Vários estudos populacionais já foram desenvolvidos para cetáceos utilizando os marcadores mitocondriais D-loop e Cit-b. Dentre os estudos com o marcador D-loop pode-se citar com os gêneros *Delphinus* e *Tursiops* (Natoli *et al.,* 2005; Natoli *et al.,* 2008) e com as espécies *Stenella longirostris* (Andrews *et al.,* 2006; Andrews *et al.,* 2010; Viricel *et al.,* 2016), *Stenella attenuata* (Courbis *et al.,* 2014), *Pontoporia blainvillei* (Gariboldi *et al.,* 2016) e *Delphinus delphis* (Zanardo *et al.,* 2016).

Quanto ao marcador Cit-b citam-se os trabalhos com Odontocetos e Misticetos (Arnason *et al.,* 1996); baleias (May-Collad *et al.,* 2005; Sholl *et al.,* 2013), *Stenella frontalis* (Caballero *et al.,* 2008), *Delphinus delphis* (Amaral *et al.,* 2012) e *Stenella clymene* (Amaral *et al.,* 2014).

Andrews *et al.* 2006, a fim de obter uma visão sobre a diversidade genética e a estrutura da população de *S. longirostris* ao longo do arquipélago havaiano, realizaram um estudo de genética populacional a partir de análises da região controle do mtDNA (D-loop). Foi possível identificar uma alta diversidade genética e uma estruturação significativa entre os indivíduos de golfinho-rotador, onde os maiores índices de diversidade genética foram encontrados em Ilha Grande ($h= 0,716$; $\pi= 0,0082$) e os menores índices na Ilha Kure ($h= 0,399$; $\pi= 0,0025$).

Para o gênero *Stenella*, Oremus *et al.* 2007, a partir de análises do mtDNA e nuclear apresentaram uma abordagem genética e demográfica para descrever o isolamento e o

intercâmbio dos golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris longirostris*) entre as comunidades da Polinésia Francesa. As análises genéticas indicaram a presença de um fluxo gênico restrito entre comunidades vizinhas e um elevado índice de diversidade genética (h= 0,90; π= 1,48), o que sugere uma estrutura de metapopulação, baseada em numerosas comunidades insulares conectadas através do fluxo genético masculino e feminino.

Oremus *et al.* 2008 avaliaram a estrutura populacional, a diversidade genética e o sistema social de quatro espécies de cetáceos: o golfinho-rotador (*S. longirostris*), a baleia-piloto de barbatana longa (*Globicephala melas*), a baleia-piloto de barbatana curta (*Globicephala macrorhynchus*) e o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*). Foram utilizados marcadores mitocondriais e nucleares, além de dados de observação, como foto-identificação e encalhes em massa, em indivíduos da Polinésia Francesa. Com relação aos golfinhos-rotadores, foi possível identificar a presença de comunidades distintas com fluxo gênico restrito para ambos os marcadores (mtDNA: FST = 0,143; P<0,001; microssatélite: FST = 0,029; P<0,001), além de altos níveis de diversidade genética (h= 0,92; π= 1,59). Não houve evidência de efeito gargalo recente o que sugere a presença de uma metapopulação conectada através de um baixo fluxo gênico masculino e feminino.

Ao identificar diferentes comportamentos sociais entre indivíduos de golfinhos-rotadores (*S. longirostris*) em duas regiões do arquipélago havaiano, Andrews *et al.* 2010, a partir de análises de mtDNA e de 10 loci microssatélites, investigaram a influência destas diferenças ambientais e sociais na estrutura genética da população. Foi possível identificar separações populacionais entre a maioria das ilhas avaliadas, sendo que as populações com estrutura social mais estável possuem maior fluxo gênico e as populações com grupos dinâmicos e estrutura social fluida tem o menor fluxo genético. A partir desta análise, sugere-se que o fluxo gênico, a dispersão e a estrutura social são influenciados pela disponibilidade de habitat e recursos em cada ilha, além disso, a estrutura genética e social são características flexíveis que podem variar entre populações intimamente relacionadas. Os índices de diversidade variaram para as localidades analisadas, o maior índice de diversidade haplotípica encontrado foi de 0,975 enquanto o menor foi de 0,200. Quanto à diversidade nucleotídica o maior índice encontrado foi de π= 0,0197 e o menor foi 0,0014.

Quanto ao litoral brasileiro, estudos de diversidade genética e estruturação em indivíduos de *S. longirostris* utilizando marcadores mitocondriais e microssatélites já foram realizados. Volpi (2012), a partir de análises das regiões mitocondriais D-loop e COI, avaliou a diversidade genética de quatro unidades amostrais ao longo do litoral brasileiro. Foi possível identificar uma alta diversidade, a presença de estruturação genética entre estes

grupos e o compartilhamento de haplótipos com golfinhos de outras localidades, como dos oceanos Índico e Pacífico, além de animais da porção norte do Atlântico.

Faria (2013), a partir de análises de marcadores microssatélites analisou os índices de diversidade em indivíduos de *S. longirostris* em nove unidades amostrais do litoral brasileiro, sendo elas: Ceará, Espírito Santo, Fernando de Noronha, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e São Paulo. Foi possível evidenciar um alto polimorfismo em todos os sete loci microssatélites analisados.

Caballero *et al.* 2013 avaliaram a estrutura populacional e a diversidade genética de *Stenella frontalis* do Caribe e do Sudeste do Brasil a partir de análises de sequências da região D-loop do mtDNA e do primeiro íntron do gene α-lactalbumina. A partir de comparações com sequências de *S. frontalis* previamente descritas, determinou-se que há um elevado número de haplótipos partilhados entre as populações em questão, alta diversidade genética para as amostras do Sudeste do Brasil (h= 1,0; π= 0,027) e do Caribe (h= 0,80; π= 0,009) e diferenciação significativa entre as unidades populacionais no nível do FST (FST= 0.097; P= 0.038). Estes resultados sugerem a presença de duas populações separadas nas águas ao redor da costa atlântica da América do Sul.

Nara (2015) analisou as regiões mitocondriais Cit-b, COI e D-loop de indivíduos de *Stenella clym*ene do Nordeste do Brasil e as comparou com sequências de *S. clymene* e da subfamília Dephininae obtidas de estudos prévios. Os indivíduos do Brasil apresentaram uma alta diversidade genética para ambos os marcadores avaliados, D-loop (h= 1,0; π= 0,13), COI (h= 0,98; π= 0,026) e Cit-b (h= 0,98; π= 0,007) e provavelmente constituem uma mesma unidade populacional. Também foi encontrada uma diferenciação significativa e altos valores no nível de FST entre as unidades populacionais deste golfinho no Atlântico Norte e no Atlântico Sul.

Alguns estudos genéticos com indivíduos de *S. coeruleoalba* foram realizados a fim de descobrir mais sobre esta espécie e consequentemente colaborar com a sua conservação. Dentre esses estudos podemos citar o de Garcia-Martinez *et al.* 1999, que a partir de análises de restrição do mtDNA avaliaram 98 indivíduos de *S. coeruleoalba* de diferentes países Europeus. Um total de 27 haplótipos foi gerado, no entanto, nenhum haplótipo foi compartilhado entre o Mar Mediterrâneo e outras localidades do leste do Oceano Atlântico Norte, o que sugere a existência de duas populações diferentes com um fluxo gênico muito limitado através do Estreito de Gibraltar.

Gasparini *et al.* 2007, a partir de oito loci de DNA microssatélites investigaram os padrões hierárquicos de subdivisão e estrutura genética populacional de *S. coeruleoalba* dentro no Mar Tirreno, a fim de testar a hipótese de que os golfinhos adultos se associam em grupos de fina escala e que estas associações contribuem para a estrutura genética da população dentro do ambiente heterogêneo do Mar Mediterrâneo. Foi possível detectar estruturação genética entre os mares Adriático e Tirreno (FST = 0,0047; P= 0,008). Além disso, a avaliação de parentesco demonstrou maior parentesco médio para as fêmeas dentro do que entre os grupos. Os resultados sugeriram que, embora a estrutura social predominante seja a fusão e cisão para esta espécie no Mar Mediterrâneo, as associações de indivíduos aparentados em grupos sociais e filopatria criam estrutura genética dentro e entre as populações.

Galov *et al.* (2009) analisaram o fragmento da região de controle do mtDNA a fim de caracterizar geneticamente *S. coeruleoalba* encontrados mortos encalhados na parte croata do Mar Adriático. Os resultados revelaram alta variação genética, sete haplótipos únicos, elevada diversidade de haplótipos e baixa diversidade de nucleotídeos (h= 0,911; π= 0,006). Esta relação e a ausência de diferenciação genética entre os haplótipos da região D-loop de golfinhos-listrados encontrados encalhados na parte croata do Mar Adriático e no resto do Mediterrâneo refletem que o golfinho-listrado é uma espécie não residente na parte croata do Mar Adriático.

Até então, nenhum estudo genético com a espécie *S. coeruleoalba* foi realizado no Oceano Atlântico Sul. Entender como os golfinhos-listrados encontram-se estruturados é de suma importância para compreender a genética destes indivíduos e assim definir estratégias de conservação adequadas para cada população identificada.

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a diversidade e a estrutura genética de golfinhos-listrados (*Stenella coeruleoalba*) no Oceano Atlântico.

Objetivos específicos:

- Determinar a partir de marcadores mitocondriais, a frequência dos haplótipos, bem como outros índices de diversidade dos golfinhos-listrados do Brasil;

- Averiguar a existência de estruturação genética entre golfinhos-listrados amostrados em duas localidades do litoral brasileiro;

- Analisar ocorrência de compartilhamento de haplótipos e a existência de estruturação entre os golfinhos-listrados amostrados no litoral brasileiro e em outras regiões do Oceano Atlântico.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizadas 14 amostras de tecido muscular de *S. coeruleoalba* encontrados mortos em praias do Nordeste (PE e CE) e Sul do Brasil (RS) (Tabela 1; Figura 3). As amostras foram coletadas e cedidas pela Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), Centro de Mamíferos Aquáticos (CMA), Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS) e pelo Projeto Golfinho-Rotador (PGR).

Após o encalhe, as carcaças foram retiradas das praias e levadas para laboratório pelos órgãos competentes para a realização de necrópsia (quando possível devido ao estado de decomposição das carcaças). Durante o atendimento em praia e a necrópsia foram realizadas análises morfológicas para a identificação da espécie, além da tomada de medidas e outras informações básicas do animal. Após a necrópsia, uma amostra de tecido muscular destes animais (Tabela 1) foi conservada em álcool 70% e armazenada no freezer.

Para esse estudo foram utilizadas as informações de identificação da espécie, localidade e sexo dos animais (Tabela 1). Das 14 amostras de golfinho-listrado utilizadas, três eram de fêmeas, sete eram de machos e quatro não tiveram seu sexo definido.

Tabela 1. Amostras de *Stenella coeruleoalba* do litoral brasileiro com seus respectivos sexos (determinados na necrópsia) e a localização do encalhe.

Amostra	Sexo	Localidade
SCO01	Indefinido	Fernando de Noronha- PE
SCO02	Fêmea	Icapuí- CE
SCO03	Macho	Pinhal- RS
SCO04	Macho	Tramandaí- RS
SCO05	Indefinido	Arroio do Sal- RS
SCO06	Macho	Tramandaí- RS
SCO07	Fêmea	Tavares- RS
SCO08	Macho	Mostardas- RS
SCO09	Indefinido	Tramandaí- RS
SCO10	Macho	Palmares do Sul- RS
SCO11	Macho	Capão da Capão- RS
SCO12	Macho	Fernando de Noronha- PE
SCO13	Fêmea	Fernando de Noronha- PE
SCO14	Indefinido	Fernando de Noronha- PE

Além das amostras de encalhe foram utilizadas 100 sequências do GenBank (www.ncbi.nlm.nhi.gov/genbank), sendo 90 sequências da região D-loop e 10 do citocromo b (Anexo 1). Todas as amostras da região D-loop são provenientes de indivíduos coletados no Oceano Atlântico Norte, sendo 16 amostras do oeste do Oceano Atlântico Norte e 74 do Mar Mediterrâneo. Todas as 10 amostras do Cit-b são oriundas de indivíduos do Mar Mediterrâneo (Figura 3).

