

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS  
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
NÍVEL MESTRADO**

**TAINÃ COELHO QUEVEDO**

**FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DOS CACHALOTES *Physeter  
macrocephalus* Linnaeus, 1758 NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

**SÃO LEOPOLDO**

**2017**

TAINÃ COELHO QUEVEDO

**FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DOS CACHALOTES *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758 NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – Unisinos.

Área de concentração: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Rosa de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati

São Leopoldo

2017

Q5f

Quevedo, Tainã Coelho.

Filogeografia e diversidade genética dos cachalotes *Physeter macrocephalus Linnaeus*, 1758 no Atlântico Sul Ocidental / Tainã Coelho Quevedo. – 2017.

77 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, São Leopoldo, 2017.

“Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Rosa de Oliveira ;  
coorientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati.”

1. Cetáceos. 2. Genética de populações. 3. Odontoceti. I. Título.

CDU 575.17

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Bibliotecária: Bruna Sant’Anna – CRB 10/2360)

TAINÃ COELHO QUEVEDO

**FILOGEOGRAFIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DOS CACHALOTES *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758 NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – Unisinos.

Aprovado em 21 de agosto de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Rosa de Oliveira – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

---

Coorientador Prof. Dr. Victor Hugo Valiati – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

---

Prof. Dr. Marcelo Pereira de Barros – Universidade Feevale

---

Prof. Dr. Salvatore Siciliano – Instituição Oswaldo Cruz/Fiocruz

*À Mariana, por todo seu amor,  
eu dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

À minha mãe Verana por todo seu amor incondicional, paciência, incentivos e dedicação, que me levaram a alcançar tudo que conquistei.

À minha tia Vera por todo seu carinho, amor e apoio durante toda a minha trajetória.

À Mariana, por todo seu amor, compreensão, muita paciência (!!!), dedicação e incentivo, estando sempre ao meu lado me mostrando que “a velocidade de tudo que acontece em cada momento só depende de você”.

À Damião, Verona, Daniela e Sarah, por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus amigos Jackson, Tiago, William, Rafa, Lemos, Mateus, Nayá, Giordano, Cássio e Bruninho, os quais me mostram que “é assim que a vida vale a pena de viver”.

Ao meu pai Eliandro e ao meu irmão Luca, por seu apoio.

À Neusa, Luís Paulo, Ângela e Jean por todo seu carinho e apoio.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa, pela orientação, confiança, dedicação, paciência, tempo e conhecimento disponibilizados.

Ao Prof. Dr. Victor, pela orientação, aconselhamentos, resoluções de problemas e considerações.

Ao Prof. Dr. Mário Josias Müller por todo seu auxílio essencial nas análises e discussões.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pereira de Barros por todo incentivo nesta caminhada, por seus conselhos e pelas considerações da defesa.

Ao Prof. Dr. Salvatore Siciliano pelas considerações da defesa.

Aos amigos formados durante o mestrado em biologia, pela troca de conhecimento, auxílio e companheirismo, em especial à Ana Bezerra, por todos os seus conselhos, conversas e grande amizade, à Daniela Zardo, por toda sua amizade desde o início do mestrado, e à Jéssica Sartor, por toda a prática inicial no laboratório, conversas e amizade. Aos amigos do laboratório de biologia molecular e laboratório de ecologia de mamíferos, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Débora Gasperin, por todo incentivo animador e conhecimento nessa jornada, à Gabriela Kern, por todos os ensinamentos, e à Geise Bernardo e Raquel Diehl, por seu auxílio nas práticas em laboratório e companheirismo.

À Universidade do Vale do Rio dos Sinos pela infraestrutura disponibilizada e à secretária Fernanda Fraga do Programa de Pós-graduação em Biologia por toda disposição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa TAXA/PROSUP.

Aos integrantes dos grupos de pesquisas e organizações não governamentais abaixo mencionados, sem os quais esse trabalho não teria reunido o número de amostras que reuniu, em função de seus esforços de coleta de longo prazo e ao longo da costa brasileira e argentina: Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS), Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Laboratório de Mamíferos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMAQ-UFSC), Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Instituto Aqualie, Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos da Fundação Oswaldo Cruz (GEMM-Lagos & Fiocruz), Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (Aquasis), Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos da Amazônia do Museu Paraense Emílio Goeldi da Universidade Federal do Pará (GEMAM-MPEG) e ao *Laboratorio de Mamiferos Marinos del Centro Nacional Patagónico* (LAMAMA-CENPAT) do Conselho Nacional de Investigações Científicas e Técnicas (CONICET) do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva da Argentina.

Ao Dr. Scott Baker e à Dr.<sup>a</sup> Alana Alexander do *Marine Mammal Institute* da *Oregon State University* pela colaboração de todos os arquivos necessários para a análise comparativa entre a população de cachalotes do Atlântico Sul Ocidental com as demais populações de cachalotes do mundo.

Aos demais amigos, familiares e todos que, de alguma maneira, compartilharam desta caminhada durante o mestrado ao meu lado, mesmo que por um curto espaço de tempo.

*“Os únicos presentes do mar são golpes duros, e às vezes a chance de sentir-se forte. Eu não compreendo muito o mar, mas sei que as coisas são assim por aqui. E também sei como é importante na vida não necessariamente ser forte, mas sentir-se forte. Confrontar-se ao menos uma vez, achar-se ao menos uma vez na mais antiga condição humana, enfrentar a pedra surda e cega a sós, sem outra ajuda além das próprias mãos e da cabeça”.*

**Jon Krakauer**



## RESUMO

Os cachalotes, *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758, são amplamente distribuídos por todos os oceanos do mundo. Todavia, os machos e fêmeas têm diferenças marcadas em seu padrão de distribuição. Globalmente, estudos genéticos, ecológicos e de comportamento vocal comparando populações sugerem a existência de uma forte estrutura social matrilinear com alta filopatria das fêmeas nas regiões tropicais, sendo o fluxo gênico mediado pelos machos. As populações do oceano Atlântico Sul Ocidental (ASO) ainda são tidas como as menos pesquisadas e conhecidas. A fim de identificar possíveis unidades de manejo da espécie na região, o presente estudo apresentou a primeira análise da diversidade genética e a avaliação da potencial estruturação das populações de cachalotes ao longo do ASO, utilizando sequências da região controladora do DNA mitocondrial (DNAMt) de 565 pb obtidas de amostras coletadas na região. Além disso, objetivou-se também estabelecer as relações filogeográficas entre estas populações do ASO e as do resto do mundo. Para a realização deste estudo foram analisadas 58 amostras de cachalotes de três áreas geográficas na costa brasileira (nordeste =15, sudeste =3, sul = 36) e uma da costa argentina (n = 4), e comparadas com 1.577 sequências de outros oceanos, disponíveis publicamente no GenBank (Atlântico = 362, Índico = 159 e Pacífico = 1.056). Além disso, o sexo de 39 espécimes foi determinado molecularmente, a fim de se testar a existência de mais de uma população de cachalotes no ASO, a partir da detecção de fêmeas em áreas além do nordeste brasileiro. A análise das sequências do DNAMt revelou a existência de quatro grupos genéticos e sete haplótipos no ASO. As diversidades haplotípica ( $H_d$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) observadas para a espécie como um todo no ASO foram  $H_d = 0,6824$  e  $\pi = 0,002296$ , respectivamente. Os testes de neutralidade seletiva não sugeriram mudanças significativas no tamanho efetivo e nem expansão populacional recente da espécie no ASO. Os resultados das análises de variância molecular (AMOVA) revelaram que entre 9,14% ( $\Phi_{ST}$ ) e 12,31% ( $F_{ST}$ ) da variação genética observada deve-se a diferenças entre as populações. Contudo, essa diferenciação geográfica só foi significativa entre as populações do nordeste e sudeste-sul do Brasil, as quais possuíam altos índices de fixação entre si (nordeste e sudeste-sul do Brasil:  $F_{ST} = 0,1089$ ;  $\Phi_{ST} = 0,1378$ ; nordeste do Brasil e Argentina:  $F_{ST} = -0,1076$ ;  $\Phi_{ST} = -0,0512$ ; sudeste-sul do Brasil e Argentina:  $F_{ST} = 0,0742$ ;  $\Phi_{ST} = 0,1206$ ;  $P < 0,00001$ ). A população do nordeste do Brasil apresentou a diversidade genética mais baixa do estudo ( $H_d = 0,5128$  e  $\pi = 0,001796$ ), quando comparada com as populações do sudeste-sul ( $H_d = 0,6659$  e  $\pi = 0,002482$ ), e Argentina ( $H_d = 0,8333$  e  $\pi = 0,002043$ ). A costa sudeste-sul do Brasil apresentou três haplótipos exclusivos num total de sete, enquanto a costa da Argentina

apresentou um haplótipo particular. Apenas a região sudeste-sul apresentou um grupo genético exclusivo, sugerindo que a distribuição da variação genética é melhor compreendida com a existência de três grupos ao longo do ASO (nordeste, sudeste-sul e Argentina), os quais seriam considerados diferentes unidades de manejo. Em relação a comparação mundial entre as populações de cachalotes, foram recuperados 39 haplótipos e quatro grupos genéticos, sendo que apenas o oceano Pacífico apresentou um grupo genético exclusivo. A AMOVA revelou que entre 8,89% ( $F_{ST}$ ) e 16,39% ( $\Phi_{ST}$ ) da variação genética observada deve-se a diferenças entre as populações do mundo. A AMOVA indicou que há diferenciação geográfica entre o ASO e os demais oceanos, os quais possuíam altos índices de fixação entre si (ASO e Atlântico Norte:  $F_{ST} = 0,1837$ ;  $\Phi_{ST} = 0,3142$ ; Atlântico Sul Ocidental e Índico:  $F_{ST} = 0,0898$ ;  $\Phi_{ST} = 0,1661$ ; Atlântico Sul Ocidental e Pacífico:  $F_{ST} = 0,1140$ ;  $\Phi_{ST} = 0,0757$ ;  $P < 0,00001$ ). A amostra unificada do oceano ASO não apresentou haplótipos exclusivos. Entretanto, os indivíduos da região sudeste-sul do Brasil compartilharam seis dos seus sete haplótipos com a população do oceano Pacífico. Dos 39 cachalotes com sexo determinado molecularmente nove eram machos e 30 fêmeas, tendo sido encontradas 18 fêmeas na região sul, fora da região tropical, sugerindo que há pelo menos mais de uma população reprodutiva no ASO. Estes resultados, aliados as diferenças de variabilidade genética e ao pouco compartilhamento de haplótipos entre as populações estudadas, sugere que os cachalotes do sudeste-sul do Brasil seriam uma unidade de manejo, potencialmente isolada em termos reprodutivos das demais. Contudo, o DNAm<sub>t</sub> é um marcador matrilinear e apresenta exclusivamente a história evolutiva das fêmeas. Desta forma, a continuidade destes estudos, incluindo novas amostras e marcadores nucleares, será fundamental para a identificação de reais unidades de manejo da espécie no ASO e principalmente em águas brasileiras.

**Palavras-chave:** Cetacea. DNAm<sub>t</sub>. Genética de populações. Odontoceti. Sexagem.

## ABSTRACT

Sperm whales, *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758, are widely distributed throughout the world's oceans. However, males and females have marked differences in their distribution pattern. Worldwide studies on genetics, ecology and vocal behavior comparing populations suggested the existence of a strong matrilineal social structure with female high philopatry in tropical regions, and gene flow mediated by males. The populations of the southwestern Atlantic Ocean (SWA) are still considered the least known and studied. In order to identify possible management units of the species in the SWA, the present study presented the first analysis of the genetic diversity and the evaluation of the potential structuring of the sperm whale populations along the SWA, using sequences from the mitochondrial DNA control region (mtDNA) of 565 bp obtained from samples collected in the region. In addition, it was also aimed to establish the phylogeographic relationships among these SWA populations and those of the rest of the world. Fifty-eight sperm whales from three geographic areas on the Brazilian coast (northeast = 15, southeast = 3, south = 36) and one from the coast of Argentina (n = 4) were analyzed and compared with 1577 sequences from other oceans and available in GenBank (Atlantic = 362, Indian = 159 and Pacific = 1056). In addition, the sex of 39 specimens was molecularly determined in order to find females outside of the northeastern coast of Brazil, which would confirm the existence of more than one sperm whale population in the SWA. The analysis of mtDNA sequences revealed the existence of four genetic groups and seven haplotypes in SWA. The haplotype (Hd) and nucleotide ( $\pi$ ) diversities observed for the species as a whole in SWA were Hd = 0.6824 e  $\pi$  = 0.002296, respectively. The selective neutrality tests did not suggest significant changes in the effective population size or recent population expansion for the species in SWA. The results of the molecular analysis of variance (AMOVA) revealed that between 9.14% ( $\Phi_{ST}$ ) and 12.31% ( $F_{ST}$ ) of the genetic diversity variation observed are due to differences between populations. However, this geographical differentiation was only significant between the populations of northeast and southeast-south Brazil, which had the highest fixation index between them (northeast and southeast-south Brazil:  $F_{ST}$  = 0.1089,  $\Phi_{ST}$  = 0.1378; northeast Brazil and Argentina:  $F_{ST}$  = - 0.1076;  $\Phi_{ST}$  = - 0.0512; southeast-south of Brazil and Argentina:  $F_{ST}$  = 0.0742;  $\Phi_{ST}$  = 0.1206;  $P < 0.00001$ ). The population of northeastern Brazil had the lowest genetic diversity of the study (Hd = 0.5128 and  $\pi$  = 0.001796), when compared to the southeast-south populations (Hd = 0.6659 and  $\pi$  = 0.002482), and Argentina (Hd = 0.8333 and  $\pi$  = 0.002043). The southeast-south coast of Brazil presented three exclusive haplotypes in a total of seven, while the coast of Argentina presented a particular haplotype. Only the

samples from the southeast-south region of Brazil presented an exclusive genetic group, suggesting that the distribution of the genetic variation is better understood with the existence of three groups of sperm whales along the SWA (northeast of Brazil, southeast-south of Brazil and Argentina), which could be considered as different management units. Regarding the worldwide genetic structure of sperm whales, 39 haplotypes and four genetic groups were recovered, and only the Pacific Ocean presented an exclusive genetic group. AMOVA revealed that between 8.89% ( $F_{ST}$ ) and 16.39% ( $\Phi_{ST}$ ) of the observed genetic variation was due to differences among the populations of the world. AMOVA indicated that there is a geographical differentiation between the SWA and the other oceans, which had high indexes of fixation between them (SWA and North Atlantic:  $F_{ST} = 0.1837$ ,  $\Phi_{ST} = 0.3142$ , SWA and Indian Ocean:  $F_{ST} = 0.0898$ ;  $\Phi_{ST} = 0.1661$ ; SWA and Pacific:  $F_{ST} = 0.11140$ ;  $\Phi_{ST} = 0.0757$ ;  $P < 0.00001$ ). The unified sample of the SWA did not present exclusive haplotypes. However, individuals from the southeast-south of Brazil only shared six of seven haplotypes with the population of the Pacific Ocean. From 39 sperm whales with sex molecularly determined, nine were males and 30 females, 18 females were found in the southern region, outside the tropical region, suggesting that there are at least more than one reproductive population in WSA. These results, together with the differences in genetic variability and the lack of sharing of haplotypes among the studied populations, suggest that sperm whales from southeast-south of Brazil would be a management unit, potentially isolated, in reproductive terms, from the others. However, mtDNA is a matrilineal marker and exclusively presents the evolutionary history of females. In this context, the continuity of these studies, including new samples and nuclear markers, will be fundamental for the identification of real units of management of the species in the SWA and particularly in Brazilian waters.

**Keywords:** Cetacea. mtDNA. Genetics of populations. Odontoceti. Sex molecularly.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 Objetivo Geral .....	18
1.1.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 COLETA DE AMOSTRAS .....	19
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA .....	22
2.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTROLADORA DO DNA MITOCONDRIAL.....	22
2.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL.....	23
2.4.1 Estruturação populacional no oceano Atlântico Sul Ocidental .....	23
2.4.2 Estruturação populacional mundial .....	24
2.4.3 Diversidade genética.....	25
2.4.4 Demografia .....	25
2.5 DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO SEXO .....	26
2.5.1 Análise da ocorrência de machos e fêmeas em cada região estudada .....	26
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE CACHALOTE DO OCEANO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL.....	28
3.2 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE CACHALOTE A NÍVEL MUNDIAL, DE BACIA OCEÂNICA E REGIONAL.....	41
3.3 OCORRÊNCIA DE MACHOS E FÊMEAS EM CADA REGIÃO ESTUDADA .....	53
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os cachalotes, *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758, são amplamente distribuídos por todos os oceanos do mundo (DILLON, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999; WHITEHEAD, 2003; WATWOOD *et al.*, 2006), alimentando-se principalmente de cefalópodes em profundidades entre 200 e 2000 m, e ocasionalmente de peixes mesopelágicos (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; CHRISTAL & WHITEHEAD, 2001; WATWOOD *et al.*, 2006). Entretanto, sua distribuição não é contínua, sendo frequentemente associada a frentes oceanográficas, cânions submarinos e alta produtividade primária e secundária (DUFAULT *et al.*, 1999; LYRHOLM *et al.*, 1999).

A espécie é considerada o maior odontoceto (cetáceos com dentes) e possuidora de acentuado dimorfismo sexual, com machos medindo até 18 m de comprimento e possuindo o triplo de biomassa das fêmeas, as quais medem em média 12 m de comprimento (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; DUFAULT *et al.*, 1999; CHRISTAL & WHITEHEAD, 2001; TOLEDO & LANGGUTH, 2009; DEGRATI *et al.*, 2011). O crescimento também é diferente entre os sexos, os machos crescem mais rápido que as fêmeas, acelerando sua taxa de crescimento principalmente no início da puberdade, entre 19 e 20 anos (ou entre 11 e 12 m de comprimento), enquanto as fêmeas diminuem sua taxa de crescimento após a maturidade sexual, a partir dos nove anos de idade (ou entre 8 e 9 m de comprimento) (DUFAULT *et al.*, 1999).

Além das diferenças mencionadas acima, os machos e fêmeas têm diferenças marcadas em seu padrão de distribuição. Acredita-se que a temperatura possa ser o fator mais importante na dispersão das fêmeas e de neonatos, restringindo seus movimentos a um intervalo de 1.000 km da costa, principalmente em águas tropicais (até 30°C) e também subtropicais, sendo raramente encontradas além das latitudes 45-50°N e 40°S (RICE, 1989), formando grupos sociais de longo prazo, enquanto os machos, por sua vez, dispersam-se do seu grupo original geralmente aos seis anos de idade, quando se unem a grupos de machos, diminuindo sua sociabilidade e aumentando o seu percurso migratório ao longo dos anos (DILLON, 1996; LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; LYRHOLM *et al.*, 1999; WHITEHEAD, 2003; TOLEDO & LANGGUTH, 2009). A partir do primeiro período reprodutivo, os machos se tornam solitários e migram em direção aos polos geralmente a partir dos seis anos de idade, onde toleram temperaturas próximas de 0°C, usufruindo de novas áreas e recursos alimentares. Contudo, após a maturação sexual, aos 35-40 anos (BEST, 1970), em cada período reprodutivo eles voltam para seus grupos de origem nos trópicos, mas não permanecem permanentemente

com seu grupo social (DILLON, 1996; LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; DUFAULT *et al.*, 1999; LYRHOLM *et al.*, 1999; MESNICK *et al.*, 2011).

A maior parte da informação histórica existente sobre os cachalotes é oriunda dos dados de capturas das operações baleeiras (MESNICK *et al.*, 2011). A exploração comercial dos grandes cetáceos começou no século XVII e terminou em 1988, com a recomendação da moratória da caça pela Comissão Internacional Baleeira (CIB, do inglês *International Whaling Commission - IWC*) (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; DUFAULT *et al.*, 1999). Nesse período, foram identificadas pela CIB as áreas com maior abundância e frequência de cachalotes (e de outros cetáceos), as quais foram definidas como *stocks* populacionais (DUFAULT *et al.*, 1999). Estes *stocks* referem-se a unidades biológicas, divisões geográficas ou de um ponto de vista comercial, para unidades que podem ser manejadas e utilizadas pelo homem (DILLON, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999). Recentemente em função do desenvolvimento de técnicas não-letais de amostragem (*e.g.* foto-identificação, biópsias de pele, gravação de vocalizações) foi obtida uma melhor compreensão dos padrões de distribuição e estruturação populacional e social dos cachalotes (WHITEHEAD, 2003), bem como dos seus *stocks*, até então somente conhecidos com base nos dados biológicos disponíveis do período da caça (DILLON, 1996; JAQUET, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999).

De modo geral, as populações de cachalote dos oceanos Atlântico Norte e Pacífico como um todo, foram as mais estudadas. Esta última, em função dos interesses privados do Japão e da Rússia em operações baleeiras, recebeu um grande esforço para compreensão de sua estrutura populacional (DILLON, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999). Como resultado foi proposta a existência no oceano Pacífico Norte de três *stocks* populacionais distribuídos longitudinalmente: um a leste (oeste da costa da América do Norte), outro a oeste (leste da costa de Ásia) e outro entre estas duas áreas sem apresentar limites claros, inclusive com a observação de alguns indivíduos se deslocando entre estas regiões (DILLON, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999). Historicamente, as populações do Atlântico Norte eram consideradas como um *stock* único (DILLON, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999). Entretanto, estudos mais recentes encontraram diferenças genéticas significativas em genes mitocondriais entre as populações do Golfo do México, do noroeste do oceano Atlântico, do Mar do Norte e do Mar Mediterrâneo (DROUOT *et al.*, 2004; WHITEHEAD *et al.*, 2012), e também entre as frequências dos genes nucleares (ENGELHAUPT *et al.*, 2009).

Globalmente, estudos genéticos, ecológicos e de comportamento vocal comparando as populações do oceano Pacífico Norte, oceano Atlântico Norte e hemisfério sul (incluindo apenas os oceanos Índico e Antártico, o qual se estende desde a costa da Antártica até à latitude

de 60°S), sugerem a existência de uma forte estrutura social matrilinear com alta filopatria das fêmeas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o fluxo gênico mediado pelos machos, incluindo entre as diferentes bacias oceânicas (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; DUFAULT *et al.*, 1999; LYRHOLM *et al.*, 1999). Além disso, determinadas populações nos oceanos Atlântico norte e Pacífico, poderiam estar isoladas das demais (WHITEHEAD *et al.*, 2012; GERO *et al.*, 2014), como a população do Grande Caribe, a qual apresenta características particulares de dispersão, tamanho de grupo e repertório vocal (GERO *et al.*, 2007; GERO *et al.*, 2014), o que poderia levar ao seu isolamento das demais populações do oceano Atlântico Norte. O mesmo pode estar ocorrendo nas populações do oceano Pacífico Sul, porém ainda não existem informações suficientes sobre as mesmas que sustentariam a hipótese dessas populações estarem reprodutivamente isoladas (DILLON, 1996; DUFAULT *et al.*, 1999; MESNICK *et al.*, 2011).

Recentemente foi descoberta que a espécie apresenta uma baixa diversidade genética, mas com altas diferenças populacionais na região controladora do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) tanto dentro, como entre as bacias oceânicas (ALEXANDER *et al.*, 2016) e no nível do grupo social (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998). Este resultado é um indicativo de uma reduzida dispersão de fêmeas entre regiões geográficas distantes, bem como entre os oceanos ou entre os hemisférios norte e sul no mesmo oceano (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; LYRHOLM *et al.*, 1999; ENGELHAUPT *et al.*, 2009). Por outro lado, diferenças significativas nas frequências alélicas de diferentes *loci* nucleares (6 a 16 microssatélites), foram encontradas somente em populações de locais isolados, como a comparação entre o Mar Mediterrâneo e o Golfo do México (LYRHOLM *et al.*, 1999; ENGELHAUPT *et al.*, 2009) e entre os oceanos (MESNICK *et al.*, 2011), fato que indica um fluxo gênico intermediado pelos machos em cada bacia, mas não ocorrendo migração de machos entre elas. Estudos mais recentes sobre os padrões de dispersão associados com a distribuição e abundância das presas no Golfo de Califórnia (JAQUET *et al.*, 2003), estrutura social no Arquipélago de Galápagos (CHRISTAL & WHITEHEAD, 2001) e cooperação dos clãs vocais (grupos sociais com vocalizações particulares) de cachalotes no oceano Pacífico Sul (RENDELL *et al.*, 2012) determinaram que a configuração do *stock* e a sua variabilidade genética são mais fortemente relacionadas com as diferenças culturais entre os clãs do que com as distâncias geográficas (DUFAULT *et al.*, 1999; RENDELL *et al.*, 2012; WHITEHEAD *et al.*, 2012). Além disso, existem diferenças substanciais entre os oceanos nos dialetos vocais, tamanho do grupo social feminino e proporção de neonatos dentro dos grupos sociais (WHITEHEAD *et al.*, 2012; Gero *et al.*, 2015),



sugerindo que a importância dos grupos sociais femininos na diversidade genética pode variar de acordo com o oceano.

Em função da complexa estrutura social dos cachalotes, da especialização no uso dos recursos, da filopatria das fêmeas e do fluxo gênico mediado pelos machos, seria esperado uma alta diversidade genética como observado em outras espécies de cetáceos com ampla distribuição, como a baleia-fin (*Balaenoptera physalus*) (LYRHOLM *et al.*, 1999; ALEXANDER *et al.*, 2012). No entanto, os estudos genéticos existentes sobre cachalotes identificaram baixa diversidade genética para as populações de todo o mundo (DUFAULT *et al.*, 1999; LYRHOLM *et al.*, 1999; MORIN *et al.*, 2007; ENGELHAUPT *et al.*, 2009; RENDELL *et al.*, 2012; ALEXANDER *et al.*, 2016), fato que foi atribuído provavelmente a uma população mundial muito jovem, tendo sido estimado seu surgimento entre 25.000 e 100.000 anos (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; LYRHOLM *et al.*, 1999; ENGELHAUPT *et al.*, 2009; ALEXANDER *et al.*, 2012). Resultados similares foram observados em orcas (*Orcinus orca*), outra espécie que, apesar de sua ampla distribuição geográfica e complexa estrutura social matrilinear, apresenta baixa diversidade genética e surgimento entre 145.000 e 210.000 anos (HOELZEL *et al.*, 2002).

Durante os últimos 20 anos, esforços de investigação desta espécie aumentaram significativamente como resultado de estudos moleculares e de marcação-recaptura de indivíduos foto-identificados (DUFAULT *et al.*, 1999; ALEXANDER *et al.*, 2016), os quais forneceram informações valiosas sobre a biologia e estrutura social, principalmente no oceano Atlântico Norte e no oceano Pacífico. Por outro lado, a situação das populações de cachalotes das demais regiões é quase totalmente ignorada. Recentemente, Alexander *et al.* (2016) publicaram um extenso estudo sobre a diversidade genética global da espécie, incluindo marcadores nucleares (13 *loci* de microssatélites) e extranucleares (394 pb da região controladora do DNAm) de praticamente todos os oceanos do mundo. Contudo, os autores não possuíam nenhuma amostra da região do oceano Atlântico Sul Ocidental (porção sul do oceano Atlântico que banha a América do Sul) e não incluíram nenhuma amostra do Pacífico Sul Oriental (Peru e Chile) em suas análises. Neste sentido, as populações do oceano Atlântico Sul Ocidental ainda são as menos pesquisadas e conhecidas da espécie. Com base exclusivamente na aparente descontinuidade geográfica, foi proposta a existência de dois *stocks* populacionais na região: um na costa leste da América do Sul e o outro na costa oeste da África (DUFAULT *et al.*, 1999). No entanto, esta proposta é baseada em evidências bastante limitadas do ponto de vista biológico e não considera, por exemplo, a possibilidade da existência de uma estruturação

ao longo da costa atlântica da América do Sul, visto a ocorrência dos registros da espécie ao longo de toda a costa brasileira (OTT *et al.*, 2009; OTT *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2017).

No Brasil, os dados sobre a espécie datam do período de caça às baleias durante meados do século XX, quando estações baleeiras ainda estavam operantes em Cabo Frio (Rio de Janeiro) e Costinha (Paraíba) (RAMOS *et al.*, 2001; ANDRIOLO *et al.*, 2010). Estudos recentes sobre a presença de cachalotes são escassos e avaliações das suas populações foram feitas somente com base em eventos de encalhe ao longo da costa brasileira (RAMOS *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2008; SICILIANO *et al.*, 2008; MEIRELLES *et al.*, 2009). Como resultado, sugeriu-se a existência de padrões sazonais e espaciais destes encalhes, os quais ocorreriam com maior frequência entre julho e agosto para latitudes mais altas (entre 18-25°S) e entre janeiro e abril nas latitudes mais baixas (entre 7-3°S) (RAMOS *et al.*, 2001; MEIRELLES *et al.*, 2009; TOLEDO & LANGGUTH, 2009). Townsend (1935) publicou quatro mapas transcritos de livros de registro de embarcações de baleias pelágicas norte-americanas datados de 1761 a 1920, com as localizações de mais de 50.000 capturas de quatro espécies de baleias, sendo que 36.908 destas eram cachalotes. Os dados apresentam duas concentrações de cachalotes, sendo uma na região sudeste-sul e outra na região nordeste, exibindo uma possível população de cachalotes fêmeas fora da região tropical de distribuição (Apêndice A e B).

Neste sentido, é evidente a lacuna no conhecimento sobre o padrão de distribuição espacial e estruturação populacional, bem como sobre os aspectos básicos da biologia e ecologia desta espécie no Brasil e no oceano Atlântico Sul Ocidental. O Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio dos Planos de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos (ICMBio, 2011a; 2011b), destacou como ações prioritárias a identificação de unidades de manejo da espécie.

Desta forma, o presente trabalho é o primeiro estudo genético que visa avaliar a distribuição da variabilidade genética e testar a potencial estruturação das populações de *P. macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental. Para tanto, avaliou-se a diversidade genética e a potencial estruturação das populações de cachalotes ao longo da costa brasileira e da costa argentina, a fim de identificar possíveis unidades de manejo da espécie. Além disso, este estudo procurou estabelecer as relações filogeográficas entre as populações de cachalote que habitam as águas do Brasil e Argentina com as demais populações do mundo. Espera-se que as informações produzidas neste estudo forneçam subsídios para o planejamento de medidas de proteção mais realistas nas áreas de ocorrência da espécie, principalmente na costa brasileira.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição da variabilidade genética das populações de *Physeter macrocephalus* ao longo do oceano Atlântico Sul Ocidental, estabelecendo as relações filogeográficas entre estas populações, e também com as populações mundiais.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar a variabilidade genética das populações do oceano Atlântico Sul Ocidental de *P. macrocephalus* utilizando um marcador molecular extranuclear (região controladora do DNA mitocondrial);
- Verificar a existência de estruturação geográfica nas populações de *P. macrocephalus* ao longo da costa do oceano Atlântico Sul Ocidental;
- Testar a hipótese de que há estruturação populacional norte-nordeste e sudeste-sul de *P. macrocephalus* na costa do Brasil;
- Testar se existe estruturação geográfica suficiente para proposição de unidades de manejo de *P. macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental;
- Avaliar se existem evidências de expansão populacional de *P. macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental;
- Examinar a existência de fêmeas de *P. macrocephalus* fora da região tropical (nordeste do Brasil), o que corroboraria a potencial existência de mais de uma população reprodutiva de cachalotes no oceano Atlântico Sul Ocidental e;
- Estabelecer as relações entre as populações de *P. macrocephalus* no Brasil, com as demais populações do oceano Atlântico Sul Ocidental e de outros oceanos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DE AMOSTRAS

Para a realização deste estudo foram analisadas 58 amostras de tecido de cachalotes (Tabela 2), *Physeter macrocephalus*, previamente coletadas entre 1986 e 2016 por instituições colaboradoras do projeto e que abrangem três áreas geográficas na costa brasileira e também a costa argentina (Figura 1) durante 30 anos de amostragem (Apêndice C). As amostras de tecido da costa do Rio Grande do Sul foram obtidas a partir de biópsias de animais vivos e cedidas pelo Instituto Aqualie (n = 17) (amostrados na zona do talude entre os anos de 2011 e 2012) e animais mortos em monitoramentos costeiros pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS) (n = 8) entre os anos de 1999 a 2016 e pelo Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha (EcoMega) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (n = 8) entre os anos 2009 e 2012. As amostras da costa do Rio de Janeiro foram obtidas pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos ligado à Fundação Oswaldo Cruz (GEMM-Lagos & Fiocruz) (n = 2) nos anos de 1999 a 2005 e pelo Museu Nacional ligado à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (n = 1) no ano de 1999 a partir de espécimes mortos. No nordeste do Brasil as amostras foram obtidas pela Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (Aquasis) na costa do Ceará (n = 14), entre os anos de 2005 e 2012, também a partir de espécimes mortos e encalhados. Na costa de Santa Catarina, as amostras de espécimes encalhados mortos foram obtidas pelo Laboratório de Mamíferos Aquáticos (LAMAQ) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (n = 1) em 1989 e pelo Laboratório de Nectologia da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) (n = 2) nos anos de 2013 e 2016. Na costa da Bahia, a única amostra obtida foi no ano de 2016 pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS). Na costa da Argentina, o Laboratório de Mamíferos Marinhos (LAMAMA) do Centro Nacional Patagônico (CENPAT), ligado ao Conselho Nacional de Investigações Científicas e Técnicas (CONICET) do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva da Argentina, obteve entre os anos de 1986 e 2014 quatro espécimes encalhados mortos. Todas as amostras continham aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de tecido e foram preservadas em álcool 70%.

**Tabela 2.** Relação de amostras cedidas pelas respectivas instituições. N: número de amostras.

<b>Região de Coleta</b>	<b>Localidade</b>	<b>Instituição</b>	<b>Acrônimo da coleção</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>N</b>
Nordeste do Brasil	Ceará	Aquasis <sup>1</sup>	AQUASIS	Encalhe	14
	Bahia	GEMARS <sup>2</sup>	BAH	Encalhe	1
Sudeste do Brasil	Rio de Janeiro	Fiocruz <sup>3</sup>	GEMM-Lagos	Encalhe	2
	Rio de Janeiro	UFRJ <sup>4</sup>	MN	Encalhe	1
	Santa Catarina	UFSC <sup>5</sup>	UFSC	Encalhe	1
Sul do Brasil	Santa Catarina	UNIVILLE <sup>6</sup>	PM	Encalhe	2
	Rio Grande do Sul	FURG <sup>7</sup>	FURG	Encalhe	8
	Rio Grande do Sul	GEMARS <sup>2</sup>	GEMARS	Encalhe	8
	Rio Grande do Sul	Instituto Aqualie	IA	Biópsia	17
Argentina	Argentina	CENPAT <sup>8</sup>	CENPAT	Encalhe	4

<sup>1</sup>Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos

<sup>2</sup>Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup>Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos ligado à Fundação Oswaldo Cruz

<sup>4</sup>Museu Nacional ligado à Universidade Federal do Rio de Janeiro

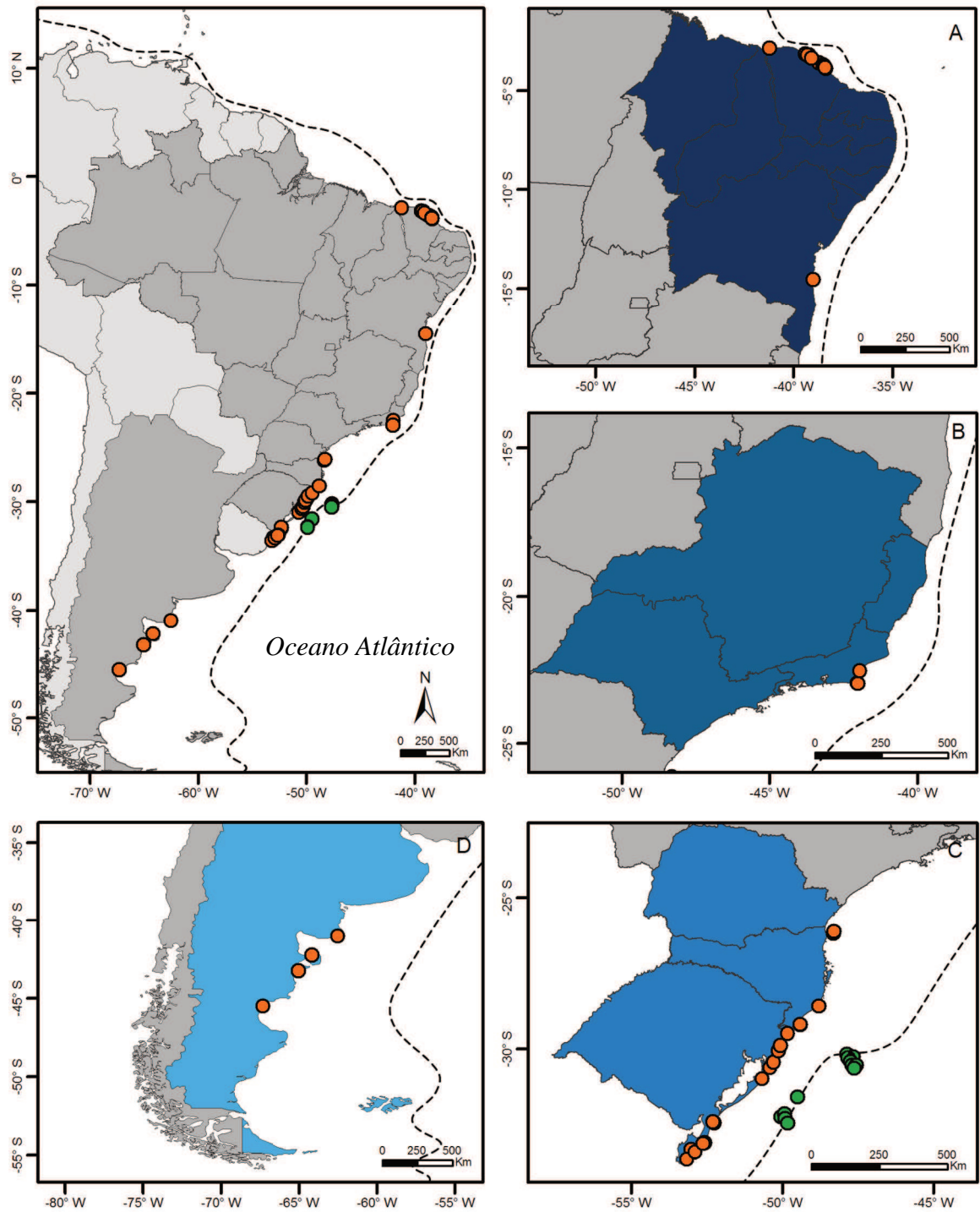
<sup>5</sup>Laboratório de Mamíferos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina

<sup>6</sup>Laboratório de Nectologia da Universidade da Região de Joinville

<sup>7</sup>Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande

<sup>8</sup>Laboratório de Mamíferos Marinhos do Centro Nacional Patagônico ligado ao Conselho Nacional de Investigações Científicas e Técnicas do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva da Argentina

Para a realização do mapa de distribuição das amostras da espécie no oceano Atlântico Sul Ocidental, as coordenadas geográficas informadas pelos coletores foram importadas para o programa ArcGIS versão 10.5 contendo os dados de batimetria obtidos por meio do modelo ETOPOS-1 (modelo de relevo oceanográfico global).



**Figura 1.** Mapa das regiões de coleta de amostras de tecido de *Physeter macrocephalus* ao longo do oceano Atlântico Sul Ocidental. Círculos laranjas: espécimes encontrados mortos na costa. Círculos verdes: biópsias de espécimes vivos na região do talude. Tracejado: limite batimétrico da região de talude ao longo do oceano Atlântico. A: Amostras de encalhes coletadas na região nordeste do Brasil. B: Amostras de encalhe coletadas na região sudeste do Brasil. C: Amostras de encalhes coletadas na região sul e de biópsias coletadas na região do

talude do Rio Grande do Sul. D: Amostras de encalhe coletadas na costa patagônica da Argentina.

Todas as análises moleculares foram executadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o protocolo de diluição do Thermo Scientific™ Phire™ Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), o protocolo padrão do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), e o método fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

## 2.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTROLADORA DO DNA MITOCONDRIAL

Foram desenhados dois *primers* novos e específicos para *Physeter macrocephalus* por meio dos programas MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0, Unipro Ugene versão 1.26 e Primer3web versão 4.0.0, utilizando sequências da espécie previamente depositadas no GenBank. O *primer* senso foi chamado PhyM\_F (5' AGAGTTACGCCTCCCTAAGAC 3'), enquanto o *primer* anti-senso foi intitulado PhyM\_R2 (5' AAACGACCAGATGCCTATAAC 3'), amplificando um fragmento de 654 pb da região controladora do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>). A região amplificada é indicada para análises filogeográficas em escala de tempo microevolutivas, pois apresenta uma taxa de substituição extremamente rápida e alto nível de polimorfismo intraespecífico (AVISE, 1994).

As reações para amplificação da região alvo foram realizadas via reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume final de 25 µl (sendo 3 µl de DNA genômico com concentração de pelo menos 20 ng/µl) sob as seguintes concentrações: 1x de GoTaq® Green Master Mix (Promega Biotecnologia do Brasil Ltda.); 0,4 mM de cada *primer*; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>.