Figura 3. Localidades do Oceano Atlântico onde foram obtidas as amostras de *Stenella coeruleoalba*. As cores representam as diferentes unidades amostrais avaliadas.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), São Mateus, ES e o sequenciamento foi realizado no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES em Vitória, ES.

Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o protocolo de solução salina (Bruford *et al.*, 1992). Um pequeno pedaço de aproximadamente 1 cm de músculo foi picotado e colocado em um microtubo de 1,5 ml com solução de lise: 410 µL de Buffer de Extração*, 80 µL de SDS 10% e 10 µL de proteinase K (800 unidades/ml). Esta solução foi deixada no banho seco a 55 °C durante a noite toda. Passado este tempo, a solução foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml, no qual foram adicionados 180 µL de NaCl (5M). Após inverter esta solução 50 vezes para homogeneização, a solução foi centrifugada novamente a 13000 rpm por 5 minutos. Depois disso, transferiu-se o sobrenadante para um tubo de 1,5 ml contendo 1 ml de isopropanol gelado (60 M). Após esse processo homogeneizou-se a solução e a centrifugou por 7 min a 13000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 250 µL de etanol 80% e inverteu-se a solução por 50 vezes. Em seguida, centrifugou-se novamente na mesma

condição anterior. O sobrenadante foi descartado novamente, adicionou-se 250 µL de etanol 80% e a solução foi invertida e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Depois disso, o sobrenadante foi descartado. Todo o álcool foi removido colocando-se os tubos invertidos sobre um pedaço de papel e, em seguida, colocando-os em banho-maria a 55°C por aproximadamente 10 minutos. Por fim, o DNA foi ressuspendido com a adição de 20-50 µL de ddH_2O e armazenado na geladeira a 4°C até a quantificação no dia seguinte.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro utilizando-se 1 µL do DNA extraído. As amostras que apresentaram grande concentração de DNA foram diluídas para 20 ng/µL, a fim de evitar possíveis erros de amplificação devido ao excesso de material genético.

*O Buffer de extração utilizado no protocolo de extração salina apresenta a seguinte composição: 500 µL de Tris (1M, pH= 8), 1000 µL de NaCl (5M), 1000 µL de EDTA (0,5M, pH= 8) e 47500 µL de ddH20 estéril.

Amplificação por PCR

Para as reações de PCR as amostras foram diluídas para 20 ng/µL e armazenadas no freezer. Foi realizada a amplificação de três marcadores do mtDNA, a região (D-loop), a região do citocromo b (Cit-b) e a região do citocromo oxidase subunidade I (COI). As sequências provenientes das regiões mitocondriais D-loop e Cit-b foram utilizados para as análises de estruturação e diversidade genética, enquanto as sequências do marcador COI foram utilizadas apenas para a confirmação das espécies utilizadas neste estudo.

Para a amplificação da região controle do mtDNA (D-loop) utilizou-se o par de *primer* FA1 (5'-GGCTCTGTGAGGGATATAAAGACA-3' e 5'CAAACCACCCGAGCAACTAATCT-3') (Lee *et al.*, 1995). As reações apresentaram um volume final de 12,5 µl e foram compostas de 1- 10 ng de DNA, 7,95 µl de água ultrapura, 1,25 mM de tampão 10X (Invitrogen), 1,6 µM de $MgCl_2$, 0,2 µM de cada *primer*, 0,24 mM de dNTP e 0,02 u/µL de Taq polimerase (Invitrogen). No termociclador foram programados os seguintes passos: 5 min a 95ºC, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 48,5 °C, e 1 min a 68°C, e por fim 5 min a 65ºC.

O gene do citocromo b (Cit-b) foi amplificado usando os *primers* (L14724; 5’ TGACTTGAARAACCAYCG TTG 3’) e (5’ CCTTTTCCGGTTTACAAGAC 3’) (Leduc *et al.*, 1999). As reações de amplificação apresentaram volume final de 12,5µl com 1- 10 ng

de DNA, tampão de PCR 10× (Invitrogen), 1,52 mM de $MgCl_2$, 0,3 μM de cada primer, 0,04 mM de dNTP e 0,2 μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e o perfil da PCR foi de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 45s, 48°C por 45s e 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min.

Para realizar a amplificação do citocromo oxidase subunidade I (COI), foram utilizados os *primers*: COX1F 5´TGCCTACTCGGCCATTTTAC3´ e COX1R 5´TGAAACCCAGGAAGCCAATA3´ (Amaral *et al.,* 2007). As reações foram realizadas para um volume final de 12,5μl com 1- 10 ng de DNA, tampão de PCR 10× (Invitrogen), 1,52 mM de $MgCl_2$, 0,3 μM de cada primer, 0,04 mM de dNTP 0,2 μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e o perfil da PCR foi de 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 45s, 52°C por 45s e 72°C por 1 min com extensão final de 72°C por 8 min.

Depois de amplificados, os fragmentos foram corados com Gelred, visualizados em gel de agarose (1%) e foto-documentados sob UV em um transluminador (Loccus).

Purificação e sequenciamento

Após a amplificação dos fragmentos, as reações foram purificadas utilizando a enzima ExoSap-IT (USB Corporation), a fim de se eliminar inibidores potenciais do sequenciamento.

Para a reação de sequenciamento foi o utilizado o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*. O volume final da reação foi de 10 μL, contendo 4,0 μL de H2O, 3,7 μL de Buffer, 0,3 μL de Big dye, 1,0 μL do *primer forward* e 1,0 μL de produto. A reação de sequenciamento foi realizada sob as seguintes condições: 96º por 1min, 35 ciclos de 96°C por 15s, 50°C por 15s, 60°C por 4 minutos. Os produtos dessa reação foram precipitados com 1μL de EDTA 125 mM em cada amostra, os reagentes foram retirados da placa, restando apenas o fragmento a ser sequenciado. Após isso, pipetou-se 1μL de Acetato de Sódio 3M. Em seguida, adicionou-se 32 μL de etanol 95%, passou-se o microtubo no vortex gentilmente e deu-se um *spin down*. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 15 min no escuro e então foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. Imediatamente após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante, invertendo rapidamente na pia. Em seguida, pipetou-se 35μL de etanol 70% para cada amostra e passou-se no vortex gentilmente. Centrifugou-se a 13000 rpm por 15 min, posteriormente colocando no termociclador a 55°C até todo o etanol evaporar, os tubos foram secados. Inverteu-se a placa imediatamente após a centrifugação e deu-se um spin a 200 rpm por 1 minuto. Após a secagem das amostras, estas foram submetidas ao sequenciamento.

Alinhamento e edição das sequências

Todas as sequências geradas foram alinhadas e editadas no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Com o auxílio do BLAST, ferramenta deste programa, as sequências obtidas neste estudo foram comparadas com sequências previamente publicadas em um banco de dados online denominado GenBank (www.ncbi.nlm.nhi.gov/genbank). Ademais, outro banco de sequências foi utilizado para averiguar a espécie das amostras avaliadas, o DNA *Surveillance* (Ross *et al.*, 2003).

Análises de diversidade e estruturação genética

Após a identificação das amostras, as sequências foram agrupadas de seis diferentes formas para a realização de testes de estruturação genética (Tabela 2).

Tabela 2. Testes de estruturação realizados, bem como o número de sequências que os compõe, o local de coleta das amostras e as regiões do mtDNA avaliadas, D-loop, Cit-b e um concatenado entre estas duas regiões.

Testes	Número de sequências	Localidade	Região do mtDNA
1°	12	Brasil	D-loop
2°	12	Brasil	Cit-b
3°	12	Brasil	Concatenado
4°	68	Atlântico Norte (N= 56) e Atlântico Sul (N= 12)	D-loop
5°	68	Brasil (N= 12), oeste do Atlântico Norte (N= 07) e Mar Mediterrâneo (N= 49)	D-loop
6°	17	Atlântico Norte (N= 05) e Atlântico Sul (N= 12)	Cit-b

Para todos os seis testes de estruturação, o programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) foi utilizado para o cálculo dos índices de diversidade genética, haplotípica (h), nucleotídica (π), além do cálculo do número de haplótipos, frequências absolutas e relativas. Este programa também foi utilizado para realizar o cálculo de Distribuição *Mismatch* e índices de neutralidade (Fs de Fu e D de Tajima). A Distribuição *Mismatch* investiga a história demográfica das populações e tende a apresentar distribuição unimodal em populações que passaram por uma expansão populacional recente, enquanto que uma

distribuição multimodal tende a ser característica de populações em equilíbrio demográfico em longo prazo (Rogers & Harpending, 1992).

Os testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (Fs) indicam se a população está ou não em expansão. Juntos, esses testes analisam a influência das mutações sobre a história de vida das populações. No teste de Tajima, os grandes valores absolutos de D significam um desvio da neutralidade (Tajima, 1989). Este teste compara dois estimadores do parâmetro populacional, um com base no número de sítios polimórficos na amostra, outro com base no número médio de diferenças entre pares de haplótipos (Tajima, 1989). Valores negativos de D sugerem expansão populacional, enquanto os positivos podem sugerir a existência de um gargalo populacional recente (Tajima, 1989).

O Fs descrito por Fu (1997) utiliza a probabilidade de observar alelos em uma amostra de um determinado tamanho, condicionada ao número observado médio das diferenças emparelhadas (Fu, 1997). Este teste tem se mostrado especialmente sensível à partida do equilíbrio da população, como no caso de uma expansão da população. Valores negativos de Fs de Fu sugerem seleção direcional (favorecimento de um único fenótipo) recente, seleção de alelos ligeiramente deletérios ou expansão populacional (Fu, 1997). Valores de P são considerados significativos quando estão abaixo de 0,02 (Fu, 1997).

O programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2010) foi utilizado para calcular o número de haplótipos, número de mutações e sítios polimórficos e também para gerar os arquivos de entrada para os programas Arlequin e Network.

O programa Network (Bandeld *et al.*, 1999) foi utilizado para construir a rede haplotípica, com cálculos de *Median-Joining*. O programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) também foi utilizado para testar hipóteses de estruturação populacional segundo análise de variação molecular (AMOVA) e teste de estruturação (FST). O valor de FST pode variar de 0 a 1 e mostra a diferenciação entre as populações. Quanto mais baixo o valor de FST, menor a diferenciação. O valor de P mostra a significância de cada FST encontrado. Valores abaixo de 0,05, nível de significância da análise, mostram estruturação, enquanto valores acima de 0,05 são considerados não significativos.

RESULTADOS

1. Amplificação e sequenciamento:

Foi possível amplificar um fragmento da região D-loop em torno de 600 bp dos 14 indivíduos analisados (Figura 4). Após a edição e alinhamento das sequências, o comprimento do fragmento foi alterado para 470 pares de base.

Com relação à região mitocondrial Cit-b, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 700 bp em todas as 14 amostras de *S. coeruleoalba* disponíveis. Após o alinhamento e edição, o tamanho do fragmento foi alterado para 570 bp. Enquanto o concatenado realizado com as regiões mitocondriais D-loop e Cit-b gerou uma sequência de 1040 pares de base.