As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores, seguindo as condições dos *primers* desenhados, consistindo em uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por cinco minutos; 38 ciclos de um minuto de desnaturação a 94°C, um minuto de anelamento a 60°C e um minuto de extensão a 72°C; seguidos de um período de 10 minutos de extensão final a 72°C. Uma pequena alíquota do produto de PCR (3 µl) foi utilizada para a verificação do resultado das amplificações, por meio de comparação com um marcador de tamanho molecular utilizado

como referência quando submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com tampão Tris-Boro-EDTA 1x, sendo corados com GelRed™ (Biotium) e visualizados em transluminador ultravioleta. No caso de ampliações de boa qualidade (*i.e.* somente um fragmento e rendimento adequado de aproximadamente 20 ng/μl), o restante do volume da reação de PCR foi purificado por meio da incubação com as enzimas Thermo Scientific™ Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific Inc.) e Thermo Scientific™ FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific Inc.) a fim de remover iniciadores remanescentes e nucleotídeos não incorporados. Os amplicons da região controladora do DNAm<sub>t</sub> foram lidos em ambas as direções no sequenciador automático na empresa coreana Advancing through Genomics Macrogen Inc..

## 2.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO DNA MITOCONDRIAL

As sequências nucleotídicas de 565 pb obtidas foram avaliadas pela visualização dos cromatogramas, editadas manualmente quando necessário, e alinhadas usando o algoritmo *ClustalW* no programa MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0. Foram obtidas as informações genéticas de 58 indivíduos de *Physeter macrocephalus* oriundas de encalhes e biópsias coletadas no oceano Atlântico Sul Ocidental, ao longo da costa do Brasil e da Argentina.

### 2.4.1 Estruturação populacional no oceano Atlântico Sul Ocidental

O grau de subdivisão (estruturação) existente entre as populações no Atlântico Sul Ocidental foi avaliado utilizando o programa Baps versão 6.0 que utiliza uma abordagem bayesiana para inferir estruturação genética populacional assumindo que os dados investigados representam uma mistura de  $k$  subpopulações. O modelo pressupõe que as subpopulações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e tenta gerar  $k$  grupos de indivíduos de modo que aqueles alocados no mesmo grupo se assemelhem geneticamente tanto quanto possível. Neste programa foi testada a possibilidade de existência de até 20 populações ( $k = 2$  até  $k = 20$ ) dentro do Atlântico Sul Ocidental, sendo que para cada valor de  $k$  foram realizadas 10 corridas independentes de 1.000.000 de interações MCMC, precedidas de *burn-in* de igual magnitude. O módulo utilizado foi o *Genetic mixture analysis with sequences or linked loci*.

Adicionalmente, o programa Arlequin versão 3.5.2.2 foi utilizado para a análise da estruturação populacional por meio de dois estimadores: o primeiro usando apenas a frequência



dos haplótipos encontrados em cada população ( $F_{ST}$ ; WEIR & COCKERHAM, 1984); e o segundo calculado pela frequência e o número de diferenças nucleotídicas existentes entre cada par de haplótipos considerados ( $\Phi_{ST}$ ; TAMURA & NEI, 1993). No mesmo programa, a distribuição geográfica dos haplótipos foi investigada através da análise de variância adaptada para dados moleculares (AMOVA). Esta análise permitiu identificar o quanto da variação existente na espécie é devido a variações dentro das populações e o quanto é decorrente de uma estruturação geográfica, ou seja, de variações entre as populações. Todas as análises foram realizadas com 10.000 permutações para a significância, valor de significância estatística  $P < 0,05$ , e computando as estatísticas  $F$  sobre as frequências dos haplótipos. Três cenários de subdivisão amostral ao longo do Atlântico Sul Ocidental foram adotados levando em consideração primeiramente o local da coleta.

Desta forma o cenário amostral inicial considerou a existência de cinco populações no Atlântico Sul Ocidental: Argentina ( $n = 4$ ), nordeste do Brasil ( $n = 13$ ), sudeste do Brasil ( $n = 3$ ), sul do Brasil (região costeira) ( $n = 21$ ) e sul do Brasil (talude) ( $n = 17$ ). Os espécimes amostrados na região sul do Brasil foram designados *a priori* como pertencentes a zona costeira (encalhes) e talude (biópsias). Desta forma, foi adotado este cenário populacional para que se pudesse testar a frequência dos grupos genéticos ao longo da distribuição da espécie no Atlântico Sul Ocidental. O segundo cenário para as análises de estruturação populacional *a posteriori* seguiram o cenário de subdivisão populacional resultante das análises exploratórias do programa Baps versão 6.0 (ver resultados). E o terceiro e último cenário para avaliação da estrutura populacional no Atlântico Sul Ocidental procurou testar a existência de estruturação latitudinal norte-nordeste e sudeste-sul ao longo da costa brasileira.

As relações entre as populações do Atlântico Sul Ocidental foram avaliadas por meio da geração de uma rede de haplótipos pelo programa PopArt (*Population Analysis with Reticulate Trees*) versão 1.7, através do algoritmo de TCS, o qual tem sido usado para análises de nível populacional quando as divergências são baixas (GEORGIADIS *et al.*, 1994; ROUTMAN *et al.*, 1994; GERBER & TEMPLETON, 1996; HEDIN, 1997; SCHAAL *et al.*, 1998; VILÁ *et al.*, 1999; GÓMEZ-ZURITA *et al.*, 2000).

#### **2.4.2 Estruturação populacional mundial**

Para as análises a nível oceânico e mundial, a fim de se estabelecer as relações entre as populações da espécie dentro do oceano Atlântico Sul Ocidental e as demais populações de outras bacias oceânicas, as 58 sequências obtidas neste estudo foram ajustadas para um consenso menor com apenas 380 pb alinhados e comparadas com 1.577 sequências publicadas anteriormente (ALEXANDER *et al.*, 2016) e disponíveis publicamente no banco de sequências GenBank, sendo que destas, 1.231 sequências foram utilizadas nas análises a nível regional (Apêndice D).

Para a avaliação da estruturação populacional entre as bacias oceânicas do Atlântico Sul Ocidental, Atlântico Norte, Pacífico e Índico foi também utilizado o programa Arlequin versão 3.5.2.2 pelos mesmos estimadores mencionados acima: a frequência dos haplótipos encontrados em cada população ( $F_{ST}$ ; WEIR & COCKERHAM, 1984); e a frequência de diferenças nucleotídicas existentes entre cada par de haplótipos considerados ( $\Phi_{ST}$ ; TAMURA & NEI, 1993).

A análise da variância molecular (AMOVA) foi utilizada para estimar a porcentagem da variação genética observada que se deve a diferenças dentro e entre as populações mundiais também com o auxílio do programa Arlequin versão 3.5.2.2.

A relação filogenética entre as populações do Atlântico Sul Ocidental e as demais populações do mundo foi estimada através da geração de uma rede de haplótipos pelo programa PopArt (*Population Analysis with Reticulate Trees*) versão 1.7, através do algoritmo TCS. Os resultados gerados foram comparados com a rede de haplótipos de Alexander *et al.* (2016).

### **2.4.3 Diversidade genética**

A diversidade haplotípica ( $H_d$ ) e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foram calculadas com o auxílio do programa DnaSP versão 5.10.1 para cada região amostral do Atlântico Sul Ocidental definida após a análise de estruturação populacional, para cada oceano e para a espécie como um todo.

### **2.4.4 Demografia**

A fim de se detectar sinais de expansão populacional da população do oceano Atlântico Sul Ocidental como um todo e em suas subdivisões, além das outras bacias oceânicas, foram realizados os testes de neutralidade D de Tajima (1989) e  $F_s$  de Fu (1996) no programa Arlequin versão 3.5.2.2, sendo a significância calculada através de 10.000 simulações. Em adição, foi realizado o teste de *Mismatch Distribution* no programa DnaSP versão 5.10.1.

## 2.5 DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO SEXO

A determinação do sexo dos indivíduos amostrados foi realizada geneticamente via amplificação de regiões específicas dos cromossomos X e Y de mamíferos (Page *et al.*, 1987). A amplificação da região SRY no cromossomo Y dos machos foi realizada usando os *primers* SRY-R (5' CATTGTGTGGTCTCGTGATC 3') e SRY-F (5' AGTCTCTGTGCCTCCTCGAA 3') (Richard *et al.*, 1994) gerando um fragmento de 152 pb. A amplificação do cromossomo X utilizou os *primers* P1-5EZ (5' ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT 3') e P2-3EZ (5' GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT 3') descritos por Aasen & Medrano (1990), visando amplificar um fragmento de 442 pb presente no íntron Zfx tanto em machos como em fêmeas.

As reações para amplificação das regiões alvos foram realizadas em um volume final de 11  $\mu$ l (sendo 1  $\mu$ l de DNA genômico com concentração de pelo menos 20 ng/ $\mu$ l) sob as seguintes concentrações: 0,9x de High Fidelity Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.); 2,27 mM de  $MgCl_2$ ; 0,36  $\mu$ M de cada primer; 0,18 mM de dNTPs; 0,25 U de Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific Inc.).

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores, consistindo de uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por três minutos; 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento 58°C e um minuto de extensão a 72°C; seguidos de um período de 10 minutos de extensão final a 72°C. Uma pequena alíquota do produto de PCR (5  $\mu$ l) foi utilizada para a verificação do resultado das amplificações, por meio de comparação com um marcador de tamanho molecular utilizado como referência quando submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,6% com tampão Tris-Boro-EDTA 1x, sendo corados com GelRed™ (Biotium) e visualizados em transluminador ultravioleta.

### 2.5.1 Análise da ocorrência de machos e fêmeas em cada região estudada

Em função dos cachalotes machos e fêmeas apresentarem diferenças marcadas em seu padrão de distribuição espacial, onde as fêmeas e neonatos restringem seus movimentos principalmente até os 30°C, mas podendo chegar entre as latitudes 45-50°N e 40°S, enquanto

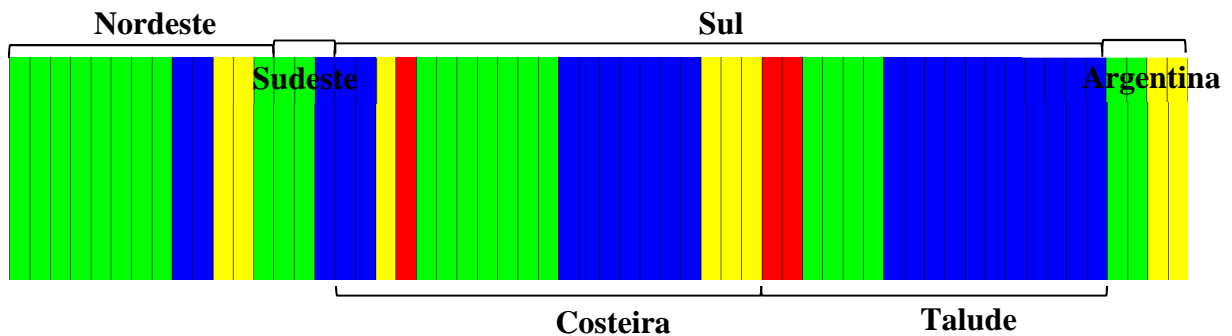
os machos, por sua vez, dispersam-se do seu grupo original, chegando até os polos (DILLON, 1996; LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; LYRHOLM *et al.*, 1999; WHITEHEAD, 2003; TOLEDO & LANGGUTH, 2009), espera-se encontrar uma maior frequência de fêmeas adultas e neonatos de ambos os sexos na região tropical da distribuição da espécie, o que corresponderia a região nordeste da amostragem deste estudo. Contudo, devido a existência de padrões sazonais e espaciais de enalhes diferenciados entre latitudes mais altas (entre 18-25°S) e latitudes mais baixas (entre 7-3°S) (RAMOS *et al.*, 2001; MEIRELLES *et al.*, 2009; TOLEDO & LANGGUTH, 2009), a concentração de cachalotes na região sudeste-sul e nordeste (TOWNSEND, 1935), e a fim de se testar a existência de uma segunda população reprodutiva de cachalotes, a qual poderia estar reprodutivamente isolada das demais e ser considerada uma potencial unidade de manejo, calculou-se a frequência de fêmeas e machos em cada área amostrada dentro do Atlântico Sul Ocidental. Para que essa hipótese seja confirmada espera-se detectar fêmeas adultas e neonatos de ambos os sexos também em áreas além do nordeste brasileiro.

A definição dos adultos e neonatos foi feita utilizando as medidas de comprimento total disponíveis na literatura, sendo classificados como neonatos os espécimes com comprimento total menor que 4 metros (SHIRIHAI & JARRETT, 2006).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE CACHALOTE DO OCEANO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL

A diversidade genética das sequências de DNA da região controladora foi avaliada em um fragmento de 565 pb alinhados em um total de 58 indivíduos da costa brasileira ( $n = 54$ ) e da costa argentina ( $n = 4$ ). Foram encontrados 6 sítios polimórficos (83,3% de transições e 16,7% de transversões), que determinaram 7 haplótipos no oceano Atlântico Sul Ocidental. A análise do programa Baps sugeriu a existência de estruturação genética com quatro grupos genéticos ( $k = 4$ ) (Figura 2). Como mencionado nos métodos, os espécimes coletados na região sul do Brasil foram designados *a priori* como pertencentes a zona costeira (encalhes) e talude (biópsias). Desta forma, foi adotado este cenário populacional para que se pudesse testar a frequência dos grupos genéticos ao longo da distribuição da espécie no Atlântico Sul Ocidental.



**Figura 2.** Atribuição dos grupos genéticos ( $k = 4$ ) sugerida pelo programa Baps aos 58 indivíduos com base em sequências da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental nas regiões de coleta. As barras verticais indicam cada indivíduo e a cor de cada barra representa o grupo genético ( $k$ ) em que o indivíduo foi atribuído. Cor vermelha: Grupo 1. Cor verde: Grupo 2. Cor azul: Grupo 3. Cor amarela: Grupo 4. As barras verticais que indicam cada indivíduo estão na seguinte ordem: AQUASIS 02C0410/530, AQUASIS 02C0412/307, AQUASIS 02C0410/281, AQUASIS 02C0410/308, AQUASIS 02C0410/338, AQUASIS 02C0412/348, AQUASIS 02C0412/434, AQUASIS 02C0410/495, AQUASIS 02C0410/532, AQUASIS 02C0411/564, AQUASIS 02C0412/280, AQUASIS 02C0410/477, AQUASIS 02C0411/542, AQUASIS 02C0410/303, BAH 1 (região nordeste); GEMM-Lagos 001, MN-UFRJ 54999, GEMM-Lagos 092 (região sudeste); UFSC

1080, PM 985, PM 512, FURG 19, FURG 21, GEMARS 0803, FURG 20, GEMARS 0570, FURG 14, GEMARS 1377, FURG 15, GEMARS 0941, FURG 16, GEMARS 1267, GEMARS 1275, GEMARS 1427, FURG 18, FURG 17, GEMARS 1274 (região sul (costeira)); IA 1221, IA 1223, IA 1232, IA 1231, IA 1227, IA 1230, IA 1229, IA 1228, IA 1226, IA 1224, IA 006, IA 1222, IA 001, IA 002, IA 005, IA 1225, IA 004 (região sul (talude)); CENPAT 2, CENPAT 5, CENPAT 3, CENPAT 6 (Argentina).

A análise da variância molecular (AMOVA) indicou que não há uma alta diferenciação entre as cinco populações determinadas *a priori* pela região de coleta, uma vez que apenas 5,75% da variação total foi explicada por essas diferenças (Tabela 3). Com relação as análises de estruturação populacional avaliadas pelo índice de fixação de Wright, também não foi encontrada uma diferenciação significativa, visto que apenas 7,39% da variação foi explicada entre todas as populações sugeridas analisadas par a par.

**Tabela 3.** Análise da variância molecular (AMOVA) baseada nos valores de fixação ( $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ) para a região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental entre as regiões de coleta. Os valores obtidos não foram significativos para  $P < 0,05$ .

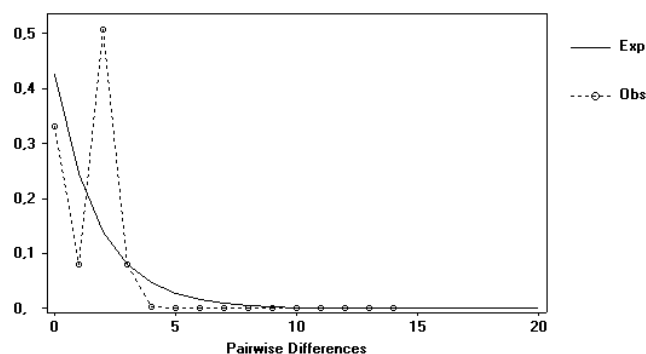
Fonte de variação	DNAm <sup>t</sup>	
	$F_{ST}$ (%)	$\Phi_{ST}$ (%)
Entre as populações	7,39	5,75
Dentro das populações	92,61	94,25

Quando comparados os valores pareados entre as populações estabelecidas *a priori* de acordo com a região de coleta, estes valores não foram significativos, tanto para o  $F_{ST}$  quanto para o  $\Phi_{ST}$ , sendo encontrada diferenciação genética considerada significativa apenas entre as populações do nordeste do Brasil e da região do talude do Rio Grande do Sul do Brasil (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise pareada das estatísticas  $F$  da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* do oceano Atlântico Sul Ocidental entre as regiões de coleta. Diagonal superior  $\Phi_{ST}$  e diagonal inferior  $F_{ST}$ . Valores significativos para  $P < 0,05$  estão em negrito.

População	Argentina	Nordeste do Brasil	Sudeste do Brasil	Sul do Brasil (costeira)	Sul do Brasil (talude)
Argentina	-	-0,1076	-0,1473	0,0095	0,1999
Nordeste do Brasil	-0,0512	-	-0,1796	0,0664	<b>0,2117</b>
Sudeste do Brasil	-0,1358	-0,1796	-	-0,1150	-0,0339
Sul do Brasil (costeira)	0,0475	0,0920	-0,0968	-	0,0134
Sul do Brasil (talude)	0,2151	<b>0,2395</b>	0,0189	-0,0040	-

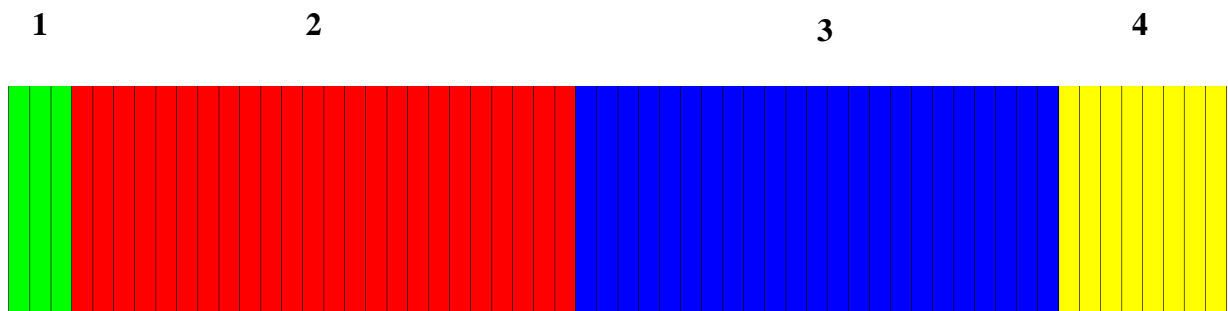
A diversidade haplotípica do oceano Atlântico Sul Ocidental (ASO) como um todo foi de  $Hd = 0,6824$  ( $\sigma = 0,0370$ ), enquanto a nucleotídica foi de  $\pi = 0,002296$  ( $\sigma = 0,001592$ ). Os testes de neutralidade seletiva  $D$  de Tajima ( $0,1563$ ;  $P = 0,5277$ ) e  $F_s$  de Fu ( $-0,7172$ ;  $P = 0,4129$ ) não sugerem mudanças significativas no tamanho e nem expansão populacional recente da espécie como um todo no oceano Atlântico Sul Ocidental. A análise de *Mismatch Distribution* unimodal evidencia que não houve expansão populacional recente no oceano Atlântico Sul Ocidental como um todo (Figura 3).



**Figura 3.** Gráfico da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças par a par do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental. Exp: Expectativa. Obs: Observado.