2. Identificação molecular das amostras utilizadas neste estudo

- **Região Controle do mtDNA (D-loop):**

Após a comparação das 14 sequências do litoral brasileiro com as sequências do GenBank e do DNA *Surveillance,* 10 indivíduos tiveram sua espécie confirmada como *S. coeruleoalba*. Com relação ao primeiro banco de dados, os indivíduos SCO04 e SCO06 apresentaram homologia com a espécie *Pontoporia blainvillei* e os indivíduos SCO12 e SCO13 com a espécie *Sotalia guianensis.* A fim de sanar qualquer dúvida a respeito da identificação da espécie destes indivíduos, a região COI foi amplificada, sequenciada e a identidade dos indivíduos SCO12 e SCO13 foi confirmada como *S. coeruleoalba.* Não foi possível determinar a qual espécie os indivíduos SCO04 e SCO06 pertencem, com isso eles foram retirados do trabalho, a fim de evitar possíveis erros nas futuras análises. Por fim, 12 sequências de indivíduos do Brasil foram mantidas neste trabalho (Tabela 2).

Todas as 90 sequências da região D-loop de *S. coeruleoalba,* que foram baixadas do GenBank também foram avaliadas no DNA *Surveillance*. Dessas, 56 tiveram homologia com as sequências de golfinho-listrado disponíveis nos dois bancos de dados. Dentre as 56 sequências resultantes, sete são de indivíduos do oeste do Oceano Atlântico Norte e 49 do Mar Mediterrâneo.

Todas as sequências foram alinhadas e editadas no programa MEGA 6.06. A união entre as sequências de D-loop do litoral do Brasil e as sequências baixadas resultou em um arquivo com 68 sequências de *S. coeruleoalba*.

- **Região do citocromo b:**

No GenBank, 10 das 14 sequências analisadas com o marcador mitocondrial Cit-b apresentaram homologia com os indivíduos do golfinho-listrado. Contudo, as amostras SCO04, SCO06, SCO12 e SCO13 demonstraram homologia com o golfinho-de-Clymene, seguido de homologia com o golfinho-listrado.

Os indivíduos SCO04 e SCO06 quando testados no DNA *Surveillance* apresentaram baixa distância genética dos golfinhos-de-Clymene (0,002). Por estes indivíduos terem sido identificados nos dois bancos de dados como golfinho-de-Clymene e pelo fato da amplificação da região COI desses não permitir a sua identificação, estas sequências foram retiradas do trabalho. As sequências dos golfinhos SCO12 e SCO13 ao serem testadas no DNA *Surveillance* tiveram sua identificação confirmada para golfinhos-listrados. Além disso, ao amplificar a região COI, foi possível confirmar que os indivíduos SCO12 e SCO13 são da espécie *S. coeruleoalba*. Com isso, 12 sequências foram mantidas nas análises posteriores.

Um total de 10 amostras da região Cit-b foram baixadas do GenBank e analisadas no DNA *Surveillance*. Dessas, cinco apresentaram pouca ou nenhuma distância genética com os indivíduos de *S. coeruleoalba*. As outras cinco sequências baixadas demonstraram ser mais próximas geneticamente de *S. clymene*, por esse motivo foram retiradas do trabalho. Com isso, o número amostral das sequências baixadas foi alterado para cinco indivíduos, todas do Mar Mediterrâneo (Oceano Atlântico Norte). A união entre as sequências da região mitocondrial do Cit-b do litoral do Brasil e as sequências baixadas do GenBank resultou em um arquivo com 17 sequências de *S. coeruleoalba.*

3. Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* no litoral brasileiro

- **Região controle do mtDNA (D-loop):**

A partir das 12 amostras de *S. coeruleoalba* do litoral do Brasil, foi observado um total de 11 haplótipos. Desses, apenas o haplótipo Dlp1 foi encontrado em dois indivíduos da região Nordeste. Para esta região mitocondrial, o haplótipo Dlp11 apresentou maior distância em relação aos demais (Figura 4). A partir da rede de haplótipos foi possível observar que a maioria dos haplótipos correspondentes aos indivíduos da região Nordeste ficaram distantes dos haplótipos do Sul, com exceção do Dlp2. Além disso, é possível verificar a presença de um haplótipo da região Sul (Dlp3) agrupado com os do Nordeste.

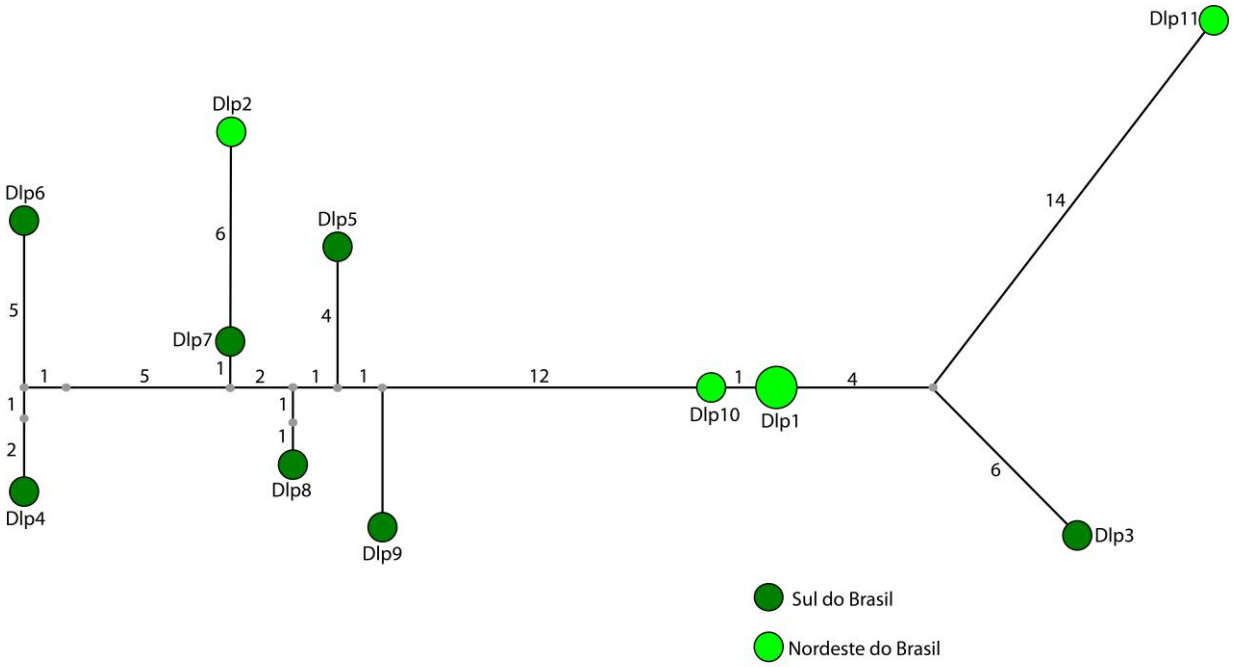

Figura 4. Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do litoral brasileiro para a região D-loop.

As amostras do litoral brasileiro, ao serem avaliadas como uma única unidade amostral, apresentaram altos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica (h= 0,984; π= 0,294, respectivamente). Os valores de neutralidade seletiva não evidenciaram expansão populacional, pois não foram significativos (P<0,02), D de Tajima: -0,509 (P= 0,265) e Fs de FU: -1,823 (P= 0,155).

Quando as amostras do litoral do Brasil foram analisadas como Nordeste e Sul separadamente, a região Sul apresentou maiores índices de diversidade haplotípica quando comparada com o Nordeste: Sul (h= 1,00; π= 0,259) e Nordeste (h= 0,900; π= 0,255), já a diversidade nucleotídica apresentou resultados semelhantes.

Os índices de neutralidade não foram significativos, logo não indicaram expansão populacional. O Nordeste do Brasil teve como D de Tajima: -0,762 (P= 0,270) e Fs de FU: -1,971 (P= 0,770) e na região Sul do Brasil o D de Tajima foi: -0,630 (P= 0,261) e Fs de FU: -1,150 (P= 0,129) (Tabela 6).

Na análise molecular de variância (AMOVA) e na análise de divergência genética (FST) entre os indivíduos do Brasil (considerando as regiões Nordeste e Sul como unidades amostrais) não foram encontrados resultados significativos: AMOVA (FST= 0,046/ P= 0,139) e FST (FST= 0,046/ P= 0,135). Logo, não foi evidenciada uma estruturação genética

entre os indivíduos de *S. coeruleoalba* do Brasil para o marcador D-loop. Além disso, na AMOVA foi evidenciado um percentual de variação de 4,65% entre as populações e 95,35% dentro das populações.

Os testes de Tajima e Fu não demonstram expansão para esta espécie de golfinhos ao analisar a região D-loop. O gráfico de distribuição *Mismatch* corrobora isso, não exibindo uma curva unimodal, a qual indicaria uma expansão populacional recente (Figura 5). Uma curva multimodal foi evidenciada no gráfico, o que indica que a população está em equilíbrio demográfico em longo prazo (Rogers & Harpending, 1992).

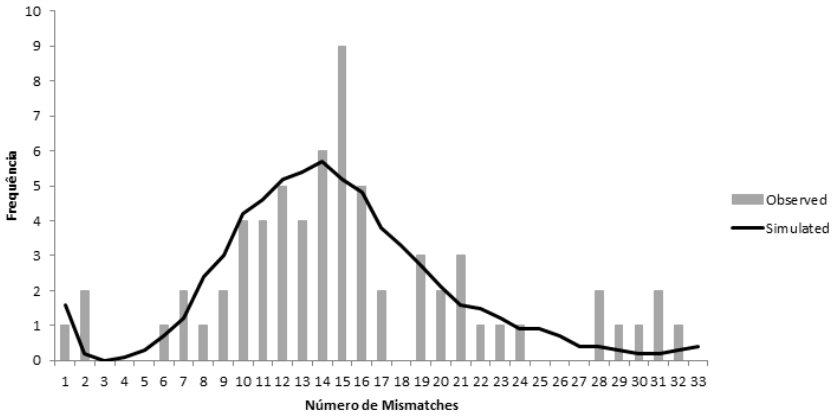

Figura 5: Distribuição *Mismatch* (multimodal) para a região do mtDNA D-loop de *Stenella coeruleoalba* no litoral do Brasil. O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto o y mostra a frequência das diferenças. Colunas indicam valores observados e linhas os valores simulados.

- **Região do citocromo b (Cit-b):**

As 12 amostras de *S. coeruleoalba* resultaram em oito haplótipos diferentes para o citocromo b. Desses, apenas o haplótipo Ctb1 foi compartilhado entre quatro indivíduos do Nordeste e um indivíduo da região Sul do Brasil (Figura 6).

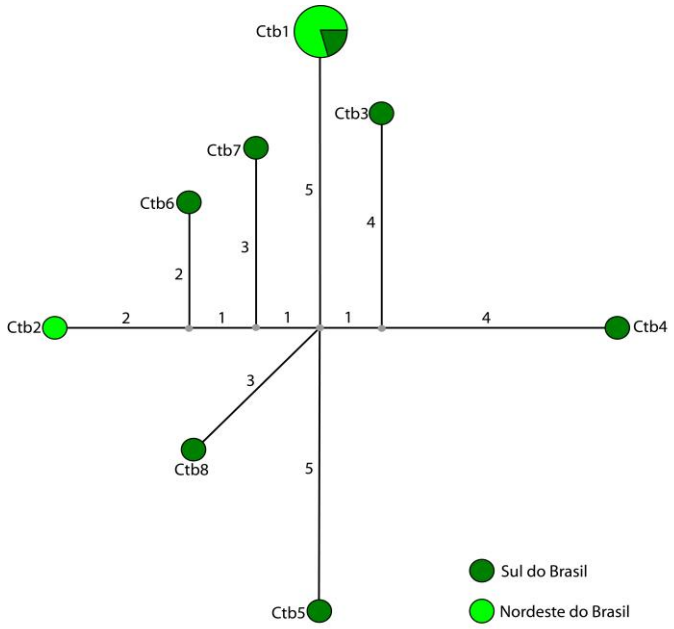

Figura 6. Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Brasil para a região Cit-b.