Conforme os resultados observados acima foram estabelecidos quatro grupos populacionais de acordo com as cores representadas na Figura 2 dentro do Atlântico Sul Ocidental, os quais não possuíam limites geográficos estabelecidos (Figura 4): **Grupo 1**

formado por biópsias e encalhes exclusivamente do Rio Grande do Sul (IA 1221, IA 1223, FURG 19); **Grupo 2** composto por biópsias e encalhes do sul do Brasil, encalhes do nordeste, sudeste e Argentina (AQUASIS 02C0410/530, IA 1232, AQUASIS 02C0412/307, AQUASIS 02C0410/532, AQUASIS 02C0411/542, IA 1231, AQUASIS 02C0410/281, AQUASIS 02C0410/308, AQUASIS 02C0410/338, AQUASIS 02C0412/348, AQUASIS 02C0412/434, AQUASIS 02C0410/495, GEMARS 0803, CENPAT 2, CENPAT 5, BAH 1, FURG 20, GEMM-Lagos 001, GEMARS 0570, FURG 14, GEMARS 1377, IA 1227, IA 1230, MN-UFRJ 54999); **Grupo 3** formado por biópsias e encalhes do sul do Brasil, encalhes de sudeste e nordeste (IA 1229, IA 1228, IA 1226, IA 1224, IA 006, IA 1222, IA 001, IA 002, AQUASIS 02C0410/303, IA 005, IA 1225, UFSC 1080, FURG 21, AQUASIS 02C0411/564, FURG 15, GEMM-Lagos 092, GEMARS 0941, FURG 16, GEMARS 1267, GEMARS 1275, GEMARS 1427, IA 004, PM 985); e **Grupo 4** formado por encalhes do sul e nordeste do Brasil e Argentina (FURG 18, FURG 17, AQUASIS 02C0412/280, AQUASIS 02C0410/477, CENPAT 3, CENPAT 6, GEMARS 1274, PM 512).



**Figura 4.** Atribuição dos grupos genéticos ( $k = 4$ ) sugerida pelo programa Baps aos 58 indivíduos com base em sequências da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental nas regiões de coleta. As barras verticais indicam cada indivíduo e a cor de cada barra representa o grupo genético ( $k$ ) em que o indivíduo foi atribuído. As barras verticais que indicam cada indivíduo estão na seguinte ordem: Cor verde (Grupo 1): IA 1221, IA 1223, FURG 19; Cor vermelha (Grupo 2): AQUASIS 02C0410/530, IA 1232, AQUASIS 02C0412/307, AQUASIS 02C0410/532, AQUASIS 02C0411/542, IA 1231, AQUASIS 02C0410/281, AQUASIS 02C0410/308, AQUASIS 02C0410/338, AQUASIS 02C0412/348, AQUASIS 02C0412/434, AQUASIS 02C0410/495, GEMARS 0803, CENPAT 2, CENPAT 5, BAH 1, FURG 20, GEMM-Lagos 001, GEMARS 0570, FURG 14, GEMARS 1377, IA 1227, IA 1230, MN-UFRJ 54999; Cor azul (Grupo 3): IA 1229, IA 1228, IA 1226, IA 1224, IA 006, IA 1222, IA 001, IA 002, AQUASIS 02C0410/303, IA 005, IA 1225, UFSC 1080, FURG 21, AQUASIS 02C0411/564, FURG 15, GEMM-Lagos 092,



GEMARS 0941, FURG 16, GEMARS 1267, GEMARS 1275, GEMARS 1427, IA 004, PM 985; Cor amarela (Grupo 4): FURG 18, FURG 17, AQUASIS 02C0412/280, AQUASIS 02C0410/477, CENPAT 3, CENPAT 6, GEMARS 1274, PM 512.

Uma AMOVA usando o novo cenário de quatro grupos genéticos proposto pelo programa Baps indicou que entre estes novos grupos genéticos há uma grande diferenciação (95%) (Tabela 5), diferentemente do cenário anterior quando as cinco populações determinadas *a priori* pela região de coleta foi testada. Entretanto, estes grupos genéticos (exceto o Grupo 1, formado por indivíduos apenas da região sul), estão presentes em mais de uma população estabelecida *a priori*, sendo difícil atribuir a um padrão geográfico de populações as diferenças genéticas encontradas. Além disso, as distâncias genéticas pareadas entre os grupos geneticamente formados foram todas significativas, tanto para o  $F_{ST}$  quanto para o  $\Phi_{ST}$  (Tabela 6).

**Tabela 5.** Análise da variância molecular (AMOVA) baseada nos valores de fixação ( $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ) para a região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental entre os grupos genéticos. Todos os valores obtidos foram significativos para  $P < 0,05$ .

Fonte de variação	DNAm <sub>t</sub>	
	$F_{ST}$ (%)	$\Phi_{ST}$ (%)
Entre as populações	95,06	95,06
Dentro das populações	4,93	4,93

**Tabela 6.** Análise pareada das estatísticas  $F$  da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* do oceano Atlântico Sul Ocidental entre os grupos genéticos. Diagonal superior  $\Phi_{ST}$  e diagonal inferior  $F_{ST}$ . Valores significativos para  $P < 0,05$  estão em negrito.

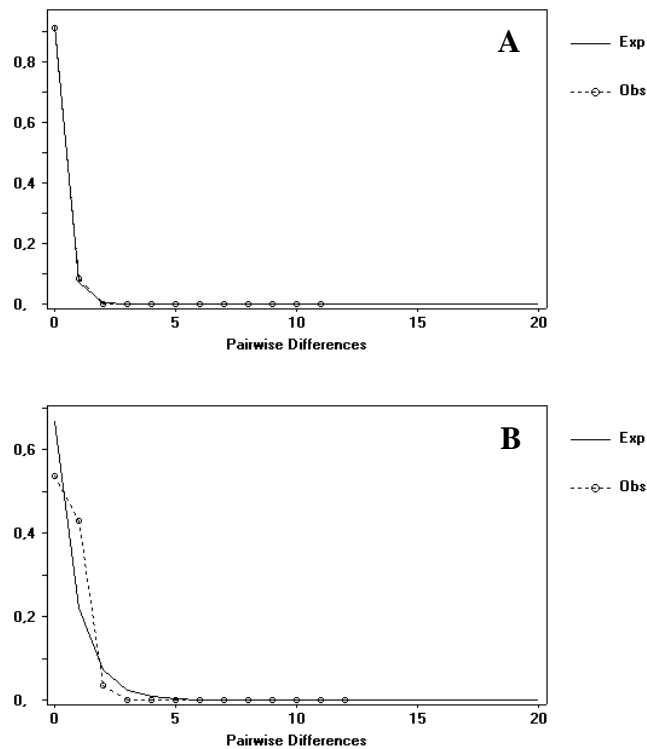
<b>População</b>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1	-	<b>1,0000</b>	<b>0,9740</b>	<b>0,8738</b>
Grupo 2	<b>1,0000</b>	-	<b>0,9800</b>	<b>0,9382</b>
Grupo 3	<b>0,9221</b>	<b>0,9575</b>	-	<b>0,9045</b>
Grupo 4	<b>0,6642</b>	<b>0,8791</b>	<b>0,8061</b>	-

As maiores diversidades haplotípica e nucleotídica dos grupos genéticos do oceano Atlântico Sul Ocidental foram do Grupo 4:  $Hd = 0,4643$  ( $\sigma = 0,2000$ ) e  $\pi = 0,00833$  ( $\sigma = 0,00896$ ), respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7.** Diversidade genética da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental nos grupos genéticos. N: número de amostras. S: sítios variáveis. H: número de haplótipos. Hd: diversidade haplotípica.  $\pi$ : diversidade nucleotídica. SD: desvio padrão. Os valores obtidos para o D de Tajima e o Fs de Fu não foram significativos.

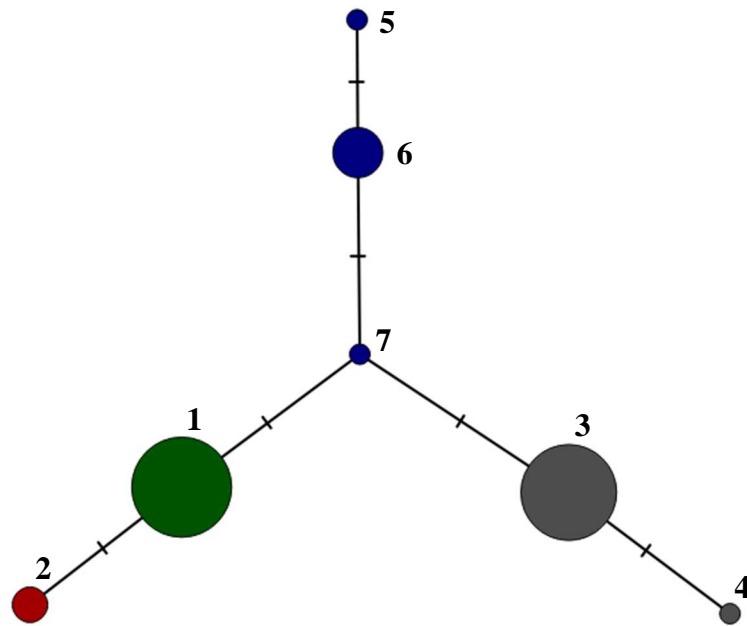
<b>População</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>Hd (SD)</b>	<b><math>\pi</math> (SD)</b>	<b>D de Tajima (P)</b>	<b>FS de Fu (P)</b>
Grupo 1	3	0	1	0,0000 (0,0000)	0,00000 (0,00000)	0,0000 (1,0000)	0,0000 (1,0000)
Grupo 2	24	0	1	0,0000 (0,0000)	0,00000 (0,00000)	0,0000 (1,0000)	0,0000 (1,0000)
Grupo 3	23	1	2	0,0870 (0,0778)	0,00145 (-0,00305)	-1,1610 (0,1439)	-0,9930 (0,0729)
Grupo 4	8	2	3	0,4643 (0,2000)	0,00833 (0,00896)	-1,3101 (0,0961)	0,9990 (0,0536)

Mesmo com este novo arranjo populacional, os testes de neutralidade seletiva D de Tajima e FS de Fu não sugerem mudanças significativas no tamanho e nem expansão populacional recente da espécie como um todo no oceano Atlântico Sul Ocidental. Entretanto, a análise de *Mismatch Distribution* unimodal sugeriu que existe expansão populacional recente nos grupos genéticos 3 e 4 deste novo arranjo amostral (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfico da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças par a par do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* nos grupos genéticos no oceano Atlântico Sul Ocidental. Exp: Expectativa. Obs: Observado. A: Grupo 3. B: Grupo 4. Não foi possível analisar os grupos genéticos 1 e 2, pois não há polimorfismos.

A rede de haplótipos com este novo arranjo populacional com quatro grupos genéticos (Figura 6) apresentou 7 haplótipos. O grupo 1 apresentou um único haplótipo (haplótipo 2), assim como o grupo 2 (haplótipo 1). O grupo 3 apresentou dois haplótipos (haplótipos 3 e 4), e o grupo 4 possui três haplótipos (haplótipos 5, 6 e 7) (Tabela 8). Apesar do padrão geral da rede lembrar uma estrela, não houve sinal de expansão, como já demonstrado pelos testes de neutralidade (ver tabela 7).



**Figura 6.** Rede de haplótipos das sequências da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* nos grupos genéticos no oceano Atlântico Sul Ocidental. Os círculos representam os haplótipos encontrados e seus tamanhos são proporcionais à frequência de indivíduos que os apresentam. Número dos haplótipos (Tabela 8). Os passos mutacionais são representados pela quantidade de barras nos ramos. As cores são referentes aos grupos genéticos aos quais os indivíduos pertencem. Cor vermelha: Grupo 1. Cor verde: Grupo 2. Cor cinza: Grupo 3. Cor azul: Grupo 4.

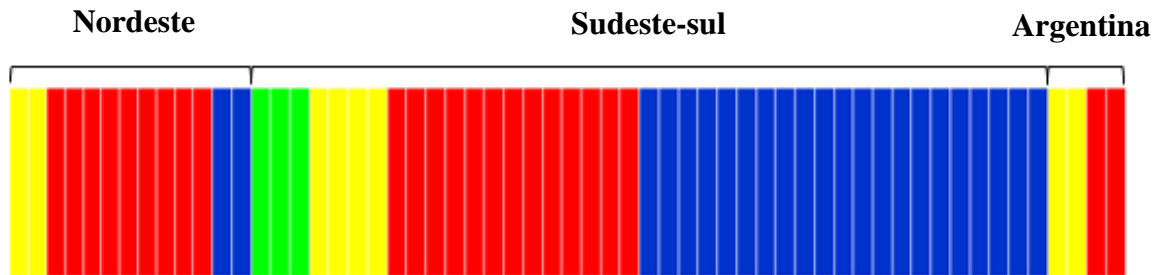
**Tabela 8.** Lista de haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* dos grupos genéticos no oceano Atlântico Sul Ocidental: relação de frequência e grupos que os compõe.

Número do Haplótipo	Frequência	Cluster
1	24	Grupo 2
2	3	Grupo 1
3	22	Grupo 3
4	1	Grupo 3
5	1	Grupo 4
6	6	Grupo 4
7	1	Grupo 4

Contudo, levando em consideração a possível existência de uma estruturação norte-nordeste e sudeste-sul da espécie na costa do Brasil, as novas análises de estruturação populacional (Baps e AMOVA) testaram esta hipótese usando apenas três populações *a priori*: nordeste do Brasil, sudeste-sul do Brasil e Argentina. Os resultados do Baps sugeriram que espécimes coletados na costa sudeste e sul do Brasil apresentaram um grupo genético exclusivo (Grupo 1, cor verde) (Figura 7), e os demais três grupos genéticos foram compartilhados com a costa nordeste do Brasil e Argentina. A costa da Argentina compartilhou dois grupos genéticos com a costa do Brasil como um todo, desta forma nenhum destes grupos foi exclusivo de nenhuma área geográfica. Como mencionado anteriormente, apesar destes grupos genéticos (exceto o Grupo 1, formado por indivíduos apenas da região sul), estarem presentes em mais de uma população estabelecida *a priori*, é difícil atribuir a um padrão geográfico de populações as diferenças genéticas encontradas.

O grupo 4 (amarelo) ocorre nas três áreas amostradas, mas com frequência baixa, sendo apenas 15% no nordeste do Brasil e 10% no sudeste-sul do Brasil. O grupo 1 (verde) é raro, sendo encontrado apenas na costa sudeste-sul do Brasil e com uma frequência de apenas 7%. As maiores diferenças ocorrem nos grupos 2 (vermelho) e 3 (azul), onde o primeiro apresenta uma maior frequência no nordeste do Brasil (70%) em contraste com o sudeste-sul do Brasil (32%), sendo que o contrário é observado no grupo 3, apresentando uma baixa frequência no

nordeste do Brasil (15%) e alta no sudeste-sul do Brasil (51%). Na Argentina os grupos 2 e 4 representam 50% cada, entretanto, a amostragem é pequena para fazer maiores inferências.



**Figura 7.** Atribuição dos grupos genéticos ( $k = 4$ ) sugerida pelo programa Baps aos 58 indivíduos com base em sequências da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* entre o nordeste, sudeste-sul e Argentina no oceano Atlântico Sul Ocidental. As barras verticais indicam cada indivíduo e a cor de cada barra representa o grupo genético ( $k$ ) em que o indivíduo foi atribuído. Cor verde: Grupo 1. Cor vermelha: Grupo 2. Cor azul: Grupo 3. Cor amarela: Grupo 4.

Os novos resultados da AMOVA levando em consideração um cenário com apenas três grupos geográficos indicaram que há grande diferenciação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as áreas em geral ( $\Phi_{ST} = 9\%$  e  $F_{ST} = 12\%$ ,) (Tabela 9). Entretanto, a maior variação se encontra dentro das próprias populações do que entre as mesmas.

**Tabela 9.** Análise da variância molecular (AMOVA) baseada nos valores de fixação ( $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ) para a região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental entre as regiões nordeste e sudeste-sul e Argentina. Todos os valores obtidos foram significativos para  $P < 0,05$ .

Fonte de variação	DNAmt	
	$F_{ST}$ (%)	$\Phi_{ST}$ (%)
Entre as populações	12,31	9,14
Dentro das populações	87,69	90,86

As distâncias par a par entre as áreas do Brasil e da Argentina não foram significativas, tanto para o  $F_{ST}$  quanto para o  $\Phi_{ST}$ . Entretanto, as distâncias par a par entre as populações do

nordeste e sudeste-sul do Brasil foram significativas, apresentando uma diferenciação genética (Tabela 10).

**Tabela 10.** Análise pareada das estatísticas  $F$  da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* entre as regiões nordeste e sudeste-sul e Argentina no oceano Atlântico Sul Ocidental. Diagonal superior  $\Phi_{ST}$  e diagonal inferior  $F_{ST}$ . Valores significativos para  $P < 0,05$  estão em negrito.

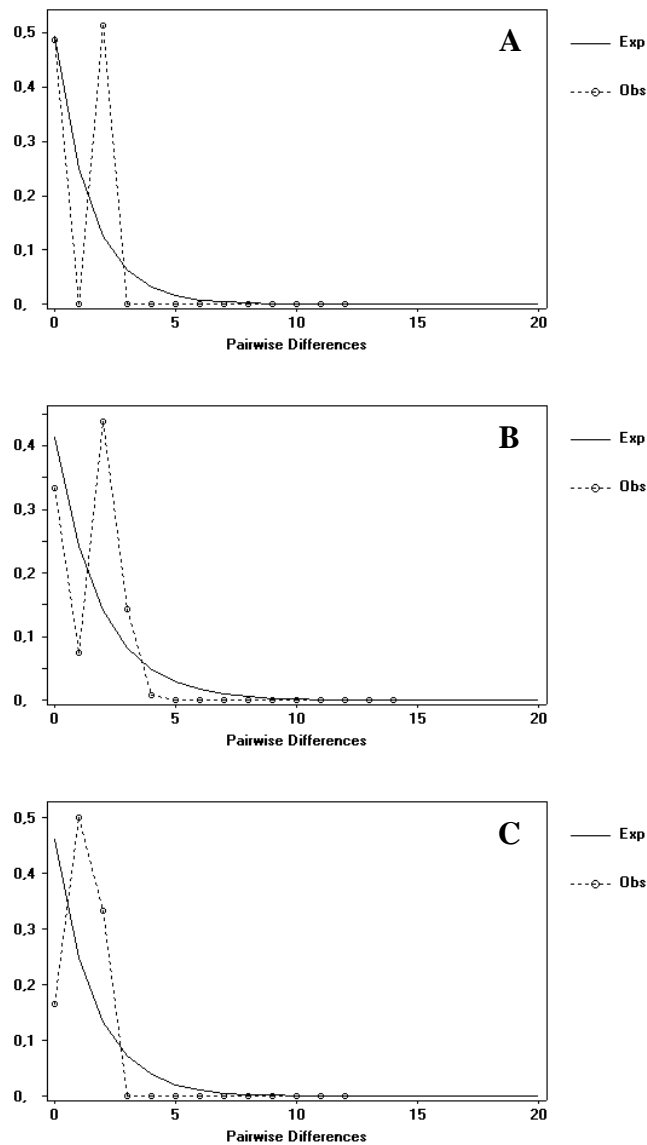
População	Argentina	Nordeste do Brasil	Sudeste-sul do Brasil
Argentina	-	- 0,0512	0,1206
Nordeste do Brasil	- 0,1076	-	<b>0,1378</b>
Sudeste-sul do Brasil	0,0742	<b>0,1089</b>	-

A população do nordeste do Brasil apresentou três haplótipos, e possui a mais baixa diversidade haplotípica ( $H_d = 0,5128$ ) e nucleotídica ( $\pi = 0,00179$ ) (Tabela 11) do estudo.

**Tabela 11.** Diversidade genética da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* nas regiões nordeste e sudeste-sul e Argentina no oceano Atlântico Sul Ocidental. N: número de amostras. S: sítios variáveis. H: número de haplótipos.  $H_d$ : diversidade haplotípica.  $\pi$ : diversidade nucleotídica. SD: desvio padrão. Os valores obtidos para o D de Tajima e o  $F_s$  de  $F_u$  não foram significativos.

População	N	S	H	$H_d$ (SD)	$\pi$ (SD)	D de Tajima ( $P$ )	$F_s$ de $F_u$ ( $P$ )
Argentina	4	2	3	0,8333 (0,2224)	0,00204 (0,001941)	0,5916 (0,8205)	- 0,6579 (0,1593)
Nordeste do Brasil	13	3	3	0,5128 (0,1436)	0,00179 (0,00144)	0,1926 (0,6331)	0,8268 (0,6561)
Sudeste-sul do Brasil	41	6	6	0,6659 (0,0524)	0,00248 (0,00172)	0,0279 (0,5712)	- 0,2190 (0,4792)

Os testes de neutralidade seletiva D de Tajima e  $F_s$  de  $F_u$  não sugerem mudanças significativas no tamanho e nem expansão populacional recente (Tabela 11), tanto nas populações separadas do nordeste, sudeste-sul e Argentina quanto na espécie como um todo no oceano Atlântico Sul Ocidental. A análise de *Mismatch Distribution* unimodal evidencia que não existe expansão populacional recente na costa do oceano Atlântico Sul Ocidental (Figura 8).

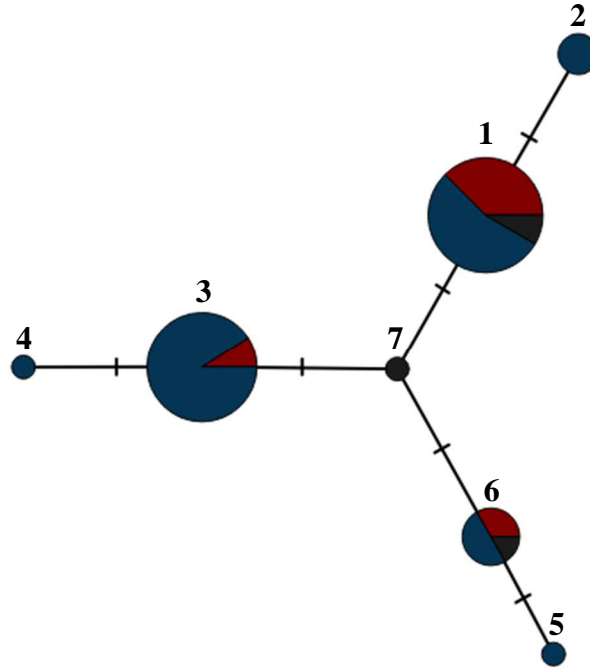


**Figura 8.** Gráfico da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças par a par do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* entre o nordeste, sudeste-sul e Argentina no oceano Atlântico Sul Ocidental. Exp: Expectativa. Obs: Observado. A: Amostras da região nordeste do Brasil. B: Amostras da região sudeste-sul do Brasil. C: Amostras da Argentina.

A rede de haplótipos (Figura 9) apresentou alguns haplótipos divergentes dos demais (e.g. haplótipos da costa sudeste-sul do Brasil e da costa da Argentina). Há três haplótipos compartilhados entre as áreas do nordeste e sudeste-sul do Brasil, sendo que dois são compartilhados com a costa da Argentina. Com esta nova configuração a costa sudeste-sul do Brasil apresentou três haplótipos exclusivos e a costa da Argentina apresentou um haplótipo particular. A costa nordeste do Brasil não apresentou haplótipos exclusivos. O padrão geral da



rede lembra uma estrela, possuindo um haplótipo central, entretanto, os cladogramas não estão geograficamente bem estruturados.



**Figura 9.** Rede de haplótipos das sequências da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* nas regiões nordeste e sudeste-Sul e Argentina no oceano Atlântico Sul Ocidental. Os círculos representam os diversos haplótipos encontrados e seus tamanhos são proporcionais à frequência de indivíduos que os apresentam. Número dos haplótipos (Tabela 12). Os passos mutacionais são representados pela quantidade de barras nos ramos. As cores são referentes às localidades dos indivíduos. Cor vermelha: indivíduos da costa Nordeste do Brasil. Cor azul: indivíduos da costa Sudeste-Sul do Brasil. Cor cinza: indivíduos da costa da Argentina.

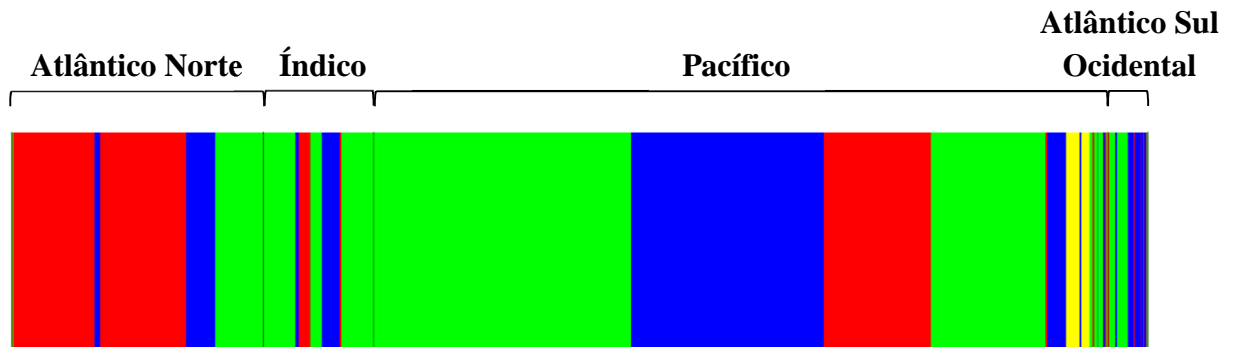
O haplótipo central ocorre apenas na costa argentina (Tabela 12), enquanto os três haplótipos derivados do mesmo são os mais abundantes, e a partir destes, apenas no sudeste-sul do Brasil existem novos haplótipos.

**Tabela 12.** Lista de haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* das regiões Nordeste e Sudeste-Sul e Argentina no oceano Atlântico Sul Ocidental: relação de frequência e localidades que os compõe.

Haplótipo	Frequência	Localidade
1	24	Nordeste, sudeste-sul e Argentina
2	3	Sudeste-sul
3	22	Nordeste e sudeste-sul
4	1	Sudeste-sul
5	1	Sudeste-sul
6	6	Nordeste, sudeste-sul e Argentina
7	1	Argentina

### 3.2 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE CACHALOTE A NÍVEL MUNDIAL, DE BACIA OCEÂNICA E REGIONAL

A diversidade genética das sequências de DNA da região controladora a nível mundial e de bacia oceânica (Atlântico Norte, Índico e Pacífico e Atlântico Sul Ocidental) foi avaliada em um fragmento de 380 pb alinhados em um total de 1.635 indivíduos. Foram encontrados 30 sítios variáveis (100% de transições), que determinam 39 haplótipos mundiais. A análise do programa Baps sugeriu que a estruturação genética com maior verossimilhança é a que apresentou quatro grupos genéticos novamente ( $k = 4$ ) (Figura 10), apenas o oceano Pacífico apresentou um grupo genético exclusivo (cor amarela), enquanto compartilhou os outros três grupos genéticos com os outros oceanos.



**Figura 10.** Atribuição dos grupos genéticos ( $k = 4$ ) sugerida pelo programa Baps aos 1.635 indivíduos com dados do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* nos oceanos Atlântico Sul Ocidental, Atlântico Norte, Índico e Pacífico. As barras verticais indicam cada indivíduo e a cor de cada barra representa cada grupo genético ( $k$ ) em que o indivíduo foi atribuído.

A análise da variância molecular (AMOVA) indicou que há diferenciação entre oceanos em geral (entre 8% e 16%) (Tabela 13), entretanto, a maior variação se encontra dentro das próprias populações do que entre as mesmas, padrão similar ao encontrado no oceano Atlântico Sul Ocidental.

**Tabela 13.** Análise da variância molecular (AMOVA) baseada nos valores de fixação ( $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ) para a região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* mundialmente e entre oceanos Atlântico Sul Ocidental, Atlântico Norte, Índico e Pacífico. Todos os valores obtidos foram significativos para  $P < 0,05$ .

Fonte de variação	DNAm <sub>t</sub>	
	$F_{ST}$ (%)	$\Phi_{ST}$ (%)
Entre as populações	8,89	16,39
Dentro das populações	91,11	83,61

As distâncias genéticas par a par entre os oceanos foram significativas, tanto para o  $F_{ST}$  quanto para o  $\Phi_{ST}$ , sendo assim, todos os oceanos apresentaram uma diferenciação genética significativa entre eles (Tabela 14).

**Tabela 14.** Análise pareada das estatísticas  $F$  da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. Diagonal superior  $\Phi_{ST}$  e diagonal inferior  $F_{ST}$ . Valores significativos para  $P < 0,05$  estão em negrito. ATL: Oceano Atlântico. PAC: Oceano Pacífico. IND: Oceano Índico.

<b>População</b>	ATL	PAC	IND
ATL	-	<b>0,1740</b>	<b>0,1953</b>
PAC	<b>0,0820</b>	-	<b>0,1250</b>
IND	<b>0,1188</b>	<b>0,0946</b>	-

O oceano Atlântico Sul Ocidental apresentou diferenças significativas com todos os outros oceanos, inclusive ao ser comparado com as demais amostras do próprio oceano Atlântico (indivíduos do Atlântico Norte) (Tabela 15).

**Tabela 15.** Análise pareada das estatísticas  $F$  da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* dos oceanos Atlântico Sul Ocidental, Atlântico Norte, Índico e Pacífico. Diagonal superior  $\Phi_{ST}$  e diagonal inferior  $F_{ST}$ . Valores significativos para  $P < 0,05$  estão em negrito. ASO: Oceano Atlântico Sul Ocidental. ATL: Oceano Atlântico Norte. PAC: Oceano Pacífico. IND: Oceano Índico.

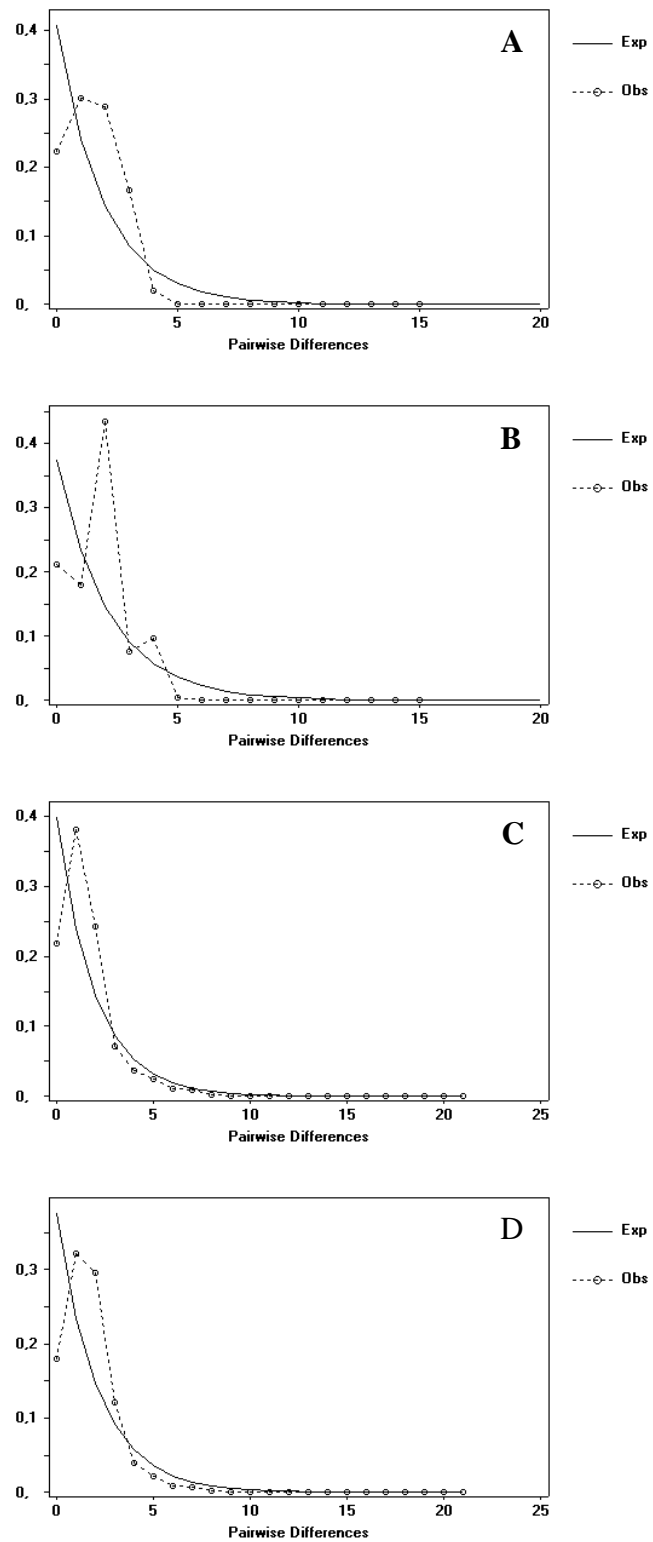
<b>População</b>	ASO	ATL	PAC	IND
ASO	-	<b>0,3142</b>	<b>0,0757</b>	<b>0,1661</b>
ATL	<b>0,1837</b>	-	<b>0,2271</b>	<b>0,2445</b>
PAC	<b>0,1140</b>	<b>0,1019</b>	-	<b>0,1251</b>
IND	<b>0,0898</b>	<b>0,1490</b>	<b>0,0947</b>	-

A diversidade haplotípica incluindo todas áreas estudadas foi de  $H_d = 0,8195$  ( $\sigma = 0,0054$ ), e a diversidade nucleotídica foi de  $\pi = 0,00555$  ( $\sigma = 0,00361$ ) (Tabela 16).

**Tabela 16.** Diversidade genética da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* mundialmente e nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. N: número de amostras. S: sítios variáveis. H: número de haplótipos. Hd: diversidade haplotípica.  $\pi$ : diversidade nucleotídica. SD: desvio padrão. Os valores obtidos para o D de Tajima e o Fs de Fu significativos ( $P < 0,05$  e  $P < 0,02$ , respectivamente) estão em negrito.

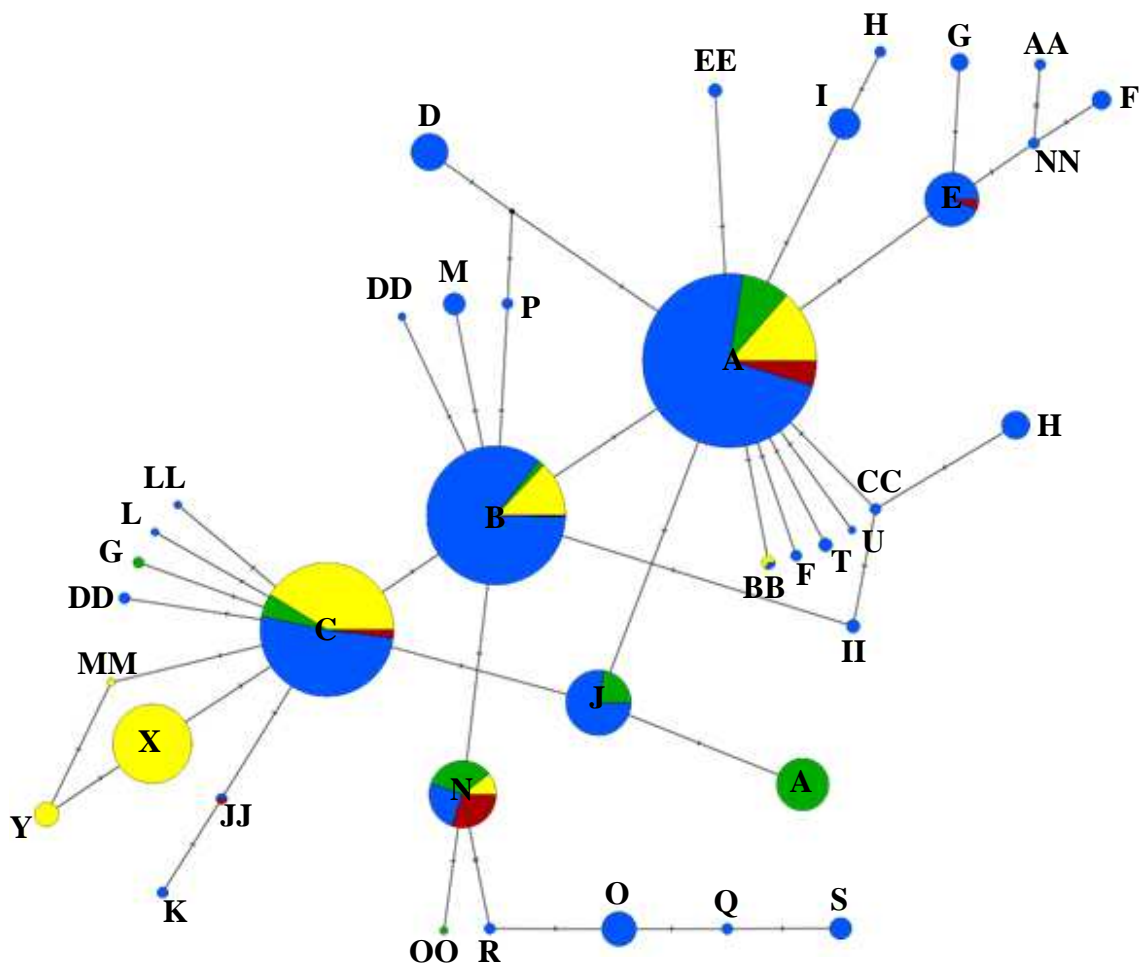
População	N	S	H	Hd (SD)	$\pi$ (SD)	D de Tajima (P)	FS de Fu (P)
ATL	362	6	8	0,7767 (0,0085)	0,00437 (0,00302)	0,4215 (0,6396)	-0,4911 (0,5049)
PAC	1056	26	33	0,7814 (0,0079)	0,00504 (0,00336)	<b>-1,3631 (0,0471)</b>	<b>-21,4238 (0,0004)</b>
IND	159	6	8	0,7881 (0,0146)	0,00558 (0,00364)	1,2088 (0,8917)	0,3786 (0,6206)
Total	1635	30	39	0,8195 (0,0054)	0,00555 (0,00361)	<b>-1,3457 (0,0480)</b>	<b>-25,1963 (0,0004)</b>

Os testes de neutralidade seletiva de Tajima's D e Fs de Fu sugeriram mudanças significativas no tamanho efetivo da população mundial, com expansão populacional recente na espécie como um todo (Tabela 16). Contudo, avaliando os oceanos separadamente, apenas o Pacífico apresentou valores significativos sugeridos como expansão populacional. A análise de *Mismatch Distribution* bimodal sugeriu uma possível expansão no oceano Índico, entretanto, não apontou a existência de expansão da população mundial ou nos oceanos (Figura 11).

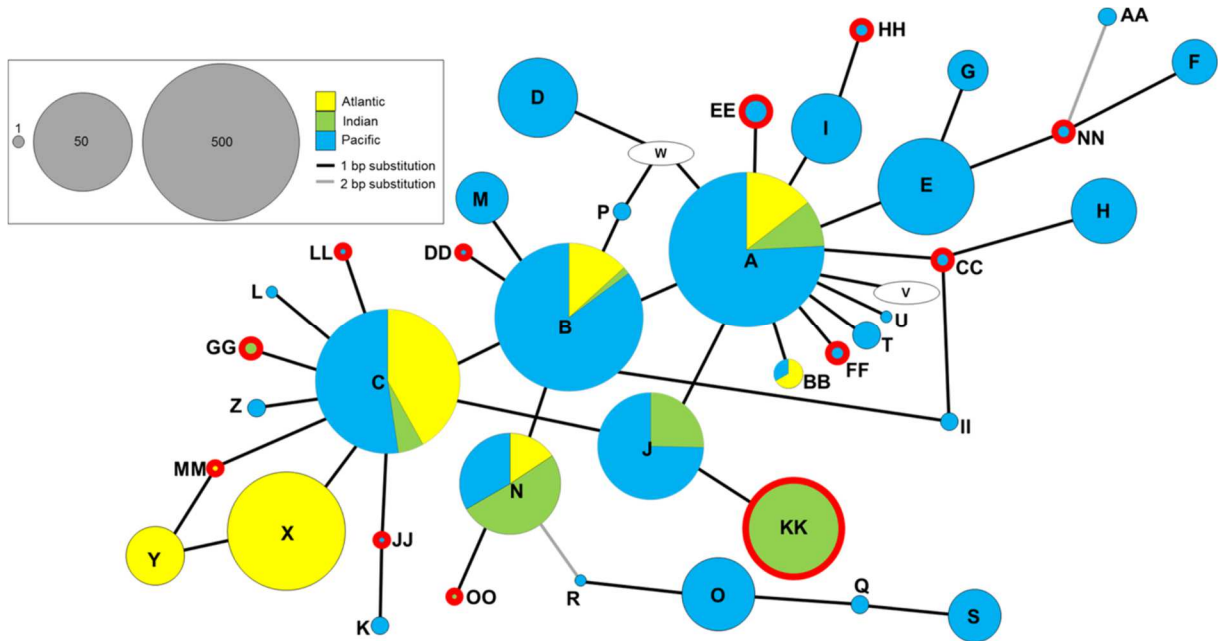


**Figura 11.** Gráfico da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças par a par do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* mundialmente e nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. Exp: Expectativa. Obs: Observado. A: Oceano Atlântico. B: Oceano Índico. C: Oceano Pacífico. D: Mundial.

A rede de haplótipos (Figura 12) apresentou quatro haplótipos compartilhados entre as quatro áreas (haplótipos centrais A, B, C e N, Tabela 17), não apresentando haplótipos diferentes do encontrado por Alexander *et al.* (2016) (Figura 13). O padrão geral da rede apresenta 3 haplótipos ancestrais, dos quais os demais derivaram, apontando uma possível expansão mundial derivada de um único grupo ancestral com baixa diversidade. Contudo, alguns haplótipos não foram compartilhados entre todos os oceanos (*e.g.* haplótipos do oceano Atlântico Sul Ocidental e do oceano Pacífico).