As amostras da região Cit-b dos indivíduos do Brasil apresentaram índices de diversidade relativamente altos: Brasil: h= 0,848; π= 0,249; Nordeste: h= 0,400; π= 0,124 e Sul: h= 1,0; π= 0,288 (Tabela 6). Contudo, assim como no marcador D-loop, as diversidades haplotípica e nucleotídica foram menores para a região Nordeste do que para o Sul do Brasil.

Os índices de neutralidade seletiva não indicaram expansão populacional para esta espécie ao analisar as amostras Brasil como uma única unidade amostral (D Tajima: -0,509 (P= 0,265); Fs de Fu: -1,823 (P= 0,155). Ao serem analisados como duas unidades amostrais os resultados também não foram significativos. A região Nordeste apresentou como D Tajima: -1,184 (P= 0,059); Fs de Fu: 3,967 (P= 0,960) e a região Sul: D Tajima: -1,361 (P= 0,410); Fs de Fu: -1,890 (P= 0,094).

A AMOVA (FST= 0,180/ P= 0,058) não demonstrou estruturação. Contudo, com o FST foi evidenciada a estruturação genética (FST= 0,180/ P= 0,045). Além disso, na AMOVA foi possível identificar o percentual de variação entre as populações e dentro das populações. Entre as populações foi evidenciado um percentual de variação de 18% e dentro das populações de 82%**.** Quanto ao gráfico de distribuição *Mismatch*, uma curva multimodal foi evidenciada (Figura 7).

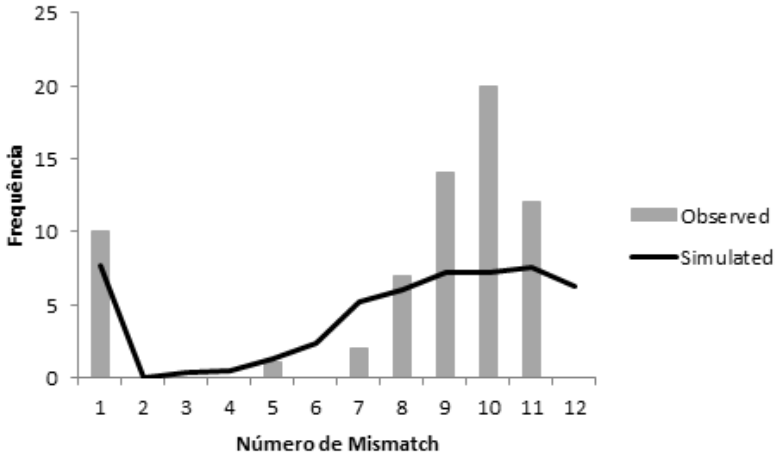

Figura 7: Distribuição *Mismatch* (multimodal) para a região do mtDNA Cit-b de *Stenella coeruleoalba* no litoral do Brasil. O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto o y mostra a frequência das diferenças.

- **Concatenado entre D-loop e Cit-b:**

Das 12 sequências resultantes das regiões mitocondriais D-loop e Cit-b concatenadas foi possível identificar a presença de 11 haplótipos, sendo que o haplótipo 1 (H1) esteve presente em dois indivíduos do Nordeste (Figura 8).

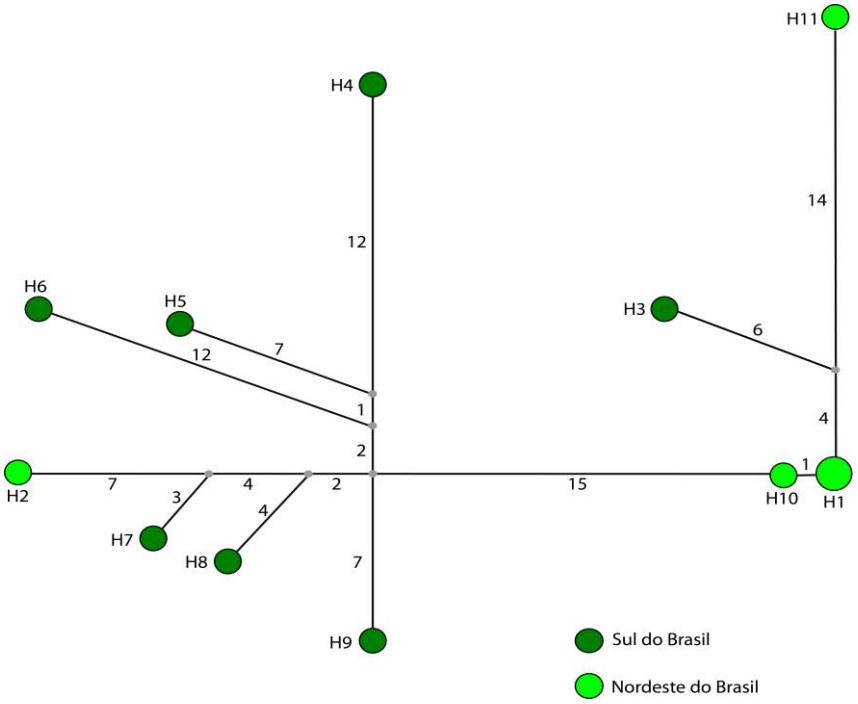

Figura 8. Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Brasil. Regiões mitocondriais D-loop e Cit-b concatenadas.

Os índices de diversidade foram altos para a espécie no Brasil ao analisar as sequências como uma única unidade amostral (h= 0,984; π= 0,277). Ao ser analisadas como duas unidades amostrais diferentes, o Sul apresentou maiores índices de diversidade nucleotídica e haplotípica: Sul (h= 1,00; π= 0,270); Nordeste (h= 0,900; π= 0,206).

Os valores de neutralidade seletiva não indicaram expansão populacional para a espécie, pois não foram significativos. As amostras do Brasil ao serem analisadas como uma unidade amostral apresentou como D de Tajima -0,750 (P= 0,189) e Fs de FU: -0,869 (P= 0,275). Ao ser analisado como duas unidades amostrais a região Nordeste teve os seguintes índices de neutralidade: D de Tajima -0,881 (P= 0,196) e o Fs de FU: 2,397 (P= 0,094) e a região Sul: D de Tajima -0,965 (P= 0,157) e o Fs de FU: -0,389 (P= 0,239) (Tabela 3).

A AMOVA entre as unidades amostrais Nordeste e Sul (FST= 0,201/ P= 0,056) não evidenciou estruturação por apresentar um valor acima de 0,05. O FST (FST= 0,046/ P= 0,099) não foi significativo, o que também não indica presença de estruturação populacional. Além disso, na AMOVA foi possível identificar o percentual de variação entre as populações e dentro das populações. Entre as populações foi evidenciado um percentual de variação de 20,14% e dentro das populações 79,86%, logo há uma maior diversidade dentro das populações do que entre.

O gráfico de distribuição *Mismatch* não indicou uma expansão populacional recente, com uma curva multimodal (Figura 9). Porém, com os testes de Tajima e Fu não foi possível afirmar uma expansão populacional.

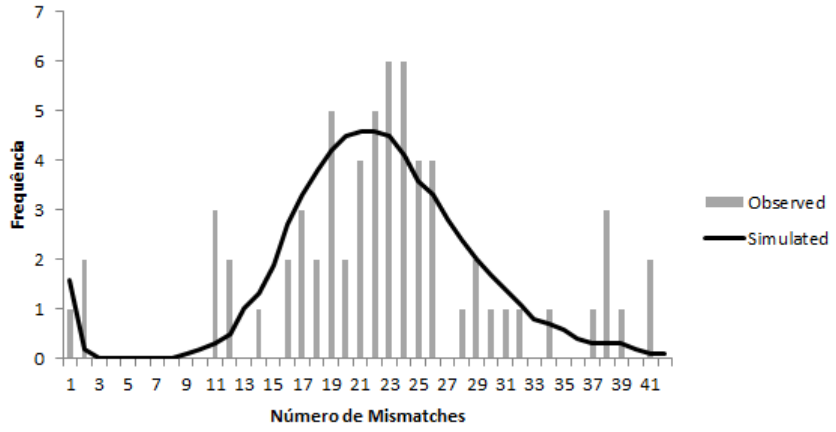

Figura 9: Distribuição *Mismatch* (multimodal). Regiões do mtDNA D-loop e Cit-b concatenadas de *Stenella coeruleoalba* no litoral do Brasil. O eixo x mostra o número de diferenças entre os pares de haplótipos, enquanto o y mostra a frequência das diferenças.

Tabela 3. Diversidade genética nucleotídica (π) e haplotípica (h), número de indivíduos analisados (N) e os índices de neutralidade seletiva: D de Tajima e FS de Fu (P<0,02), para os marcadores mitocondriais D-loop (470 bp), Cit-b (570 bp) e para o concatenado (1075 bp) em unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* do litoral brasileiro.

Unidades amostrais	**D-loop 470 bp**				**Cit-b 570 bp**				**Concatenado 1040 bp**			
	π	**h**	**D**	**Fu**	**π**	**H**	**D**	**Fu**	**π**	**h**	**D**	**Fu**
Geral (N= 12)	0,297	0,984	-0,509 (P= 0,265)	-1,823 (P= 0,155)	0,249	0,848	-0,509 (P= 0,265)	-1,823 (P= 0,155)	0,277	0,984	-0,750 (P= 0,189)	0,869 (P= 0,275)
Nordeste (N= 5)	0,255	0,900	-0,762 (P= -0,762)	-1,971 (P= 0,770)	0,124	0,400	-1,184 (P= 0,059)	3,967 (P= 0,960)	0,206	0,900	-0,881 (P= 0,196)	2,397 (P= 0,094)
Sul (N= 7)	0,259	1,000	-0,630 (P= 0,261)	-1,150 (P= 0,129)	0,288	1,000	-1,361 (P= 0,410)	-1,890 (P= 0,094)	0,270	1,000	-0,965 (P= 0,157)	-0,389 (P= 0,239)

4. Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico (D-loop)

Nesta análise, as sequências categorizadas como Oceano Atlântico Norte são provenientes de indivíduos do oeste do Oceano Atlântico Norte (N= 07) e do Mar Mediterrâneo (N= 49), totalizando 56 sequências. As sequências do Oceano Atlântico Sul englobam o Nordeste (N= 05) e o Sul do Brasil (N= 07), e totalizam 12 sequências. No total, 68 sequências foram avaliadas nesta análise.

Foram encontrados 48 haplótipos, onde seis foram observados em mais de um indivíduo de uma mesma unidade amostral. O haplótipo Dlp1 foi encontrado em dois indivíduos do Oceano Atlântico Sul, os haplótipos Dlp12 e Dlp13 em três indivíduos do Oceano Atlântico Norte e os haplótipos Dlp14, Dlp15 e Dlp35 são constatados, respectivamente, entre quatro, 12 e dois indivíduos do Oceano Atlântico Norte (Figura 10). Não houve compartilhamento de haplótipos entre os golfinhos do Oceano Atlântico Norte e do Oceano Atlântico Sul.