**Figura 12.** Rede de haplótipos das sequências da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. As letras representam os haplótipos encontrados por Alexander *et al.* (2016) para análise de estruturação mundial dos cachalotes (Tabela 17). Cor azul: indivíduos do oceano Pacífico. Cor amarela: indivíduos do oceano Atlântico. Cor verde: indivíduos do oceano Índico. Cor vermelha: indivíduos do oceano Atlântico Sul Ocidental.



**Figura 13.** Rede de haplótipos baseada em 394 pb da região controladora do DNA mitocondrial. Os haplótipos são coloridos pelo oceano, com exceção dos haplótipos V e W que não foram localizados em um oceano específico em estudos. O tamanho do círculo do haplótipo é proporcional numa escala logarítmica ao número total de amostras com o haplótipo. As linhas representam substituições. Novos haplótipos descobertos por Alexander *et al.* (2016) são delineados em vermelho. **Fonte:** Alexander *et al.* (2016).

O oceano Pacífico apresentou o maior número de haplótipos ( $n = 33$ ), dos quais 25 eram exclusivos, enquanto os oceanos Atlântico e Índico apresentam três haplótipos exclusivos cada um. As amostras do oceano Atlântico Sul Ocidental não apresentaram haplótipos exclusivos, entretanto, indivíduos da região sudeste-sul deste estudo possuíam dois haplótipos compartilhados somente com o oceano Pacífico (E e JJ).



**Tabela 17.** Lista de haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* dos oceanos Atlântico Sul Ocidental, Atlântico, Índico e Pacífico: relação de frequência e grupos que os compõe. As amostras deste trabalho estão em negrito.

Haplótipo	Frequência	Localidade
A	509	Atlântico, Índico, Pacífico e <b>Atlântico Sul Ocidental (nordeste, sudeste-sul e Argentina)</b> (haplótipo 1 do presente estudo)
B	325	Atlântico, Índico, Pacífico e <b>Atlântico Sul Ocidental (Argentina)</b> (haplótipo 7 do presente estudo)
C	301	Atlântico, Índico, Pacífico e <b>Atlântico Sul Ocidental (nordeste, sudeste-sul e Argentina)</b> (haplótipo 6 do presente estudo)
D	23	Pacífico
E	49	Pacífico e <b>Atlântico Sul Ocidental (sudeste-sul)</b> (haplótipo 2 do presente estudo)
F	6	Pacífico
G	5	Pacífico
H	13	Pacífico
I	16	Pacífico
J	72	Índico e Pacífico
K	2	Pacífico
L	1	Pacífico
M	8	Pacífico
N	76	Atlântico, Índico, Pacífico e <b>Atlântico Sul Ocidental (nordeste e sudeste-sul)</b> (haplótipos 3 e 4 do presente estudo)
O	20	Pacífico
P	2	Pacífico
Q	2	Pacífico
R	2	Pacífico
S	8	Pacífico
T	3	Pacífico

U	1	Pacífico
X	106	Atlântico
Y	10	Atlântico
Z	2	Pacífico
AA	2	Pacífico
BB	3	Atlântico e Pacífico
CC	2	Pacífico
DD	1	Pacífico
EE	3	Pacífico
FF	2	Pacífico
GG	2	Índico
HH	2	Pacífico
II	3	Pacífico
JJ	2	Pacífico e <b>Atlântico Sul Ocidental (sudeste-sul)</b> (haplótipo 5 do presente estudo)
KK	46	Índico
LL	1	Pacífico
MM	1	Atlântico
NN	2	Pacífico
OO	1	Índico

---

A análise da variância molecular (AMOVA) indicou que há diferenciação entre as áreas em geral (entre 22% e 29%) quando levamos em conta as regiões mundiais (Tabela 18), apresentando um índice mais alto do que as diferenças entre os oceanos.

**Tabela 18.** Análise da variância molecular (AMOVA) baseada nos valores de fixação ( $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ) para a região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* entre as regiões dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. Todos os valores obtidos foram significativos para  $P < 0,05$ .

Fonte de variação	DNAmt	
	$F_{ST}$ (%)	$\Phi_{ST}$ (%)
Entre as populações	22,25	29,78
Dentro das populações	77,75	70,22

Os haplótipos centrais (A, B, C e N) foram compartilhados pela maioria das regiões (Tabela 19). As amostras da região Sudeste-Sul do oceano Atlântico Sul Ocidental possuem haplótipos compartilhados exclusivamente somente com regiões do oceano Pacífico, sugerindo desta forma que o Pacífico seria a população mais próxima filogeneticamente da população Atlântico Sul Ocidental. O haplótipo E foi compartilhado com as populações do Chile, Golfo da Califórnia, Galápagos, Havaí, Costa japonesa, Nova Zelândia, Oregon, Peru, Papua-Nova Guiné e Passagem do Pacífico, e o haplótipo JJ foi compartilhado com Galápagos.

**Tabela 19.** Lista de haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial de *Physeter macrocephalus* das regiões mundiais: relação de frequência e regiões que os compõe. As amostras deste trabalho estão em negrito. Os haplótipos K, L e U não possuíam populações especificadas dentro dos oceanos respectivos. ALD: Aldraba. AUS\_SAUS: Austrália. BAH: Bahamas. C\_ATL: Atlântico Central. CHI: Chile. CNI: Ilhas Canárias. COC: Ilhas Cocos. GCA: Golfo da Califórnia. GMX: Golfo do México. GPG: Galápagos. HAW: Havaí. IO: Passagem do Oceano Índico. JC: Costa japonesa. KR: Kiribati. MAL\_CHG: Maldivas e Chagos. MAU: Ilhas Maurício. MED: Mar Mediterrâneo. NZ: Nova Zelândia. OR: Oregon. PER: Peru. PNG: Papua-Nova Guiné. PX: Passagem do Pacífico. SEY: Ilhas Seychelles. SRI: Sri Lanka. WNAO: Atlântico Norte Ocidental.

Haplótipo	Frequência	Localidade
A	385	ALD, AUS_SAUS, CHI, CNI, COC, GCA, GMX, GPG, HAW, IO, JC, MAL_CHG, NZ, OR, PER, PNG, PX, SEY, WNAO, <b>Argentina, nordeste e sudeste-sul</b> (haplótipo 1 do presente estudo)
B	236	AUS_SAUS, CHI, GCA, GMX, GPG, HAW, JC, KR, NZ, OR, PER, PNG, PX, WNAO e <b>Argentina</b> (haplótipo 7 do presente estudo)
C	251	ALD, AUS_SAUS, BAH, C_ATL, CHI, CNI, COC, GCA, GMX, GPG, JC, KR, MAL_CHG, MAU, MED, NZ, OR, PER, PNG, PX, SEY, WNAO, <b>Argentina, nordeste e sudeste-sul</b> (haplótipo 6 do presente estudo)
D	17	GCA, GPG, PER e PX
E	38	CHI, GCA, GPG, HAW, JC, NZ, OR, PER, PNG, PX e <b>sudeste-sul</b> (haplótipo 2 do presente estudo)
F	2	GPG e OR
G	2	GPG e OR
H	9	GCA, GPG e OR
I	11	CHI, GCA, GPG, OR e PER
J	49	AUS_SAUS, GCA, GPG, HAW, KR, NZ, PER, PX, SEY e SRI
M	6	GPG, OR e PX
N	70	AUS_SAUS, CNI, COC, GPG, JC, MAL_CHG, NZ, OR, PER, PX, SEY, SRI, WNAO, <b>nordeste e sudeste-sul</b> (haplótipo 3 e 4 do presente estudo)
O	11	CHI, GPG, NZ e PER

P	1	OR
Q	2	JC e NZ
R	1	NZ
S	6	GPG e NZ
T	3	GPG
X	106	GMX e WNAO
Y	10	GMX
Z	2	NZ e PER
AA	2	OR
BB	2	PNG e WNAO
CC	2	GCA
DD	1	PNG
EE	3	NZ
FF	2	PNG
GG	2	SEY
HH	2	KR
II	2	GCA e NZ
JJ	2	GPG e <b>sudeste-sul</b> (haplótipo 5 do presente estudo)
KK	46	ALD, MAL_CHG e SRI
LL	1	PNG
MM	1	C_ATL
NN	2	GCA
OO	1	SEY

---

### 3.3 OCORRÊNCIA DE MACHOS E FÊMEAS EM CADA REGIÃO ESTUDADA

O sexo de 39 dos 58 cachalotes analisados foi identificado molecularmente, sendo 9 machos e 30 fêmeas (28 adultas e 2 recém-nascidas), tendo sido encontradas 18 fêmeas fora da região tropical (nordeste), todas na região sul (7 encalhes e 11 biópsias no talude). O sudeste do Brasil e a Argentina não apresentaram fêmeas, apenas machos (Tabela 20).

Os machos foram amostrados em todas as regiões de coleta (nordeste do Brasil  $n = 2$ , sudeste do Brasil  $n = 3$ , sul do Brasil  $n = 1$ , e Argentina  $n = 3$ ), dos quais seis eram adultos (sudeste do Brasil  $n = 2$ , sul do Brasil  $n = 1$ , e Argentina  $n = 3$ ) e três neonatos (nordeste do Brasil  $n = 2$ , sudeste do Brasil  $n = 1$ ).

Os espécimes machos adultos foram amostrados somente na primavera e verão, já os neonatos foram amostrados em todas as estações do ano, entretanto, os neonatos no sudeste-sul ocorreram apenas na primavera e verão, enquanto no nordeste apenas no outono e inverno.

Estes resultados de 18 de 30 fêmeas encontradas na região sul (fora da região tropical no nordeste), aliados as diferenças observadas de variabilidade genética (ver tabela 10) entre as áreas amostradas no ASO e ao pouco compartilhamento de haplótipos entre as populações estudadas, sugerem que os cachalotes do sudeste-sul do Brasil seriam uma unidade de manejo, potencialmente isolada em termos reprodutivos das demais, indicando que há pelo menos mais de uma população reprodutiva no ASO.

**Tabela 20.** Identificação do sexo obtido molecularmente nas amostras de cachalote (*Physeter macrocephalus*) do presente estudo. Sexo, categoria etária de acordo com o comprimento total do indivíduo coletado, época do ano de coleta e local de coleta no oceano Atlântico Sul Ocidental. ♀: fêmea. ♂: macho.

Identificação dos espécimes	Sexo	Categoria etária	Época do ano	Local de coleta
AQUASIS 02C0410/281	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0412/307	♀	Adulto	Outono	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0410/308	♀	Adulto	Inverno	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0410/338	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0412/434	♀	Adulto	Primavera	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0410/495	♀	Adulto	Outono	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0410/530	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0410/532	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
BAH 1	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0412/280	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0410/477	♀	Adulto	Verão	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0412/348	♀	Neonato	Inverno	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0411/564	♂	Neonato	Inverno	Nordeste do Brasil
AQUASIS 02C0411/542	♂	Neonato	Outono	Nordeste do Brasil
GEMM-Lagos 092	♂	Neonato	Primavera	Sudeste do Brasil
GEMM-Lagos 001	♂	Adulto	Verão	Sudeste do Brasil
MN-UFRJ 54999	♂	Adulto	Verão	Sudeste do Brasil
IA 1227	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 1230	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 1231	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 1224	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 1225	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 1226	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 1228	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
IA 001	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
IA 002	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
IA 004	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
IA 006	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
GEMARS 1267	♀	Adulto	Verão	Sul do Brasil
GEMARS 1275	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
FURG 21	♀	Adulto	Verão	Sul do Brasil
PM 985	♀	Adulto	Primavera	Sul do Brasil
GEMARS 1274	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
PM 512	♀	Adulto	Outono	Sul do Brasil
FURG 17	♀	Neonato	Verão	Sul do Brasil
GEMARS 1377	♂	Adulto	Verão	Sul do Brasil
CENPAT 2	♂	Adulto	Primavera	Argentina
CENPAT 5	♂	Adulto	Primavera	Argentina
CENPAT 3	♂	Adulto	Primavera	Argentina

Contudo, estes resultados devem ser observados com cautela, já que ainda se faz necessário a determinação do sexo de 19 espécimes.



## 4 DISCUSSÃO

Esse estudo é o primeiro a avaliar a diversidade e diferenciação genética das populações de *Physeter macrocephalus* no oceano Atlântico Sul Ocidental. A diversidade genética mitocondrial encontrada para a espécie no Atlântico Sul Ocidental está distribuída em quatro grupos genéticos pouco relacionados a áreas geográficas, tendo a região do sudeste-sul do Brasil uma diversidade genética singular e associada a população do oceano Pacífico, tida como a mais próxima filogeneticamente dos cachalotes do Atlântico Sul Ocidental (ALEXANDER *et al.*, 2016).

Os espécimes do nordeste apresentaram a menor diversidade nucleotídica e haplotípica da espécie dentro ASO, inclusive ao se comparar com a região da Argentina que teve a menor amostragem. Além disso, comparando-se a diversidade genética das regiões do nordeste e do sudeste-sul do Brasil e a costa da Argentina com as demais regiões do mundo analisadas por Alexander *et al.* (2016), a diversidade nucleotídica do presente estudo foi maior (mín: 0,001796 máx: 0,002482), enquanto a diversidade haplotípica (mín: 0,5128 e máx: 0,8333) foi parecida.

Entretanto, mesmo a partir da inclusão das amostras deste estudo, o nível conhecido atualmente de diversidade da região controladora do DNA mitocondrial dos cachalotes ainda é um dos menores em relação aos estudos anteriores (Tabela 21).

**Tabela 21.** Diversidade genética mitocondrial para diferentes espécies de cetáceos. N: número de amostras.  $\pi$ : diversidade nucleotídica.

<b>Espécie</b>	<b>N</b>	<b><math>\pi</math> (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Globicephala melas</i>	643	0,35	Oremus <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudorca crassidens</i>	124	0,37	Chivers <i>et al.</i> (2007)
<i>Cephalorhynchus commersonii</i>	196	0,40	Pimper <i>et al.</i> (2010)
<b><i>Physeter macrocephalus</i></b>	<b>1.587</b>	<b>0,43</b>	<b>Alexander <i>et al.</i> (2016)</b>
<i>Delphinapterus leucas</i>	324	0,51	O’Corry-Crowe <i>et al.</i> (1997)
<i>Orcinus orca</i>	102	0,52	Hoelzel <i>et al.</i> (2002)
<b><i>Physeter macrocephalus</i></b>	<b>1.635</b>	<b>0,55</b>	<b>Presente estudo</b>
<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	122	0,56	Banguera-Hinestroza <i>et al.</i> (2010)
<i>Cephalorhynchus hectori hectori</i>	318	0,79	Hamner <i>et al.</i> (2012)
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	150	0,87	Oremus <i>et al.</i> (2009)
<i>Phocoenoides dalli</i>	103	1,06	Hayano <i>et al.</i> (2003)
<i>Balaenoptera physalus</i>	341	1,13	Bérubé <i>et al.</i> (1998)
<i>Stenella attenuata</i>	225	1,36	Escorza-Treviño <i>et al.</i> (2005)
<i>Balaenoptera musculus intermedia</i>	183	1,40	Sremba <i>et al.</i> (2012)
<i>Eubalaena australis</i>	585	1,43	Carroll <i>et al.</i> (2011)
<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	153	1,63	Cassens <i>et al.</i> (2005)
<i>Kogia breviceps</i>	108	1,65	Chivers <i>et al.</i> (2005)
<i>Delphinus delphis</i>	297	1,80	Mirimin <i>et al.</i> (2009)
<i>Tursiops sp.</i>	220	2,21	Krützen <i>et al.</i> (2004)

**Fonte:** Modificado de Alexander *et al.* (2013).

De acordo com os resultados, não existe uma estruturação populacional genética associado exclusivamente a determinadas latitudes na costa do oceano Atlântico Sul Ocidental, visto que são apresentados quatro grupos genéticos distribuídos por todas as regiões.

Entretanto, entre os quatro grupos genéticos encontrados no Atlântico Sul Ocidental, um deles ocorre exclusivamente nos indivíduos da região sudeste-sul, representando possíveis diferenças geográficas nas populações. Em adição é possível que a diferenças genéticas observadas entre as populações do nordeste e do sudeste-sul na costa brasileira seja devido a estrutura social associada à separação latitudinal destas populações pela filopatria das fêmeas. Estudos prévios demonstraram que além da filopatria, os cachalotes podem apresentar características próprias influenciadas por fatores em função da complexa estrutura social dos cachalotes, da especialização no uso dos recursos e reprodução (LYRHOLM *et al.*, 1999; ALEXANDER *et al.*, 2012). Uma análise temporal de encalhes indicou a existência de dois padrões distintos de nascimentos da espécie no litoral brasileiro, enquanto na região nordeste os neonatos foram registrados entre outono e inverno, nas regiões sudeste e sul os registros estão todos concentrados entre primavera e verão, sugerindo uma demarcada sazonalidade dos nascimentos. Os dados de diversidade genética e de frequência de fêmeas em cada região obtidos no presente estudo corroboram os dados de baleação de Townsend (1935), sugerindo a

existência de uma população reprodutiva entre o sudeste e sul do Brasil diferente da população do nordeste, tanto geneticamente quanto em termos de sazonalidade reprodutiva.

Essas diferenças podem estar associadas a características de possíveis grupos sociais no Atlântico Sul Ocidental (RAMOS *et al.*, 2001), e também associadas às distintas condições oceanográficas de cada uma das regiões, como temperatura da água, visto que nas regiões norte e nordeste a temperatura da superfície do mar se mantém estável em aproximadamente 25°C, enquanto nas regiões sudeste e sul esta média de temperatura só ocorre no fim da primavera e durante o verão, período de nascimento observado na região. Isto poderia levar a formação de um grupo de cachalotes independentes no nordeste e outro na região sudeste-sul, os quais devido a filopatria das fêmeas levaria à diferenciação nas frequências gênicas e ao surgimento de um grupo diferenciado geneticamente apenas no sudeste-sul, o que também é evidenciado pelos índices de  $\Phi_{ST}$  e  $F_{ST}$ .

Além disso, esta estruturação entre o nordeste e o sudeste-sul da costa do Brasil poderia estar relacionada com a corrente Sul Equatorial do oceano Atlântico, que se movimenta no sentido Leste-Oeste na altura do Equador, e bifurca-se ao alcançar a costa nordestina brasileira. A corrente que se desvia para o norte, é denominada corrente das Guianas com temperaturas médias de 25°C (INPE), e a que se volta para o sul, é a corrente do Brasil com temperaturas médias de 15°C (INPE), enfatizando a variação das temperaturas entre o nordeste e sudeste-sul. Ao sul, o encontro da corrente do Brasil, que traz água tropical pouco densa, com a corrente das Malvinas, mais densa, origina a região denominada Convergência Subtropical do Atlântico Sul, enquanto no nordeste ocorre uma zona de ressurgência, formando duas áreas, uma ao nordeste e uma ao sudeste-Sul, com alta produtividade biológica. Além do fator da temperatura da área, a produtividade poderia estar levando a uma possível estruturação apesar de não haver barreiras geográficas evidentes (WOOD, 1998; MATE *et al.*, 1999; MATTHIOPOULOS *et al.*, 2004).

As populações de cachalotes apresentam diferenças substanciais entre os oceanos em termos de dialetos vocais, tamanho dos clãs sociais femininos e proporção de neonatos dentro dos grupos sociais (WHITEHEAD *et al.*, 2012; GERO *et al.*, 2015), sugerindo que a importância dos grupos sociais femininos na diversidade genética pode variar de acordo com o oceano, o que foi corroborado neste trabalho, visto que as diferenças nos índices de  $\Phi_{ST}$  e  $F_{ST}$  foram todas significativas entre os oceanos. O resultado de diferença genética significativa entre a população do oceano Atlântico Sul Ocidental e a população do Atlântico Norte é um indicativo de uma reduzida dispersão de fêmeas entre regiões geográficas distantes (entre os oceanos ou entre os hemisférios norte e sul) bem como sua fidelidade ao seu sítio de nascimento

(filopatria), (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; LYRHOLM *et al.*, 1999; ENGELHAUPT *et al.*, 2009). Entretanto, as diferenças genéticas observadas foram maiores entre as regiões dentro de cada oceano, possivelmente devido a existência de grupos sociais.

Porém, é importante enfatizar que nesta espécie, bem como outras de cetáceos onde as fêmeas são filopátricas ao seu sítio de nascimento, os machos são os responsáveis pelo fluxo gênico entre as colônias reprodutivas (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; DUFAULT *et al.*, 1999; LYRHOLM *et al.*, 1999). Desta forma, devido à herança matrilinear do DNA mitocondrial (AVISE *et al.*, 1987), mesmo encontrando uma possível estruturação populacional refletida na história evolutiva das fêmeas, deve-se analisar com cautela para não negligenciar o fluxo gênico mediado pelos machos. Neste sentido, a continuidade deste estudo com a análise combinada de múltiplos *loci* nucleares, como microssatélites, os quais refletem a contribuição de machos e fêmeas (herança bi-parental) (HANCOCK, 1999) nas populações, será fundamental para a realização de uma inferência abrangente sobre os processos atuantes sobre o genoma da espécie como um todo.

Com relação as análises demográficas, não foi detectada uma expansão populacional recente nos cachalotes do oceano Atlântico Sul Ocidental, demonstrando que, apesar da espécie como um todo não apresentar expansão populacional neste oceano, as populações residentes estão em uma possível expansão ou crescimento populacional. Para o conjunto de dados mundiais,  $F_s$  de  $F_u$  foi significativamente negativo, fato que é um forte indicador de uma expansão populacional mundial das linhagens femininas de cachalotes. Alexander *et al.* (2016) estimou o tempo de surgimento das populações de cachalote em cada oceano, sugerindo que no Pacífico esse evento ocorreu a aproximadamente 66.900 anos antes do presente, 67.200 anos no oceano Atlântico e a 94.000 anos antes do presente no oceano Índico. Assim, a população ancestral do oceano Índico não estaria em expansão populacional. Apenas a população de cachalotes do oceano Pacífico, por ter a expansão mais recente, este fenômeno estaria ainda em andamento (ALEXANDER *et al.*, 2016), além disso, a análise do Baps entre os oceanos indicou um grupo genético exclusivo neste oceano.

Este último resultado foi corroborado pelas amostras da região sudeste-sul do oceano Atlântico Sul Ocidental, as quais seus cachalotes possuíam haplótipos compartilhados exclusivamente com regiões do oceano Pacífico. O haplótipo E (haplótipos 3 e 4 do presente estudo) foi compartilhado com as populações do Chile, Golfo da Califórnia, Galápagos, Havaí, Costa japonesa, Nova Zelândia, Oregon, Peru, Papua-Nova Guiné e Passagem do Pacífico, e o haplótipo JJ (haplótipo 5 do presente estudo) foi compartilhado com Galápagos.

A determinação do sexo dos cachalotes das diferentes regiões amostradas no Atlântico Sul Ocidental foi essencial para compreendermos a dinâmica de distribuição espacial nesta região, visto que a espécie possui diferenças marcantes entre os sexos (DILLON, 1996; LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; LYRHOLM *et al.*, 1999; WHITEHEAD, 2003; TOLEDO & LANGGUTH, 2009). A hipótese proposta sugerindo a existência de populações reprodutivas diferentes entre nordeste e sudeste-sul do Brasil foi confirmada pelo presente estudo, quando se detectaram 18 fêmeas fora da região tropical (nordeste) todas na região sul (7 encalhes e 11 biópsias no talude).

A maior frequência de fêmeas no Atlântico Sul Ocidental (30 fêmeas e 9 machos) também era esperada devido a distribuição espacial diferenciada da espécie, já que os indivíduos foram amostrados estão entre as latitudes 45-50°N e 40°S, com maior predomínio de fêmeas adultas e neonatos de ambos os sexos (RICE, 1989).

Os espécimes machos adultos foram registrados somente na primavera e verão, possivelmente em função do período de acasalamento, já os neonatos foram registrados em todas as estações do ano, entretanto, os neonatos no Sudeste-Sul ocorreram apenas na primavera e verão, enquanto no nordeste ocorreram apenas no outono e inverno, corroborando os dados encontrados por Ramos *et al.* (2001).

A partição de populações em unidades menores pode ter uma influência importante em muitos processos demográficos e evolutivos, assim, faz-se necessária a identificação de tais unidades para entender a biologia de uma espécie e formular as estratégias mais adequadas para a gestão e a conservação da mesma (PARSONS *et al.*, 2006). Mamíferos marinhos são capazes de se deslocar por grandes distâncias em um ambiente que não possui limites geográficos evidentes, ainda assim, frequentemente exibem forte fidelidade à sítios de reprodução ou alimentação (WOOD, 1998; MATE *et al.*, 1994; MATTHIOPOULOS *et al.*, 2004), sendo que os cachalotes são um grande exemplo disso.

A necessidade de identificar as subdivisões de populações levou ao conceito de "Unidades Evolutivamente Significativas" (ESUs, do inglês *Evolutionarily Significant Units*), que são unidades definidas abaixo do nível de espécies que devem ser priorizadas para proteção (RYDER, 1986; MORITZ, 1994; CHAN *et al.*, 2006; HEDRICK *et al.*, 2006; ROBALO *et al.*, 2007; BOTTIN *et al.*, 2007). A amostragem de um grande número de fêmeas encontradas fora da região tropical no nordeste, além das diferenças observadas de variabilidade genética entre as áreas amostradas no ASO e ao pouco compartilhamento de haplótipos entre as populações estudadas, sugerem que os cachalotes do sudeste-sul do Brasil seriam uma unidade de manejo, potencialmente isolada em termos reprodutivos da população ocorrente na região nordeste,

indicando que há pelo menos duas populações reprodutivas no ASO. Sugerindo assim, duas unidades de manejo para cachalotes no oceano Atlântico Sul Ocidental, apresentando diferenças em seus índices de diversidade genética e haplotípica, haplótipos, grupos genéticos, época de nascimento, sazonalidade de encalhes e habitats. Entretanto, é necessário verificar a divergência significativa de frequência alélica em *loci* nuclear para comprovar que se tratam de possíveis ESUs.

A maior ameaça para os cachalotes, a caça comercial extensiva, cessou, apesar de dez cachalotes serem caçados anualmente pelo Japão sob autorização do IWC Special Permit (CLAPHAM *et al.*, 2003). No entanto, uma série de outras ameaças de várias dimensões permanecem, como o emaranhamento em redes e linhas de pesca (HAASE & FÉLIX, 1994; BARLOW & CAMERON, 2003), níveis elevados de contaminantes em seus tecidos (O'SHEA, 1999; NIELSEN *et al.*, 2000) e ruídos submarinos (WATKINS *et al.*, 1985; BOWLES *et al.*, 1994). Além disso, as taxas máximas de aumento das populações de cachalotes são muito baixas, possivelmente na ordem de 1% ao ano (WHITEHEAD, 2002), evidenciando a importância da preservação da espécie, e de mais estudos que abranjam as características de cada população de cachalotes.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visou contribuir significativamente para ampliar as informações sobre a diversidade genética e a possível estruturação das populações de cachalotes ao longo da costa brasileira e argentina, identificando duas possíveis unidades de manejo. Foi obtida uma melhor compreensão dos padrões de distribuição e estruturação populacional dos cachalotes no Atlântico Sul Ocidental, sugerindo que os cachalotes se distribuem por toda a costa do oceano, mas apresentam diferenças entre o nordeste e o sudeste-sul na costa do Brasil. De acordo com Eizirik (1996), é fundamental que se saiba o quanto as espécies formalmente descritas apresentam subdivisões significativas em termos geográficos, pois as possíveis diferenças populacionais implicam em diferentes estratégias de manejo e conservação ao longo da distribuição da espécie. Dessa forma, sugere-se que as populações de cachalote do nordeste e o sudeste-sul na costa do Brasil mereçam medidas de proteção diferentes e de acordo às ameaças presentes em suas respectivas áreas de ocorrência no Atlântico Sul Ocidental.

Este trabalho avaliou o padrão de distribuição espacial e estruturação populacional desta espécie no Brasil e no oceano Atlântico Sul Ocidental, contribuindo para preencher a lacuna que o Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio dos Planos de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos (ICMBio, 2011a; 2011b), destacou como uma das ações prioritárias para a espécie no Brasil.

Por fim, ressalta-se a importância de analisar os *loci* nucleares para compreender o fluxo gênico intermediado pelos machos (LYRHOLM & GYLLENSTEN, 1998; DUFAULT *et al.*, 1999; LYRHOLM *et al.*, 1999). A avaliação conjunta dos resultados obtidos a partir da análise do DNA mitocondrial e dos microssatélites de cachalote permitirão testar a hipótese de que há estruturação populacional suficiente para proposição de unidades de manejo, ou unidades evolutivamente significativas, dentro da costa brasileira.

## REFERÊNCIAS

- Aasen, E. & Medrano J. F. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. **Nature Biotechnology**, 8, 1279–1281.
- Alexander A.; Steel D.; Slikas B. *et al.* 2013. Low diversity in the mitogenome of sperm whales revealed by next-generation sequencing. **Genome Biology and Evolution**, 5, 113–129.
- Alexander, A.; Steel, D.; Slikas, B.; Hoekzema, K.; Carraher, C.; Parkss, M.; Cronn, R. & Baker, C. S. 2012. Low Diversity in the Mitogenome of Sperm Whales Revealed by Next-Generation Sequencing. **Genome Biology and Evolution**. 5(1):113-129. doi:10.1093/gbe/evs126.
- Alexander, A.; Steel, D.; Hoekzema, K.; Mesnick, S. L.; Engelhaupt, D.; Kerr, I. & Baker, C. S. 2016. What influences the worldwide genetic structure of sperm whales (*Physeter macrocephalus*)? **Molecular ecology**, 25(12), 2754-2772.
- Amante, C. & Eakins, B. W. 2009. ETOPO1 1 arc-minute global relief model: procedures, data sources and analysis. **National Oceanic and Atmospheric Administration**.
- Andriolo, A.; Rocha, J. M.; Zerbini, A. N.; Simões-Lopes, P. C.; Moreno, I. B.; Lucena, A.; Danilewicz, D. & Bassoi, M. 2010. Distribution and relative abundance of large whales in a former whaling ground off eastern South America. **Zoologia** 27 (5): 741–750.
- Avise, J. C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M., Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific Phylogeography - the mitochondrial-DNA bridge between population-genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 489-522.
- Banguera-Hinestroza, E.; Bjørge, A.; Reid, R.; Jepson, P. & Hoelzel, A. 2010. The influence of glacial epochs and habitat dependence on the diversity and phylogeography of a coastal dolphin species: *Lagenorhynchus albirostris*. **Conserv Genet**. 11:1823–1836.
- Barlow, J. & Cameron, G. A. 2003. Field experiments show that acoustic pingers reduce marine mammal by-catch in the California drift gill net fishery. **Marine Mammal Science**. 19(2): 265-283.



- Benson D. A.; Karsch-Mizrachi I.; Clark K.; Lipman D. J.; Ostell J. & Sayers E. W. 2012. GenBank. **Nucleic Acids Research**. 40: D48–D53.
- Benson, D. A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; & Sayers, E. W. 2012. GenBank. **Nucleic Acids Research**. 41(D1), D36-D42.
- Bérubé, M. *et al.* 1998. Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. **Mol Ecol**. 7:585–599.
- Best, P. B. 1970. The sperm whale (*Physeter catodon*) off the west coast of South Africa. Republic of South Africa, Department of Commerce and Industries, Division of Sea Fisheries.
- Bottin, L.; Tassin, J.; Nasi, R. & Bouvet, J. 2007. Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. **Cons Gen** 8:99–109.
- Bowles, A. E.; Smultea, M.; Wursig, B.; Demaster, D. P. & Palka, D. 1994. Relative abundance and behavior of marine mammals exposed to transmissions from the Heard Island Feasibility Test. **Journal of the Acoustical Society of America** 96: 2469-2484.
- Carroll, E. *et al.* 2011. Population structure and individual movement of southern right whales around New Zealand and Australia. **Mar Ecol Prog Ser**. 432:257–268.
- Cassens, I. *et al.* 2005. Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). **Mol Ecol**. 14:107–121.
- Chan, C.; Ballantyne, K. N.; Aikman, H.; Fastier, D.; Daugherty, C. H. & Chambers, G. K. 2006. Genetic analysis of interspecific hybridisation in the world's only Forbes' parakeet (*Cyanoramphus forbesi*) natural population. **Cons Gen** 7(4):493–506.
- Chivers S. J. *et al.* 2007. Genetic variation and evidence for population structure in eastern North Pacific false killer whales (*Pseudorca crassidens*). **Can J Zoolog**. 85:783–794.
- Chivers, S. J.; Leduc, R. G.; Robertson, K. M.; Barros, N. B. & Dizon, A. E. 2005. Genetic variation of *Kogia* spp. with preliminary evidence for two species of *Kogia sima*. **Mar Mammal Sci**. 21:619–634.

- Christal, J. & Whitehead, H. 2001. Social Affiliations within Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) Groups. **Ethology** 107: 323-340. ISSN 0179-1613.
- Clapham, P. J.; Berggren, P.; Childerhouse, S.; Friday, N. A.; Kasuya, T.; Kell, L.; Kock, K.-H.; Manzanilla-Naim, S.; Notarbartolo di Sciara, G.; Perrin, W. F.; Read, A. J.; Reeves, R. R.; Rogan, E.; Rojas-Bracho, L.; Smith, T. D.; Stachowitsch, M.; Taylor, B. L.; Thiele, D.; Wade, P. R. & Brownell Jr., R. L. 2003. Whaling as science. **Bioscience** 53: 210-211.
- Clement, M.; Snell, Q.; Walke, P.; Posada, D. & Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. **Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp** 2:184.
- Corander, J.; Marttinen, P.; Sirén, J. & Tang, J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, 9:539.
- Corander, J. & Tang, J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**, 205, 19-31.
- Costa, A. F.; Siciliano, S.; Emin-Lima, R.; Martins, B. M. L.; Sousa, M. E. M. & Giarrizzo, T. 2017. Stranding survey as a framework to investigate rare cetacean records of the north and north-eastern Brazilian coasts. **ZooKeys**, 688, 111.
- Degrati, M.; García, N. A.; Grandi, M. F.; Leonardi, M. S.; Castro, R. L.; Vales, D. G.; Dans, S. L.; Pedraza, S. N. & Crespo, E. A. 2011. New record of a stranded sperm whale (*Physeter macrocephalus*) and a review of strandings along the continental argentine coast. **Mastozoología Neotropical** 18(2):307-313. ISSN 1666-0536.
- Dillon M. C. 1996. Genetic structure of sperm whale populations assessed by mitochondrial DNA sequence variation. Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. **Dalhousie University Halifax**, Nova Scotia. 130p.
- Drouot, V.; Bérubé, M.; Gannier, A.; Goold, J. C.; Reid, R. J. & Palsbøll, P. J. 2004. A note on genetic isolation of Mediterranean sperm whales (*Physeter macrocephalus*) suggested by mitochondrial DNA. **Journal of Cetacean Research and Management** 6(1):29–32.
- Dufault, S.; Whitehead H. & Dillon, M. 1999. An examination of the current knowledge on the stock structure of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) worldwide. **Journal of Cetacean Research and Management** 1(1):1-10.

- Eizirik, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação, e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Brazilian Journal of Genetics** 19, Suppl.: 23-29.
- Engelhaupt, D.; Hoelzel, A. R.; Nicholson, C.; Frantzis, A.; Mesnick, S.; Gero, S.; Whitehead, H.; Rendell, L.; Miller, P.; Stefanis, R.; Cañadas, A.; Airoidi, S. & Mignucci-Giannoni, A. A. 2009. Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). **Molecular Ecology** 18, 4193–4205. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04355.x.
- Escorza-Trevino, S.; Archer, F.; Rosales, M.; Lang, A. & Dizon, A. 2005. Genetic differentiation and intraspecific structure of Eastern Tropical Pacific spotted dolphins, *Stenella attenuata*, revealed by DNA analyses. **Conserv Genet.** 6:587–600.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources.** 10: 564-567.
- Fu, Y. X. 1996. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. **Genetics** 143: 557–570.
- Georgiadis N.; Bischof L.; Templeton A. *et al.* 1994. Structure and history of African elephant populations: I. Eastern and Southern Africa. **Journal of Heredity**, 85, 100-104.
- Gerber A. S.; Templeton A. R. 1996. Population sizes and within deme movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a grasshopper with a fragmented distribution. **Oecologia.**105, 343–350.
- Gero, S.; Gordon, J. & Whitehead, H. 2015. Individualized social preferences and long-term social fidelity between social units of sperm whales. **Animal Behaviour**, 102, 15–23.
- Gero, S.; Gordon, J.; Carlson, C.; Evans, P. & Whitehead, H. 2007. Population estimate and inter-island movement of sperm whales, *Physeter macrocephalus*, in the Eastern Caribbean Sea. **Journal of Cetacean Research and Management** 9(2):143-150.
- Gero, S.; Milligan, M.; Rinaldi, C.; Francis, P.; Gordon, J.; Carlson, C.; Steffen, A.; Tyack, P.; Evans, P. & Whitehead, H. 2014. Behavior and social structure of the sperm whales of Dominica, West Indies. **Marine Mammal Science** 30: 905-922.

- Golosova O.; Henderson R.; Vaskin Y.; Gabrielian A.; Grekhov G.; Nagarajan V.; Oler A. J.; Quiñones M.; Hurt D.; Fursov M. & Huyen Y. 2014. **Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses**. *PeerJ* 2:e644. doi:10.7717/peerj.644.
- Gómez-Zurita J.; Petitpierre E. & Juan C. 2000. Nested cladistics analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). **Molecular Ecology**, 9, 557–570.
- Haase, B. & Felix, F. 1994. A note on the incidental mortality of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in Ecuador. **Reports of the International Whaling Commission** Special Issue 15: 481-484.
- Hamner, R.; Pichler, F.; Heimeier, D.; Constantine, R. & Baker, C. 2012. Genetic differentiation and limited gene flow among fragmented populations of New Zealand endemic Hector's and Maui's dolphins. **Conserv Genet**. 13:987–1002.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *In*: Goldstein, D.B. & Schlotterer, C. **Microsatellites, Evolution and Applications**.
- Hayano, A.; Amano, M. & Miyazaki, N. 2003. Phylogeography and population structure of the Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, in Japanese waters revealed by mitochondrial DNA. **Genes Genet Syst**. 78:81–91.
- Hedin M. C. 1997. Speciation history in a diverse clade of habitat-specialized spiders (Araneae: Nesticidae: *Nesticus*): Inferences from geographic-based sampling. **Evolution**, 51, 1929–1945.
- Hedrick, P. W.; Lee, R. N. & Hurt, C. R. 2006. The endangered Sonoran topminnow: examination of species and ESUs using three mtDNA genes. **Cons Gen** 7(4):483–492.
- Hoelzel A. R.; Natoli, A.; Dahlheim, M. E.; Olavarria, C.; Baird, R. W. & Black, N. A. 2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences* 269: 1467–1473.

- Hoelzel, A. R. *et al.* 2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. **Proc Roy Soc B Biol Sci.** 269:1467–1473.
- ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. 2011a. **Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: Grandes cetáceos e pinípedes.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 156p.
- ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. 2011b. **Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: Pequenos cetáceos.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 132p.
- INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Pesquisas de Oceanografia.** 2016
- Jaquet N. 1996. How spatial and temporal scales influence understanding of Sperm Whale distribution: a review. **Mammal Review** 26(1): 51-65.
- Jaquet, N.; Gendron, D. & Coakes, A. 2003. Sperm whales in the Gulf of California: residency, movements, behavior, and the possible influence of variation in food supply. **Marine Mammal Science** 19(3):545-562.
- Koressaar, T. & Remm, M. 2007. **Enhancements and modifications of primer design program Primer3** **Bioinformatics** 23(10):1289-91.
- Krützen, M.; Sherwin, W. B.; Berggren, P.; Gales, N. 2004. Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. **Mar Mammal Sci.** 20:28–47.
- Kumar, S.; Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, 33(7):1870–1874.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25: 1451-1452.
- Lyrholm, T. & Gyllensten, U. 1998. Global matrilineal population structure in sperm whales as indicated by mitochondrial DNA sequences. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. **Biological sciences** 265: 1679-1684.