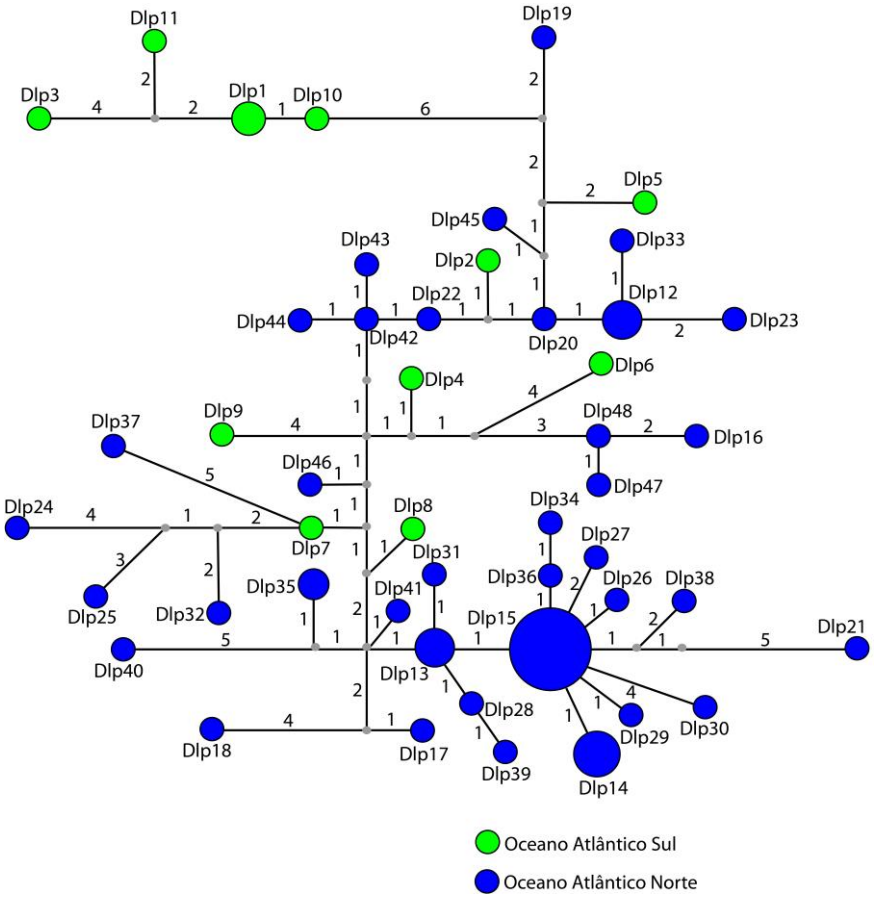

Figura 10. Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico Norte e Sul para a região controle do mtDNA (D-loop).

Os índices de diversidade do Oceano Atlântico Norte e Sul foram altos. No entanto, mesmo com o Oceano Atlântico Sul apresentando um menor número amostral, sua diversidade genética foi maior do a do Oceano Atlântico Norte: Oceano Atlântico Sul: h= 0,948; π= 0,098 e Oceano Atlântico Norte: h= 0,948; π= 0,098.

Os testes de neutralidade seletiva não foram significativos para os indivíduos do Oceano Atlântico Norte, D de Tajima: -0,080 (P= 0,515) e Fs de FU: -3,165 (P= 0,065), ou seja, de acordo com este teste, os *S. coeruleoalba* do Atlântico Norte não se encontram em expansão populacional. Os valores de D de Tajima para os golfinhos do Oceano Atlântico Sul também não foram significativos (D de Tajima: -1,450; P= 0,051), contudo é possível evidenciar expansão populacional pelo índice FS de Fu (-24,927 (P= 0,0), visto que este foi significativo (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade genética nucleotídica (π) e haplotípica (h), número de indivíduos analisados (N) e os índices de neutralidade seletiva: D de Tajima e FS de Fu (P<0,02), para os marcadores mitocondriais D-loop (470 bp) e Cit-b (570 bp) em unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico.

Unidades amostrais	**D-loop (470 bp)**				**Cit-b (570 bp)**			
	π	**h**	**D**	**Fu**	**π**	**h**	**D**	**Fu**
Oceano Atlântico Norte (N= 56)	0,098	0,948	-0,080 (P=0,515)	-3,165 (P= 0,065)	0,111	0,900	-0,855 (P=0,260)	0,051 (P= 0,381)
Oceano Atlântico Sul (N= 12)	0,149	0,984	1,450 (P=0,051)	-24,927 (P= 0,000)	0,202	0,848	-1,024 (P=0,141)	-0,209 (P= 0,432)

Na AMOVA e no FST os resultados foram significativos, sendo respectivamente: FST= 0,034/ P= 0,008 e FST= 0,034/ P= 0,009, o que indica estruturação entre os indivíduos das regiões Norte e Sul do Oceano Atlântico. A porcentagem de variação entre as populações foi de 3,48% e dentro das populações de 96,52%.

5. Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* em quatro unidades amostrais do Oceano Atlântico (D-loop)

Inicialmente, esta análise seria realizada com três unidades amostrais, sendo elas o Brasil, o oeste do Oceano Atlântico Norte e o Mar Mediterrâneo. Contudo, pelo fato de na rede de haplótipos do Oceano Atlântico para o marcador D-loop, o Mar Mediterrâneo demonstrar dois grupos distintos, esta análise foi realizada com quatro unidades amostrais, sendo elas o oeste do Oceano Atlântico Norte (OAN, N= 07), o Mediterrâneo 1 (MED1, N= 9), o Mediterrâneo 2 (MED2, N=40) e o Brasil (BR, N= 12).

Das 68 sequências resultantes, 48 haplótipos foram identificados e seis foram encontrados em mais de um indivíduo. O haplótipo Dlp1 foi encontrado em dois indivíduos do Brasil, o haplótipo Dlp12 em três indivíduos do MED1, o haplótipo Dlp13 em três indivíduos do MED2 e os haplótipos Dlp14, Dlp15 e Dlp35 em quatro, 12 e dois indivíduos, respectivamente, todos da unidade amostral MED2 (Figura 11). Não houve compartilhamento de haplótipos entre as unidades amostrais.

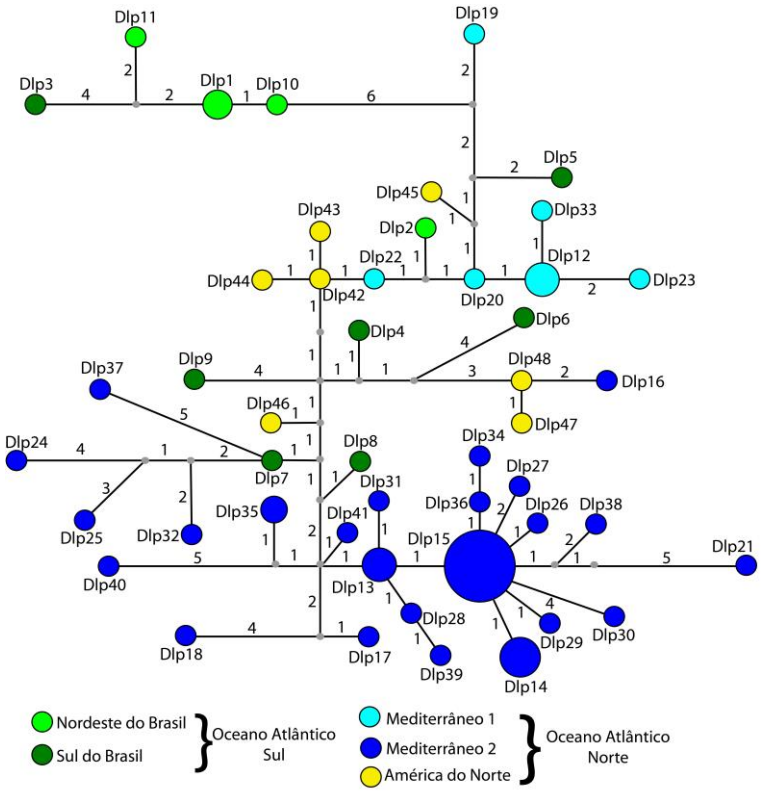

Figura 11. Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* em quatro unidades amostrais do Oceano Atlântico para a região controle do mtDNA (D-loop).

Nesta análise, o Brasil apresentou a maior diversidade nucleotídica (π= 0,149) quando comparada com as outras localidades (OAN: π= 0,081; MED1: π= 0,053; MED2: π= 0,073) (Tabela 8). Já a diversidade haplotípica foi maior no oeste do Oceano Atlântico Norte (1,000) quando comparada com as outras unidades amostrais (BR: h= 0,984; MED1: h= 0,892; MED2: h= 0,907) (Tabela 5).

Os índices de neutralidade seletiva não foram significativos para o Brasil (D de Tajima: -0,080/ P= 0,499; FS de Fu: -3,165/ P= 0,040) nem para o MED1 (D de Tajima: -1,459/ P= 0,057; FS de Fu: -1,397/ P= 0,1222). Quanto ao OAN, o D de Tajima não foi significativo (D de Tajima= 0,557; P= 0,700), mas o FS de Fu apresentou significância (FS= -3,033/ P= 0,019) e o MED2 também teve seus índices de neutralidade significativos (D de Tajima: -1,870/ P= 0,015; FS de Fu: -13,265/ P= 0,00). O que indica uma possível expansão populacional para o OAN e para o MED2 (Tabela 5).

Tabela 5. Diversidade genética nucleotídica (π) e haplotípica (h), número de indivíduos analisados (N) e os índices de neutralidade seletiva: D de Tajima e FS de Fu (P<0,02), para o marcador mitocondrial D-loop (470 bp) em quatro unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico.

Unidade amostral	II	h	D	Fu
BR	0,1492	0,9848	-0,0801	-3,165
(N= 12)			(P= 0,499)	(P= 0,040)
OAN	0,0811	1,000	0,5572	-3,033
(N= 7)			(P= 0,700)	(P= 0,019)
MED1	0,0538	0,892	-1,459	-1,397
(N= 9)			(P= 0,057)	(P= 0,122)
MED2	0,0733	0,907	-1,870	-13,265
(N= 40)			(P= 0,015)	(P= 0,000)

O FST foi significativo entre o Brasil e o MED1 (FST= 0,0586/ P= 0,027) e entre o Brasil e o MED2 (FST= 0,057/ P= 0,009), mas não foi significativa entre o Brasil e o OAN (FST= 0,008/ P= 0,459).

Quanto às unidades amostrais do Mar Mediterrâneo (MED1 e MED2), a análise de distância genética foi significativa (FST= 0,098/ P= 0,000). Não houve significância entre o MED1 e o OAN (FST= 0,054/ P= 0,117), mas os valores foram significativos entre MED2 e o OAN (FST= 0,053/ P= 0,036). O que pressupõe que há estruturação entre o MED2 com

todas as unidades amostrais analisadas e entre Brasil e MED1. Além disso, a AMOVA foi significativa (FST= 0,063/ P= 0,000), o que sugere uma possível estruturação entre estas quatro unidades amostrais (Tabela 6). Além disso, a porcentagem de variação entre e dentro das populações foi respectivamente de 6,36% e 93,64%.

Tabela 6. Análise de divergência genética (FST) (P<0,05) das quatro unidades amostrais de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico (Brasil= BR, oeste do Oceano Atlântico Norte= OAN, Mediterrâneo 1= MED1 e Mediterrâneo 2= MED2), com base no marcador mitocondrial D-loop.

Unidades amostrais	**BR**	**MED1**	**MED2**	**OAN**
BR				
MED1	FST= 0,0586 P= 0,0270*			
MED2	FST= 0,0573 P= 0,009*	FST= 0,0987 P= 0,0000*		
OAN	FST= 0,0080 P= 0,4594	FST= 0,0547 P= 0,117	FST= 0,0534 P= 0,0360*	

*Valores significativos.