- Lyrholm T.; Leimar, O.; Johanneson, B. & Gyllensten, U. 1999. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. **Biological sciences*** 266: 347-354.
- Magalhães, F. A.; Tosi, C. H.; Garri, R. G.; Chellappa, S. & Silva, F. L. 2008. Cetacean diversity on the Parnaíba Delta, Maranhão state, northeastern Brazil. ***Brazilian Journal of Biology*** 68(3): 545-551.
- Mate, B. R.; Stafford, K. M. & Ljungblad, D. K. 1994. A change in sperm whale (*Physeter macrocephalus*) distribution correlated to seismic surveys in the Gulf of Mexico. ***Journal of the Acoustical Society of America*** 96: 3268-3269.
- Matthiopoulos, J.; McConnell, B.; Duck, C. & Fedak, M. 2004. Using satellite telemetry and aerial counts to estimate space use by grey seals around the British Isles. ***J Appl Ecol*** 41:476–491.
- Meirelles, A. C. O.; Monteiro-Neto, C.; Martins, A. M. A.; Costa, A. F.; Barros, H. M. D. R. & Alves, M. D. O. 2009. Cetacean strandings on the coast of Ceará, north-eastern Brazil (1992–2005). ***Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*** 1-8. doi:10.1017/S0025315409002215.
- Mesnick S. L.; Taylor, B. L.; Archer, F. I.; Martien, K. K.; Escorza-Treviño, S.; Hancock-Hanser, B. L.; Moreno-Medina, S. C.; Pease, V. L.; Robertson, K. M.; Straley, J. M.; Baird R. W.; Calambokidis, J.; Schorr, G. S.; Wade, P.; Burkanov, V.; Lunsford, C.R.; Rendell, L. & Morin, P. A. 2011. Sperm Whale Population Structure in the Eastern and Central North Pacific Inferred by the Use of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Microsatellites and Mitochondrial DNA. ***Molecular Ecology Resource*** 11: 278-298. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02973.x
- Mirimin, L. *et al.* 2009. Population structure of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the North Atlantic Ocean as revealed by mitochondrial and nuclear genetic markers. ***Mar Biol.*** 156:821–834.
- Morin P. A.; Aitken, N. C.; Rubio-Cisneros, N.; Dizon, A. E. & Mesnick, S. 2007. Characterization of 18 SNP markers for sperm whale (*Physeter macrocephalus*). ***Molecular Ecology Notes*** 7: 626–630. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01654.x.

- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**. v.9. 10: 373-375.
- Nielsen, J. B.; Nielsen, F.; Joergensen, P. J. & Grandjean, P. 2000. Toxic metals and selenium in blood from pilot whales (*Globicephala melas*) and sperm whales (*Physeter catodon*). **Marine Pollution Bulletin** 40: 348-351.
- O'Corry-Crowe, G. M.; Suydam, R. S.; Rosenberg, A.; Frost, K. J. & Dizon A. E. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. **Mol Ecol**. 6:955-970.
- Okonechnikov K.; Golosova O. & Fursov M. The UGENE team. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**. 28: 1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091.
- Oremus, M. *et al.* 2009. Worldwide mitochondrial DNA diversity and phylogeography of pilot whales (*Globicephala* spp.). **Biol J Linn Soc**. 98: 729-744.
- O'Shea, T. J. 1999. Environmental contaminants and marine mammals. *In*: Reynolds III, J. E. & Rommel, S. A. **Biology of Marine Mammals**, pp. 485-564. Smithsonian University Press.
- Ott, P. H.; Tavares, M.; Moreno, I. B.; Oliveira, L. R. & Danilewicz, D. 2009. Os cetáceos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Brasil. Capítulo 11. *In*: Mohr, L.V.; Wagner, J. C.; Costa, P. M. & Válka, R. J. **Ilhas Oceânicas Brasileiras: da Pesquisa ao Manejo. Volume II**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Ott, P. H.; Tavares, M.; Secchi, E. R & Di Tullio, J. C. 2013. Cetacea. P. 457-550. *In*: Weber, M. M.; Roman, C. & Cáceres N. C. **Mamíferos do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: UFSM.
- Page, D. C.; Mosher, R.; Simpson, E. M.; Fisher, E. M. C.; Mardon, G.; Pollack, J.; McGillivray, B.; de la Chapelle, A. & Brown, L. G. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091- 1104. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90595-2](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(87)90595-2).

- Parsons, K. M.; Durban, J. W.; Claridge, D. E.; Herzing, D. L.; Balcomb, K. C. & Noble, L. R. 2006. Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Northern Bahamas. **Mar Mamm Sci** 22:276–298.
- Peterson, R. G. & Stramma, L. 1991. **Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean** *Progress Oceanography*, v 26, n. 1, p. 1-73.
- Pimper, L.; Baker, C.; Goodall, R.; Olavarriá, C. & Remis, M. 2010. Mitochondrial DNA variation and population structure of Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) in their southernmost distribution. **Conserv Genet.** 11:2157–2168.
- Ramos R. M. A.; Siciliano. S.; Borobia, M.; Zerbini, A. N.; Pizzorno, J. L. A.; Fragoso, A. B. L.; Lailson-Brito Jr., J.; Azevedo, A. F.; Simoes-Lopes, P. C. & Santos M. C. O. 2001. A note on strandings and age of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) on the Brazilian coast. **Journal of Cetacean Research and Management** 3(3):321-327.
- Rendell L.; Mesnick, S. L.; Dalebout, M. L.; Burtenshaw, J. & Whitehead H. 2012. Can Genetic Differences Explain Vocal Dialect Variation in Sperm Whales, *Physeter macrocephalus*? **Behavior Genetics** 42:332–343. DOI 10.1007/s10519-011-9513-y.
- Rice, D. W. 1989. Sperm whale *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758. **Handbook of marine mammals**, 4, 177-233.
- Richard K. R.; McCarrey S. W. & Wright J. M. 1994. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. **Canadian Journal of Zoology**, 72, 873–877.
- Robalo, J. I.; Doadrio, I.; Valente, A. & Almada V. C. 2007. Identification of ESUs in the critically endangered Portuguese minnow *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980, based on a phylogeographical analysis. **Cons Gen** (in press). doi:10.1007/s10592-006-9275-x.
- Routman E.; Wu R. & Templeton A. R. 1994. Parsimony, molecular evolution, and biogeography: The case of the North American Giant Salamander. **Evolution**, 48, 1799–1809.
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **TREE** 1:9–10.



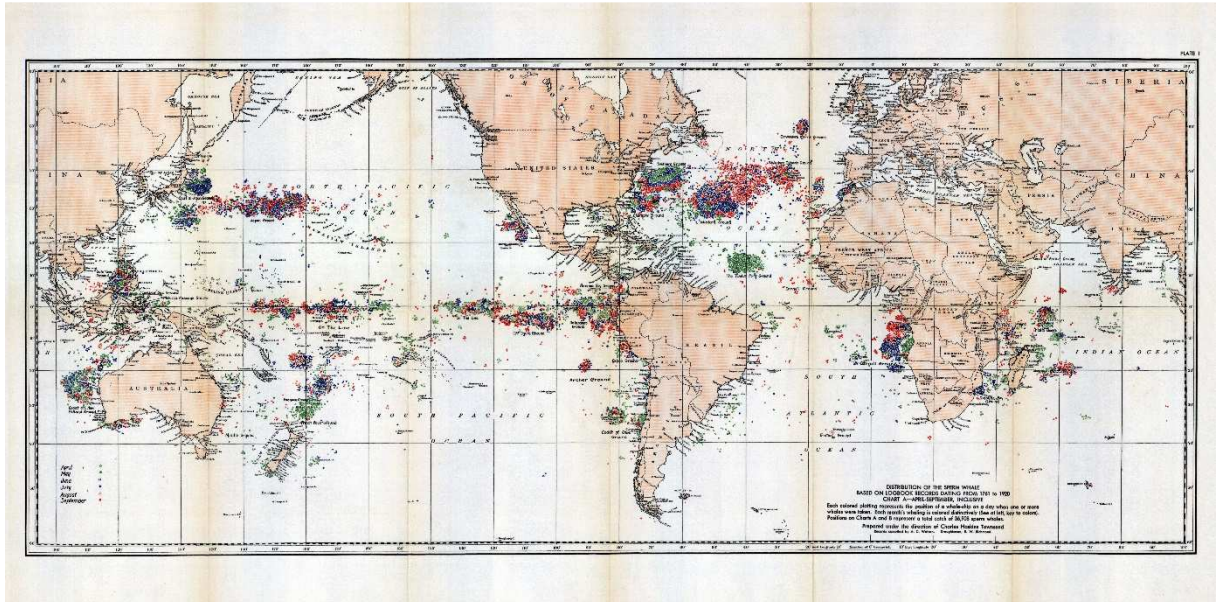
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schaal B. A; Hayworth D. A., Olsen K. M.; Rouscher J. T. & Smith W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, 7, 465–474.
- Shirihai, H. & Jarrett, B. 2006. Whales, Dolphins, and Other Marine Mammals of the World. **Princeton: Princeton Univ. Press**. pp. 21–24. ISBN 0-691-12757-3.
- Siciliano S.; Emin-Lima, N. R.; Costa, A. F.; Rodrigues, A. L. F.; Magalhães, F. A.; Tosi, C. H.; Garri, R. G.; Silva, C. R.; Sousa, J. & Júnior, S. 2008. **Revisão Do Conhecimento Sobre Os Mamíferos Aquáticos Da Costa Norte Do Brasil**. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro 66(2): 1-21.
- Sremba, A. L.; Hancock-Hanser, B.; Branch, T. A.; LeDuc, R. L. & Baker, C. S. 2012. Circumpolar diversity and geographic differentiation of mtDNA in the critically endangered Antarctic Blue whale (*Balaenoptera musculus intermedia*). **PLoS One** 7:e32579.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123: 585-595.
- Tamura, T. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol*, 10: 447–459.
- Templeton A. R.; Crandall K. A. & Sing C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, 132, 619–633.
- Toledo G. & Langguth, A. 2009. Data on biology and exploitation of West Atlantic sperm whales, *Physeter macrocephalus* (Cetacea: Physeteridae) off the coast of Paraíba, Brazil. **Zoologia** 26 (4): 663–673.
- Townsend, C. H. 1935. The distribution of certain whales as shown by logbook records of American whaleships. *Zoologica* 19, No. 1:1-50, 4 charts.
- Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B. C.; Remm, M. & Rozen, S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research** 40(15):e115.

- Vilá, C.; Amorim, I. R.; Leonard, J. A. *et al.* 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the Gray Wolf *Canis lupus*. **Molecular Ecology**, 8, 2089–2103.
- Watkins, W. A.; Moore, K. E. & Tyack, P. 1985. Sperm whale acoustic behaviors in the southeast Caribbean. **Cetology** 49: 15 pp.
- Watwood, S. L.; Miller, P. J. O.; Johnson, M.; Madsen, P. T. & Tyack, P. L. 2006. Deep-diving foraging behaviour of sperm whales (*Physeter macrocephalus*). **Journal of Animal Ecology** 75: 814–825.
- Weir, B. S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38:1358–1370.
- Whitehead H. 2002. Estimates of the current global population size and historical trajectory for sperm whales. **Marine Ecology Progress Series**, 242, 295–304.
- Whitehead H.; Antunes, R.; Gero, S.; Wong, S. N. P.; Engelhaupt, D. & Rendell, L. 2012. Multilevel Societies of Female Sperm Whales (*Physeter macrocephalus*) in the Atlantic and Pacific: Why Are They So Different? **International Journal of Primatology** 33:1142–1164. DOI 10.1007/s10764-012-9598-z.
- Whitehead, H. 2003. **Sperm Whales: social evolution in the ocean**. The University of Chicago Press, Chicago, United States of America. ISBN 0-226-89518-1. 431 pp.
- Wood, C. J. 1998. Movement of bottlenose dolphins around the south-west coast of Britain. **J Zool** 246:155–163.

## APÊNDICE A

**Apêndice A.** Mapa de baleação de cachalotes transcritas de livros de registro de captura de baleias por navios norte-americanos datados de 1761 a 1920, entre os meses de abril a setembro.

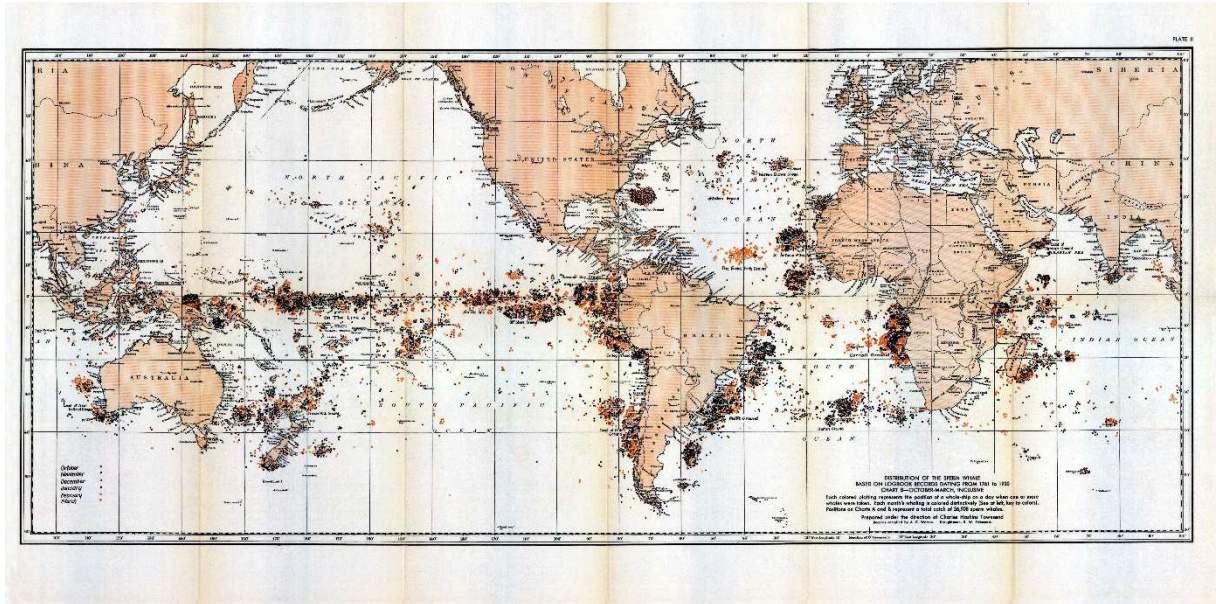
**Fonte:** Townsend (1935).



## APÊNDICE B

**Apêndice B.** Mapa de baleação de cachalotes transcritas de livros de registro de captura de baleias por navios norte-americanos datados de 1761 a 1920, entre os meses de outubro a março.

**Fonte:** Townsend (1935).



## APÊNDICE C

**Apêndice C.** Coordenadas e data de coleta dos espécimes de cachalote (*Physeter macrocephalus*) do presente estudo no oceano Atlântico Sul Ocidental.

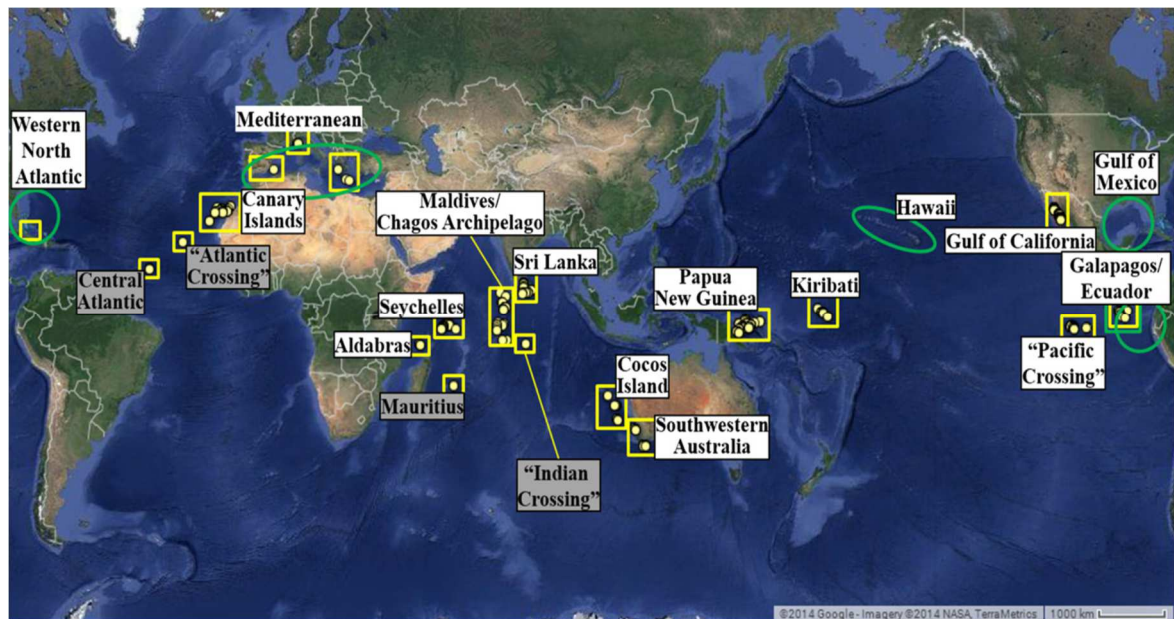
<b>Identificação dos espécimes</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Data de coleta</b>
IA 1221	-31,5850	-49,5050	14/12/2012
IA 1222	-31,5850	-49,5050	14/12/2012
IA 1223	-31,5850	-49,5050	14/12/2012
IA 1224	-30,2202	-47,6137	16/12/2012
IA 1225	-30,2180	-47,6039	16/12/2012
IA 1226	-30,2399	-47,6282	16/12/2012
IA 1227	-30,3152	-47,6647	16/12/2012
IA 1228	-30,3625	-47,6671	16/12/2012
IA 1229	-30,4227	-47,6572	16/12/2012
IA 1230	-30,4999	-47,6610	18/12/2012
IA 1231	-30,4999	-47,6610	18/12/2012
IA 1232	-30,5111	-47,6623	18/12/2012
IA 001	-32,3160	-49,8753	24/05/2011
IA 002	-32,3203	-49,8816	24/05/2011
IA 004	-32,3855	-49,8741	24/05/2011
IA 005	-32,3708	-49,8784	24/05/2011
IA 006	-32,3618	-49,8714	24/05/2011
GEMARS 0570	-30,9737	-50,6759	17/01/1999
GEMARS 0941	-30,6152	-50,4155	22/01/2003
GEMARS 1267	-30,4272	-50,2983	28/12/2005
GEMARS 1274	-30,0552	-50,1537	13/05/2006
GEMARS 1275	-29,8790	-50,0700	16/06/2006
GEMARS 1377	-29,2005	-49,4306	27/01/2010
GEMARS 1427	-29,4849	-49,8360	17/12/2010
AQUASIS 02C0412/280	-03,1309	-39,1337	07/01/2006
AQUASIS 02C0410/281	-03,1715	-39,1123	24/12/2005
AQUASIS 02C0410/303	-03,1437	-39,1332	25/02/2008
AQUASIS 02C0412/307	-03,4290	-38,2821	11/06/2008
AQUASIS 02C0410/308	-03,4227	-38,2751	22/07/2008
AQUASIS 02C0410/338	-03,0633	-39,3038	13/03/2009
AQUASIS 02C0412/348	-02,5313	-41,1604	18/08/2009
AQUASIS 02C0412/434	-03,2818	-38,5545	27/10/2010
AQUASIS 02C0410/477	-03,0847	-39,2649	15/03/2011
AQUASIS 02C0410/495	-03,4632	-38,2552	12/06/2011
AQUASIS 02C0410/530	-03,2306	-39,0526	12/02/2012
AQUASIS 02C0410/532	-03,5951	-38,1351	16/03/2012
AQUASIS 02C0411/542	-03,4303	-38,3120	11/05/2012
AQUASIS 02C0411/564	-03,4319	-38,2358	11/09/2012
GEMM-Lagos 001	-22,9682	-42,0362	10/03/1999

GEMM-Lagos 092	-22,5279	-41,9441	07/11/2005
FURG 16	-32,4261	-52,2659	22/01/2009
FURG 17	-32,4261	-52,2659	17/12/2009
FURG 18	-33,0608	-52,5986	06/12/2011
FURG 14	-33,3043	-53,0346	22/01/2009
FURG 15	-33,3043	-53,0346	22/01/2009
FURG 21	-33,3467	-53,8565	08/02/2012
FURG 20	-33,3863	-52,9044	11/01/2012
FURG 19	-33,1188	-52,6341	11/01/2012
GEMARS 0803	-29,1952	-49,4253	26/05/2001
CENPAT 2	-43,2353	-65,0304	08/04/2010
CENPAT 3	-42,2452	-64,1719	20/07/2011
CENPAT 5	-45,5202	-67,2852	01/01/1986
CENPAT 6	-41,0308	-62,4933	25/06/2014
UFSC 1080	-28,4107	-49,0112	13/06/1989
MN-UFRJ 54999	-22,9682	-42,0362	10/03/1999
BAH 1	-14,5538	-39,0107	17/08/2016
PM 512	-26,2021	-48,3332	03/06/2013
PM 985	-26,1301	-48,3119	17/12/2016

---



## APÊNDICE D



**Apêndice D.** Distribuição de amostras genéticas de cachalotes utilizadas em análises regionais. Os rótulos brancos indicam áreas incluídas no DNA mitocondrial. As amostras coletadas por Alexander *et al.* (2016) foram agregadas em conjunto dentro de 500 km de outra amostra. Isso criou as áreas regionais localizadas mostradas nos retângulos. Amostras adicionais de DNA mitocondrial incluídas em análises provenientes de estudos anteriores em escalas espaciais semelhantes são circundados. Os rótulos cinzentos mostram regiões não incluídas nas análises regionais devido ao pequeno tamanho das amostras, entretanto foram incluídas neste estudo. **Fonte:** Alexander *et al.* (2016).