6. Diversidade genética de *Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico (Cit-b)

Nesta análise, com 17 sequências, Oceano Atlântico Sul (N= 12) e Oceano Atlântico Norte (N= 05), foram encontrados 12 haplótipos. Desses, o haplótipo Ctb1 esteve presente em cinco indivíduos do Oceano Atlântico Sul (quatro do Nordeste e um do Sul do Brasil) e o haplótipo Ctb9 foi encontrado em dois indivíduos do Oceano Atlântico Norte (Figura 12). Não houve compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos do Oceano Atlântico Norte e do Oceano Atlântico Sul.

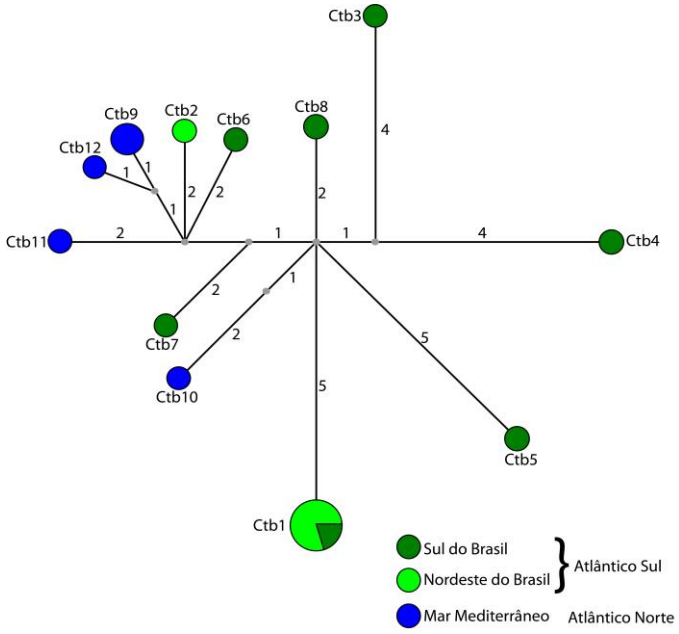

Figura 13. Rede de haplótipos dos indivíduos de *Stenella coeruleoalba* do Oceano Atlântico Norte e Sul para a região do citocromo b (Cit-b).

A diversidade haplotípica dos indivíduos do Oceano Atlântico Norte foi mais alta do que a dos indivíduos do Oceano Atlântico Sul (AN: h= 0,900 e AS: h= 0,848). Já a diversidade nucleotídica foi maior nos indivíduos do Oceano Atlântico Sul (AN: π= 0,111 e AS: π= 0,202).

Os testes de neutralidade seletiva não foram significativos para nenhuma das unidades amostrais: Oceano Atlântico Sul (D de Tajima: -1,024 (P= 0,141) e Fs de FU: -0,209 (P= 0,432) e Oceano Atlântico Norte (D de Tajima: -0,855 (P= 0,260) e Fs de FU: 0,051(P= 0,381), logo não indicam expansão populacional.

Na AMOVA e no FST os resultados foram significativos, sendo respectivamente FST= 0,130/ P= 0,029 e FST= 0,130/ P= 0,026. Esses valores também sugerem uma estruturação entre estas duas unidades amostrais. Além disso, a porcentagem de variação entre as populações foi de 13,01% e dentro das populações de 86,99%.

DISCUSSÃO

- **Amplificação e sequenciamento**

O processo de especiação em mamíferos marinhos, bem como, das relações evolutivas entre os delfinídeos ainda são pouco compreendidos (Cipriano, 1997; Amaral *et al.*, 2012). Este grupo foi submetido a rápidas radiações evolutivas, logo não tiveram tempo suficiente para se diferenciar completamente, o que pode acarretar em hibridação entre as espécies recentemente evoluídas, dificultando a inferência de relações filogenéticas dentro desta subfamília (Amaral *et al.*, 2012).

Algumas sequências da região do citocromo b, ao serem analisadas no GenBank e no DNA *Surveillance*, demonstraram homologia e/ou uma baixa distância genética com sequências correspondentes à espécie *Stenella clymene.* Agregações e cruzamentos entre diferentes espécies do gênero *Stenella* são relatados frequentemente, pois mesmo com diferenças morfológicas e comportamentais, há sobreposição entre algumas áreas de distribuição deste gênero (Moreno *et al.*, 2005). Amaral *et al.* (2014), a partir de estudos com o DNA mitocondrial e nuclear, sugerem que a espécie *S. clymene* seja um híbrido entre as espécies *S. coeruleoalba* e *S. longirostris* e demonstraram que o genoma mitocondrial de *S. clymene* está estreitamente relacionado com o genoma de *S. coeruleoalba*, enquanto o genoma nuclear parece estar mais relacionado com a espécie *S. longirostris.* Tal fato sugere uma hibridização entre uma fêmea de *S. coeruleoalba* e um macho de *S. longirostris.* Este pode ter sido o motivo pelo qual as sequências de *S. coeruleoalba* apresentaram homologia inicial com as sequências de *S. clymene* publicadas no GenBank.

Nara (2016) analisou as regiões do mtDNA COI, Cit-b e D-loop de indivíduos de *S. clymene* do Nordeste do Brasil, comparando-os com sequências da subfamília Delphininae obtidas de estudos prévios e realizou uma reconstrução filogenética. Para D-loop, foi possível determinar que *S. clymene* é parafilética e grupo irmão do clado composto por *Stenella coeruleoalba, Delphinus delphis* e *Stenella frontalis*, enquanto para a região COI e Cit-b *S. clymene* é polifilética e grupo irmão de *S. coeruleoalba.* O que reforça então a ideia de que *S. coeruleoalba* encontra-se mais relacionada com *S. clymene* do que com as outras espécies do gênero, o que pode justificar a baixa distância genética encontrada no DNA *Surveillance.*

- ***Stenella coeruleoalba* no litoral brasileiro**

Ao analisar as amostras de *S. coeruleoalba* do litoral brasileiro como uma única unidade amostral, foi possível evidenciar a presença de alta diversidade haplotípica e nucleotídica para os dois marcadores testados. Resultados similares foram encontrados em indivíduos desta mesma espécie no Mar Mediterrâneo: Garcia-Martinez *et al.,* (1999) e Galov *et al.,* (2009). Altos índices de diversidade também foram encontrados em outras espécies do gênero *Stenella*: *S. longirostris* (Volpi, 2012; Faria, 2013), *S. frontalis* (Caballero *et al.,* 2013) e *S. clymene* (Nara, 2015), bem como para outros indivíduos da família Delphininae: Natoli *et al.,* 2005; Amaral *et al.,* 2007 e Quérouil *et al.,* 2007.

O litoral brasileiro, ao ser analisado como duas unidades amostrais (Nordeste e Sul), apresentou maiores índices de diversidade para a região Sul. Tal resultado poderia ser justificado pelo maior número de amostras para esta região. No entanto, em alguns estudos, como por exemplo Volpi (2012), que avaliou a espécie *S. longirostris* no litoral brasileiro, mesmo o número amostral sendo menor para a região Sudeste, foi observada uma maior diversidade genética quando comparado aos indivíduos do Arquipélago de Fernando de Noronha. Provavelmente, a região Sul demonstrou maiores índices de diversidade, pelo fato dos indivíduos que compõe esta unidade terem surgido de um maior número de linhagens quando comparado com a região Nordeste ou por esta unidade estar recebendo golfinhos de outras localidades do Oceano Atlântico.

Os índices de neutralidade não foram significativos para nenhum dos marcadores avaliados, logo, não foi evidenciada expansão populacional nos indivíduos de *S. coeruleoalba* do Brasil. Nara (2016) também não evidenciou expansão populacional para *S. clymene* no litoral do brasileiro.

As análises de estruturação genética realizadas com o marcador D-loop e com o concatenado apresentaram valores muito próximos do índice de significância, contudo não demonstraram estruturação para os golfinhos-listrados do litoral do Brasil. No entanto, analisando as redes de haplótipos para o marcador D-loop e para o concatenado, nota-se uma grande distância em passos mutacionais, que nos permite identificar dois grupos (D-loop: 12 passos e concatenado: 15 passos mutacionais). Além do mais foi possível evidenciar estruturação genética para o marcador Cit-b, o que nos permite identificar a existência de pelo menos duas populações de *S. coeruleoalba* no Brasil. Acredita-se que com o aumento do número amostral seja possível confirmar essa estruturação genética entre os indivíduos amostrados nas diferentes regiões brasileiras. No entanto, com certo fluxo

gênico, pois na rede de haplótipos para o marcador Cit-b, um haplótipo foi compartilhado entre quatro indivíduos da região Nordeste e um indivíduo da região Sul.

- ***Stenella coeruleoalba* no Oceano Atlântico Norte e Sul**

O Oceano Atlântico Sul apresentou alta diversidade nucleotídica em ambos os marcadores analisados, mesmo com um baixo número amostral. Esse fato sugere que esta população possa ter se originado a partir de um maior número de linhagens que a população do Atlântico Norte e/ou que esta unidade receba mais golfinhos de outras localidades. A rede de haplótipos corrobora esta ideia, evidenciando certa proximidade entre os haplótipos do Atlântico Norte e do Atlântico Sul. Na rede de haplótipos, os indivíduos do Sul encontram-se bem distribuídos, com poucos passos mutacionais diferenciando-os do Atlântico Norte. Contudo, não é possível inferir a existência de fluxo gênico entre estes oceanos visto que não houve compartilhamento de haplótipos e/ou que o fluxo gênico pode ser bem restrito e não foi identificado devido ao baixo número amostral.

A diversidade haplotípica variou para os dois marcadores. O Oceano Atlântico Sul apresentou maior diversidade haplotípica com o D-loop e o Oceano Atlântico Norte demonstrou com o Cit-b. Acredita-se que o Atlântico Norte possa ter recebido mais linhagens durante sua formação, visto que Cit-b é um marcador mais conservado. Além disso, é possível que esta região atualmente receba mais indivíduos de outras localidades o que produz uma maior variabilidade genética encontrada no marcador D-loop. No entanto, não foi encontrado compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos do Oceano Atlântico Norte e os do Oceano Atlântico Sul, o que sugere um fluxo gênico restrito ou inexistente.

A AMOVA e a análise de distância genética foram significativas para ambos os marcadores, o que determina a presença de estruturação genética entre os golfinhos-listrados do Oceano Atlântico Norte e do Oceano Atlântico Sul. Outros estudos com o gênero *Stenella* também apresentaram estruturação populacional, entre eles pode-se citar: Volpi, 2012; Caballero *et al.*, 2013 e Nara, 2016.

Detectar como se encontra a diversidade e a estruturação genética destes organismos torna-se crucial para desenvolver estratégias de conservação específicas para cada população, visando sempre à necessidade particular de cada uma delas.

- ***Stenella coeruleoalba*** **em quatro unidades amostrais do Oceano Atlântico (D-loop)**

- Mar Mediterrâneo e oeste do Oceano Atlântico Norte:

Os índices de diversidade do Mar Mediterrâneo foram relativamente baixos quando comparado com das outras localidades. Alguns estudos corroboram com este resultado, tanto com marcadores mitocondriais (Garcia-Martinez *et al*., 1999) quanto com marcadores nucleares (Valsecchi *et al*., 2007).

Alguns fatores já foram discutidos para justificar essa baixa diversidade genética dos golfinhos-listrados do Mediterrâneo. Dentre eles estão as ameaças sofridas por essa população nas últimas décadas, como a infecção epizoótica causada por um morbilivírus, que em 1990 matou milhares de golfinhos-listrados no Mar Mediterrâneo (Domingo *et al.,* 1992; Domingo *et al.,* 1995; González *et al.,* 2002), a presença de poluentes organoclorados com potencial para efeitos imunossupressores (Aguilar *et al.,* 1994) e elevadas concentrações de compostos químicos diagnosticados nos tecidos destes indivíduos (Andre *et al.,* 1991; Marsili *et al.,* 1996; Monaci *et al.,* 1998; Cardellicchio *et al.,* 2002). Além disso, os polimorfismos do DNA mitocondrial sugerem que o fluxo gênico entre o estoque do Mediterrâneo e o restante do Atlântico europeu é restrito (Garcia-Martinez *et al.,* 1999), o que pode contribuir para a diminuição da diversidade genética.

Valsecchi *et al.,* (2004) utilizaram 10 marcadores microssatélites para analisar a estrutura populacional e as consequências genéticas da epizootia sobre os indivíduos de *S. coeruleoalba* no Mar Mediterrâneo. Determinou-se que os golfinhos que morreram no início do surto eram significativamente mais endogâmicos do que aqueles que morreram mais tarde.

A rede de haplótipos evidenciou dois grupos no Mar Mediterrâneo, aqui nomeados de MED1 e MED2. O grupo MED1 encontra-se bem mais próximo do OAN do que o restante dos haplótipos do Mar Mediterrâneo. A AMOVA corrobora com a rede de haplótipos, demonstrando ausência de estruturação genética entre o MED1 e o OAN e presença de estruturação entre os dois grupos do Mar Mediterrâneo (MED1 e MED2).

A partir deste resultado, acredita-se que os indivíduos do MED2 provavelmente sejam residentes do Mar Mediterrâneo, não se locomovam por longas distâncias e/ou, sejam provenientes de uma linhagem diferente da que originou os MED1. Além disso, supõe-se que os indivíduos do MED1 tenham se originado de uma linhagem mais próxima

geneticamente dos indivíduos do Brasil e do OAN e que estes golfinhos talvez possam ter saído do Mar Mediterrâneo pelo Estreito de Gibraltar e se encontrado em algum momento com a população do OAN e do Brasil, já que o Estreito de Gibraltar não restringe o movimento de golfinhos ou suas presas (Natoli, 2005). Outra possibilidade, seria a ocupação desta espécie no Mar Mediterrâneo em momentos diferentes, é possível que o grupo que ocupou primeiro (no caso MED2) este mar seja mais distinto de todas as unidades amostrais aqui avaliadas.

Segundo Gasparini *et al.,* (2007), o Mediterrâneo pode ser subdividido em duas regiões principais: a bacia hidrográfica ocidental e oriental, além de ser cercada de mares que apresentam características ecológicas muito diferentes. Dentre estas características pode-se citar a salinidade, temperatura, disponibilidade de alimento, topografia de fundo, entre outros. Essas podem influenciar na separação genética dos golfinhos-listrados, visto que foi possível identificar diferenças genéticas entre as populações da parte oriental e da parte ocidental do Mar Mediterrâneo. Outros estudos com *S. coeruleoalba* também encontraram a presença de dois ou mais grupos geneticamente distintos no Mar Mediterrâneo (Garcia-Martinez *et al.,* 1999; Galov *et al.,* 2009).

Papale *et al.* (2012) avaliaram as características acústicas dos assobios emitidos pelo golfinho-listrado (*S. coeruleoalba*) a partir do Oceano Atlântico (Açores e Canárias) e do Mediterrâneo. A duração do sinal, a frequência máxima e a faixa de frequência medidos nos indivíduos do Mediterrâneo foram significativamente menores quando comparados aos medidos no restante do Atlântico. Os resultados sugerem que as características acústicas limitadas pelo fenótipo estrutural, tais como os parâmetros de frequência do assobio, têm um efeito importante sobre a separação dos indivíduos do restante do Atlântico Norte e do Mediterrâneo.

Estudos verificaram a presença de dois ou mais grupos para outras espécies no Mar Mediterrâneo (Narciri *et al.,* 1999; Guarniero *et al.,* 2002; Natoli *et al.,* 2005). Natoli *et al.,* (2005) analisaram a estrutura populacional de *Tursiops truncatus*, em uma faixa contínua do Mar Negro ao Atlântico Norte. Foi encontrada estruturação populacional com limites que coincidiam com as transições entre regiões de habitats. Segundo este estudo, as regiões podem ser caracterizadas pela topografia do fundo do oceano, e características oceanográficas tais como salinidade de superfície, produtividade e temperatura. Os resultados sugerem a existência de um mecanismo de estruturação evolutiva de populações baseadas na dependência local de habitat e na capacidade de dispersão e migração dos golfinhos. Esses estudos reforçam a ideia de que algumas espécies de organismos marinhos

encontrados no Mar Mediterrâneo são geneticamente diferentes dos indivíduos do Oceano Atlântico Norte e que pode haver mais de um grupo estruturado geneticamente dentro deste mar. Isso corrobora com a estruturação entre os *S. coeruleoalba* do Mar Mediterrâneo encontrada neste estudo.

- Brasil:

A análise de distância genética foi significativa entre o Brasil e o MED1 e entre o Brasil e o MED2, mas não foi significativa entre o Brasil e o OAN, apesar destas duas unidades amostrais não compartilharem haplótipos.

Os índices de diversidade foram altos para esta unidade amostral e não foi evidenciada expansão populacional. Na rede de haplótipos os golfinhos-listrados do Brasil demonstraram maior proximidade com os indivíduos do MED1 e com o OAN. Contudo, ao avaliar a análise de distância genética, o BR demonstra estruturação com os dois grupos do Mar Mediterrâneo, mas não indica estruturação com o OAN. Contudo, com o número amostral avaliado, não foram encontrados indícios de fluxo gênico entre estas duas unidades amostrais, visto que não houve compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos do OAN e do BR. Isso sugere que os indivíduos do Brasil e do OAN possam ter surgido de linhagens mais próximas geneticamente, que ainda não se estruturaram geneticamente, mas que seria uma questão de tempo.

A alta mobilidade das espécies de cetáceos, sua extensa área de distribuição e a escassez de barreiras de fluxo gênico nos oceanos podem limitar a divisão das espécies e, como resultado, regiões distantes podem estar conectadas geneticamente (Pichler & Backer, 2000; Fontaine *et al.*, 2007). Além disso, alguns estudos argumentam que a dispersão e a locomoção dos cetáceos podem estar relacionadas a uma combinação de comportamentos complexos, como a filopatria, as especializações para recursos locais ou a organização social em grupos (Hoelzel, 1998; Hoelzel, 2003). Bourret *et al.* (2007) reforçam a ideia da capacidade de dispersão de *S. coeruleoalba* entre mares e oceanos ao realizar análises com microssatélites em indivíduos do Norte do Oceano Atlântico, do Mar Mediterrâneo e Norte do Pacífico.

Ao avaliar as unidades amostrais do Brasil separadamente, foi possível observar a presença de estruturação genética entre os indivíduos do Nordeste do Brasil e as duas unidades amostrais do Mar Mediterrâneo. Quanto à região Sul, só foi possível observar

estruturação com o grupo MED2. Alguns fatores podem estar relacionados a esta estruturação encontrada entre o MED1 e o Nordeste. Dentre eles pode-se citar o isolamento comportamental, a presença de correntes que dificultam este contato e até mesmo a temperatura das correntes marinhas. Segundo Hoelzel *et al.* (1998) o ambiente marinho é homogêneo o suficiente para apoiar a distribuição de uma espécie em uma ampla faixa geográfica, mas as variações locais no habitat também podem facilitar o desenvolvimento de especializações de nicho locais.

CONCLUSÃO

A partir deste estudo pode-se concluir que os indivíduos de *S. coeruleoalba* do Brasil apresentam uma alta diversidade genética para ambos os marcadores mitocondriais analisados e provavelmente constituem duas populações distintas, evidenciadas pelo marcador Cit-b. Além disso, este estudo demonstrou a presença de dois grupos de golfinhos-listrados estruturados geneticamente dentro do Mar Mediterrâneo, onde um destes grupos encontra-se estruturado com todas as unidades amostrais aqui analisadas. Não foi evidenciado fluxo gênico entre os golfinhos-listrados do Oceano Atlântico Norte e o Oceano Atlântico Sul. Até então, foi possível evidenciar três populações de *S. coeruleoalba* no Oceano Atlântico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar A, Borrell A, (1994) Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. Elsevier, 154: 237-247.

Amaral AR, Beheregaray LB, Bilgmann K, Freitas L, Robertson KM, Sequeira M, Stockin KA, Coelho MM, Möller LM (2012) Influences of past climatic changes on historical population structure and demography of a cosmopolitan marine predator, the common dolphin (genus *Delphinus*). Molecular Ecology doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05728.x.

Amaral AR, Lovewell G, Coelho MM, Amato G, Rosenbaum HC (2014) Hybrid Speciation in a Marine Mammal: The Clymene Dolphin (*Stenella clymene*). PLoS ONE 9(1): e83645. doi:10.1371/journal.pone.0083645.

Amaral AR, Sequeira M, Coelho MM (2007) A first approach to the usefulness of cytochrome c oxidase I barcodes in the identification of closely related delphinid cetacean species. Marine and Freshwater Research, 58: 505–510.

Andre J, Boudou A, Ribeyre F, Bernhard M (1991) Comparative study of mercury accumulation in dolphins *(Stenella coeruleoalba)* from French Atlantic and Mediterranean coasts. The Science of the Total Environment, 104, 191-209.

Andrews KR, Karczmarski L, Whitlow WLAu, Rickards SH, Vanderlip CA, Toonen RJ (2006) Patterns of genetic diversity of the Hawaiian spinner dolphin (*Stenella longirostris*). Atoll Research Bulletin, 543: 65–73.

Andrews KR, Karczmarski L, Whitlow WLAu, Rickards S H, Vanderlip CA, Bowen BW, Grau E G, Toonen RJ (2010) Rolling stones and stable homes: social structure, habitat diversity and population genetics of the Hawaiian spinner dolphin (*Stenella longirostris*). Molecular Ecology, 19: 732–748.

Archer FI, Morin PA, Hancock-Hanser BL, Robertson KM, Leslie MS, Bérubé M, Panigada S, Taylor BL (2013) Mitogenomic Phylogenetics of Fin Whales (*Balaenoptera physalus spp.*):

Genetic Evidence for Revision of Subspecies. PLoS ONE 8(5): e63396. doi:10.1371/journal.pone.0063396.

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.

Arnason U, Gullberg A (1996) Cytocrome b Nucleotide Sequences and the Identification of Five Primary Lineages of Extant Cetaceans. Molecular Biology and Evolution, 13 (2): 407-417.

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.

Ballard JWO, Rand DM (2005) The Population Biology of Mitochondrial DNA and its Philogenetic Implications. Ecology Evolution, 36: 621-42.

Bandelt HJ, Foster P, Rohl A (1999) Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16: 37-48.

Bérubé M, Aguilar A, Dendanto D, Larsen F, Notarbartolo di Sciara G, Sigurjónsson J, Urban-R J, Palsbool PJ (1998) Population genetic structure of Noth Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. Molecular Ecology, 7: 585- 599.

Bourret VJR, Macé MRJM, Crouau-Roy B (2007) Genetic variation and population structure of western Mediterranean and northern Atlantic *Stenella coeruleoalba* populations inferred from microsatellite data. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 265–269.

Bruford MW, Hanotte O, Broohfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Molecular genetic analyses of populations: A Pratical Approach. Oxford, 225-269.

Caballero S, Jackson J, Mignucci-Giannoni AA, Barrios-Garrido H, Beltrán-Pedreros S, Montil-Villalobos MG, 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. Molecular Phylogenetics and Evolution, 46: 252–268.

Caballero S, Santos MCO, Sanches A, Mignucci-Giannoni AA (2013) Initial description of the phylogeography, population structure and genetic diversity of Atlantic spotted dolphins from Brazil and the Caribbean, inferred from analyses of mitochondrial and nuclear DNA. Biochemical Systematics and Ecology, 48: 263–270.

Cardellicchio N, Decataldo A, Di Leo A, Misino A (2002) Accumulation and tissue distribution of mercury and selenium in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea (southern Italy). Environmental Pollution, 116: 265–271.

Courbis S, Baird RW, Cipriano F, Duffield D (2014) Multiple Populations of Pantropical Spotted Dolphins in Hawaiian Waters. Journal of Heredity, 105(5): 627–641.

Cipriano F, Dizon AE, Chivers SJ, Perrin WF (1997) Antitropical distribution and speciation in dolphins of the genus *Lagenorhynchus*: a preliminary analysis. Society for Marine Mammalogy, 305–316.

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.

Domingo M, Visa J, Pumarola M, Marco AJ, Ferrer L, Rabanal R, Kennedy D (1992) Pathologic and Immunocytochemical Studies of Morbillivirus Infection in Striped Dolphins *(Stenella coeruleoalba).* Veterinary Pathology, 29: 1- 10.

Domingo M, Vilafranca M, Visa J, Prats N, Trudgett A, Visser I (1995) Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). Veterinary Microbiology, 44: 229–239.

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.

Faria DM (2013) Estruturação genética de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris* Gray, 1828) no litoral brasileiro. 68 f. Dissertação (Mestrado em biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 2013.

Fontaine MC, Baird SJ, Piry S, Ray N, Tolley KA, Duke S, Birkun Jr A, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona A, Öztürk B, Öztürk AA, Ridoux T, Rogan E, Sequeira M, Siebert U, Vikingsson GA, Bouquegneau JM, Michaux JR (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. BMC Biology 5:30 doi:10.1186/1741-7007-5-30.

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.

Galov A, Lau G, Nikolic N, Satovic Z, Gomercic T, Gomercic MD, Kocijan I, Seol B, Gomercic HR (2009) Records and genetic diversity of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Croatian coast of the Adriatic Sea. Marine Biological Association of the United Kingdom doi:10.1017/S1755267209000888; Vol. 2; e98. Published online.

Garcia-Martinez J, Moya A, Raga JA, Latorre A (1999) Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. Molecular Ecology, 8: 1069-107.

Gariboldi MC, Túnez JI, Failla M, Hevia M, Panebianco MV, Viola MNP, Vitullo AD, Cappozzo HL (2016) Patterns of population structure at microsatellite and mitochondrial DNA markers in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). Ecology and Evolution, 6: 8764–8776.

Gasparini S, Azzellino A, Airoldi S, Hoelzel R (2007) Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. Molecular Ecology, 16: 2922–2933.

González L, Patterson IA, Reid RJ, Foster G, Barberán M, Blasco JM, Kennedy S, Howie FE, Godfroid J, MacMillan AP, Schock A, Buxton D (2002) Chronic Meningoencephalitis

Associated with *Brucella* sp. Infection in Live-stranded Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*). Journal of Comparative Pathology, 126: 147–152.

Guarniero I, Franzellitti S, Ungaro N, Tommasini S, Piccinetti C, Tinti F (2002) Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. Journal Fish Biology, 60: 1459-1474.

Hammond PS, Bearzi G, Bjorge A, Forney K, Karczmarski L, Kasuya T, Perrin WF, Scott MD, Wang JY, Wells RS, Wilson B (2008) *Stenella coeruleoalba*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T20731A9223182. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T20731A9223182.en. Downloaded on 09 January 2017.

Hoelzel AR (1998) Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implication for conservation policy. Journal Hered, 89: 451-458

Hoelzel AR, Goldsworthy SD, Fleischer RC (2003) Population genetics. In Marine Mammal Biology: An Evolutionary Approach Edited by: Hoelzel AR. Oxford: Blackwell Science, 9: 325-352.

ICMBio (2011) Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: pequenos cetáceos/AS Barreto et al.; organizadores: CC Rocha-Campos; IG Câmara e DJ Pretto – Brasília: 156 p.

Jackson JA, Baker CS, Vant M, Steel DJ, Medrano-Gonzalez L, Palumbi SR (2009) Big and Slow: Phylogenetic Estimates of Molecular Evolution in Baleen Whales (Suborder Mysticeti). Society for Molecular Biology and Evolution, 26(11): 2427–2440.

Jefferson TA, Leatherwood S, Webber MA (1994) species identification guide. Marine mammals of the world. Rome, FAO. 320. p. 587 figs.

Kinston SE, Adams LD, Rosel PE (2009) Testing mitochondrial sequences and anonymous nuclear markers for phylogeny reconstruction in a rapidly radiating group: molecular systematics of the Delphininae (Cetacea: Odontoceti: Delphinidae). BMC Evolutionary Biology, 9:245.

LeDuc RG, Perrin WF, Dizon AE (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. Marine Mammal Sciences, 15: 619–648.

Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. Molecular Ecology, 41:54-66.

Lodi L, Borobia M. (2013) Baleias, botos e golfinhos do Brasil: Guia de identificação. Technical Books Editora. Rio de Janeiro. 1ª Edição.

Mace MJ, Bourret V, Crouau-Roy B (2006) Polyphyly in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and the Messinian Salinity Crisis. Unpublished.

Maia-nogueira R, Farias TS, Cunha IF, Dórea-reis LW, Braga FL (2001) Primeiro registro de *Stenella coeruleoalba* Meyen, 1883 (cetácea- delphinidae) no litoral do estado da Bahia, incluindo uma revisão da espécie em águas brasileiras. Bioikos, PUC-Campinas, 15 (1): 45-49.

Marsili L, Focardi S (1996) Organochlorine levels in subcutaneous blubber biopsies of fin whales *(Balaenoptera physalus)* and striped dolphins *(Stenella coeruleoalba)* from the Mediterranean Sea. Environmental Pollution 91 (1): 1 -9.

May-Collad L, Agnarsson I (2005) Cytochrome *b* and Bayesian inference of whale phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution. oi:10.1016/j.ympev.2005.09.019.

Monaci F, Borreal A, Leonzio C, Marsili L, Calzada N (1998) Trace elements in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the western Mediterranean. Environmental Pollution, 99: 61-68.

Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 269-292.

Moreno IB, Zerbini AN, Danilewicz D, Santos MCO, Simões-Lopes PC, Lailson-Brito Jr J, Azevedo AF (2005) Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. Marine Ecology Progress Series, 300: 229–240.

Nara LBC (2015) Estrutura genética populacional de *Stenella clymene* (Gray, 1850) e sua relação filogenética com o gênero. 43 f. Dissertação (Mestrado em biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 2012.

Narsiri M, Lemaire C, Borsa P, Bonhomme F (1999) Genetic Study of the Atlantic/ Mediterranean transition in Sea Bass (*Dicentrarchux labrax*). The American Genetic Association, 90: 591- 596.

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

Natoli A, Birkun A, Aguilar A, Lopez A, Hoelzel AR (2005) Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). The Royal Society, 272: 1217–1226.

Natoli A, Peddemors VM, Hoelzel AR (2008) Population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) impacted by bycatch along the east coast of South Africa. Conservation Genetic, 9: 627–636.

Oremus M, Poole MM, Steel D, Baker CS (2007) Isolation and interchange among insular spinner dolphin communities in the South Pacific revealed by individual identification and genetic diversity. Marine Ecology Progress Series, 336: 275–289.

Oremus M (2008) Genetic and demographic investigation of population structure and social system in four delphinid species. Tese (Doutorado em Filosofia em Ciências Biológicas), Universidade de Auckland, Auckland.

Papale E, Azzolin M, Cascão I, Gannier A, Lammers MO, Martin VM, Oswald J, Perez-Gil M, Prieto R, Silva MA (2012) Geographic variability in the acoustic parameters of striped dolphin's (*Stenella coeruleoalba*) whistles. Acoustical Society of America, 133(2): 1126–1134.

Perrin WF, Archer FI (1999) *Stenella coeruleoalba.* Mammalian species, 603:1-9.

Pichler FB, Baker CS (2000) Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 267: 97–102.

Quérouil S, Silva M A, Freitas L (2007) High gene flow in oceanic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of the North Atlantic. Conservation Genetic 8:1405–1419. doi: 10.1007/s10592-007-9291-5

Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences, Molecular Biology and Evolution, 9: 552- 559.

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.

Rozas JP, Librado JC, Sánchez-DelBarrio X, Rozas R (2010) DnaSP version 5.10.1 (Self-extracting file of 4.6 Mb). Universitat de Barcelona.

Sholl TGC, Moura JF, Ott PH, Bonvicino CR, Reis EC, Tavares DC, Siciliano S (2013) Cytochrome b sequencing for the species identification of whale carcasses washe ashore in Brazil. Marine Biodiversity Records, 6: 1— 4.

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.

Valsecchi A, Amo W, Raga JA, Podest M, Sherwin W (2007) The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). Animal Conservation, **7**: 139–146.

Viricel A, Simon-Bouhet B, Ceyra L, Dulau-Drouot V, Berggren P, Amir OA, Jiddawi NS, Mongin P, Kiszka JJ (2016) Habitat availability and geographic isolation as potential drivers of population structure in an oceanic dolphin in the Southwest Indian Ocean. Marine Biology, 163:219.

Volpi TA (2012) Filogeografia de golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*, Gray, 1828) no litoral brasileiro a partir de marcadores mitocondriais. 92 f. Dissertação (Mestrado em biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 2012.

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.

Zanardo N, Bilgmann K, Parra GJ, Möller LM (2016) Socio-genetic structure of short-beaked common dolphins in southern Australia. Journal of Zoology. Print ISSN 0952-8369.

ANEXOS

Anexo I. Sequências do Oceano Atlântico Norte incluídas nas análises, bem como seus respectivos números de acesso ao GenBank e suas referências.

Citocromo b (Cit-b)		
Localidade	**Número de acesso ao Genbank**	**Referência**
Leste do Oceano Atlântico Norte (Mediterrâneo)	AF084082, AF084081, DQ466024, DQ466023, DQ466022, DQ466021 DQ466020, DQ466018, DQ466017, DQ466016.	Kingston *et al.*, 2009
Região controle do mtDNA (D-loop)		
Localidade	**Número de acesso ao Genbank**	**Referência**
Leste do Oceano Atlântico Norte (Mediterrâneo)	AM498740, AM498739 AM498738, AM498737, AM498736, AM498735, AM498734, AM498733, AM498732, AM498731, AM498730, AM498729, AM498728, AM498727, AM498726, AM498725, AM498724, AM498723, AM498722, AM498721, AM498720, AM498719, AM498718, AM498717, AM498716, AM498715, AM498714, AM498713, AM498712, AM498711, AM498710, AM498709, AM498708, AM498707, AM498706, AM498705, AM498704, AM498703, AM498702, AM498701, AM498700, AM498699, AM498698, AM498697, AM498696, AM498695, AM498694, AM498693, AM498692, AM498691, AM498690, AM498689, AM498688, AM498687, AM498686, AM498685, AM498684, AM498683, AM498682, AM498681, AM498680, AM498679, AM498678, AM498677, AM498676, AM498675, AM498674, AM498673, AM498672, AM498671, AM498670, AM498669, AM498668, AM498667.	Mace *et al.*, 2006 (*Unpublished*) Galov *et al.*, 2008
Oeste do Oceano Atlântico Norte (EUA)	GQ504164, GQ504163, GQ504162, GQ504161, GQ504160, GQ504159, GQ504158, GQ504157, GQ504156, GQ504155, GQ504154, GQ504153, GQ504152, GQ504151, GQ504150, GQ504149.	Amaral *et al.*, 2007