

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL – UERGS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÊNFASE EM BIOLOGIA
MARINHA**

BRUNA BORDIGNON VIAN

***TURSIOPS* NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL: COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA
IN SILICO COM AS ESPÉCIES DAS BACIAS OCEÂNICAS ADJACENTES**

IMBÉ

2022

BRUNA BORDIGNON VIAN

***TURSIOPS* NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL: COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA
IN SILICO COM AS ESPÉCIES DAS BACIAS OCEÂNICAS ADJACENTES**

Projeto de pesquisa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, convênio Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadores:

Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

Prof. Dr. Ignacio Benites Moreno

IMBÉ

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Vian, Bruna Bordignon
TURSIOPS NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL: COMPARAÇÃO
FILOGENÉTICA IN SILICO COM AS ESPÉCIES DAS BACIAS
OCEÂNICAS ADJACENTES / Bruna Bordignon Vian. -- 2022.
49 f.
Orientadores: Enéas Ricardo Konzen, Ignacio Benites
Moreno.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia
Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Filogenia. 2. Delphinidae. 3. Tursiops. 4.
Região controle. 5. D-loop. I. Konzen, Enéas Ricardo,
orient. II. Moreno, Ignacio Benites, orient. III.
Título.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 Definição de taxa	8
3.2 Definição de sequências: estratégia para busca e compilação	11
3.2 Alinhamento de sequências	12
3.3 Seleção do modelo evolutivo e reconstrução filogenética	12
3.4 Refinamento das análises com sequências específicas	13
3.5 Análise de coordenadas principais	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Árvores filogenéticas	15
4.2 Análise de coordenadas principais	19
4.3 Distância genética	21
5 DISCUSSÃO	22
5.1 DNA mitocondrial	22
5.2 Gênero Tursiops	24
5.3 Material disponível	25
5.4 Morfologia e Genética	26
6. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE 1 - CÓDIGOS UTILIZADOS NO PROGRAMA R	36
APÊNDICE 2 - CÓDIGOS DAS 146 SEQUÊNCIAS SELECIONADAS	41
APÊNDICE 3 - TABELA DE COMPILAÇÃO DE DADOS	46

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por me apoiarem tanto emocionalmente quanto financeiramente e nunca medirem esforços para que eu estudasse e fosse atrás dos meus sonhos. Um agradecimento extra ao meu pai que emprestou o computador dele para que eu conseguisse terminar o trabalho.

Agradeço à minha irmã gêmea, Alice, que além de dividir a barriga comigo durante a gestação também dividiu as dificuldades enfrentadas na elaboração desse estudo. Obrigada por toda ajuda. Desde revisar meus textos, até aprender a cortar as sequências e usar o NCBI.

Agradeço à irmã que a biologia marinha me deu, Célia. Que mesmo a distância me deu apoio psicológico e me ajudou a manter a sanidade mental. Obrigada por todas as vezes que me fez acreditar que ia dar certo.

E, por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus orientadores Enéas e Ignacio. Especificamente, agradeço ao Enéas por despertar em mim o interesse pela genética e ao Ignacio por aceitar ser meu orientador e permitir a inclusão dos golfinhos, que eu tanto gosto, no meu trabalho de conclusão de curso. Agradeço à ambos pela disponibilidade, paciência e apoio durante todo o processo de elaboração desse estudo.

RESUMO

Introdução

O gênero *Tursiops* apresenta uma classificação taxonômica complexa, porém não há dúvidas de que *T. gephyreus* é uma linhagem diferente de *T. truncatus*. Além disso, não há estudos publicados de análise molecular incluindo *T. aduncus*, *T. gephyreus* e *T. truncatus*, sendo assim são necessários mais estudos para esclarecer a relação filogenética entre essas espécies.

Objetivos

Este estudo objetivou realizar uma busca em "silico" das sequências nucleotídicas depositadas do Gênero *Tursiops*, Gervais 1855 com ênfase em *T. gephyreus*, Lahille, 1908. O objetivo foi verificar que marcadores estavam disponíveis e se seria possível realizar análises filogenéticas entre espécies do gênero *Tursiops* do Atlântico Sul Ocidental e bacias oceânicas adjacentes, com o intuito de entender como *T. gephyreus* se relaciona filogeneticamente com outras linhagens do gênero.

Métodos

Realizou-se um levantamento das sequências de *Tursiops* disponibilizadas no GenBank do NCBI. Essas sequências foram alinhadas e utilizadas na construção de uma árvore filogenética. Utilizando sequências selecionadas a partir dessas 1794 sequências iniciais e sequências obtidas posteriormente realizou-se outras duas árvores filogenéticas (utilizando *Sotalia fluviatilis* como grupo externo e outras 6 espécies de Delfinídeos), gráficos de análise PcoA e uma tabela de distância genética.

Resultados

Foram encontradas 1794 sequências, de região controle mitocondrial e D-loop, do Gênero *Tursiops*, sendo 1.106 de *T. truncatus*, 198 de *T. aduncus*, 51 de *T. gephyreus*, 6 de *T. australis*. A partir da construção das árvores filogenéticas, dos gráficos e da tabela de distâncias genéticas observou-se que em todos os métodos *T. gephyreus* e *T. truncatus* agruparam-se.

Discussão

A análise dos resultados demonstrou a baixa quantidade de amostras sequenciadas para *T. gephyreus* e da variedade de marcadores moleculares utilizados para a obtenção das mesmas. Mesmo assim, ao refinar as buscas utilizando sequências de trabalhos selecionados, foi possível hipotetizar algumas relações entre as espécies. O baixo número amostral de sequências e genes de *T. gephyreus* não permitiu realizar análises mais robustas.

Palavras-chave: Filogenia. Região controle. D-loop. *Tursiops*. *Delphinidae*.

ABSTRACT

Introduction

The genus *Tursiops* has a complex taxonomic classification, but there is no doubt that *T. gephyreus* is a different lineage from *T. truncatus*. In addition, there are no published molecular analyses studies *T. aduncus*, *T. gephyreus* and *T. truncatus*, so further studies are needed to clarify the phylogenetic relationship between these species.

Goals

This study was aimed at performing an “*in silico*” search of the nucleotide sequences deposited from the genus *Tursiops*, Gervais, 1855 with emphasis on *T. gephyreus*, Lahille, 1908. The objective was to verify which markers were available and whether it would be possible to perform phylogenetic analysis between species of the genus *Tursiops* from the Western South Atlantic and adjacent ocean basins, in order to understand how *T. gephyreus* is phylogenetically related to other strains of the genus.

Methods

A survey of the *Tursiops* sequences available from NCBI's GenBank was carried out. These sequences were aligned and used in the construction of a phylogenetic tree. Using sequences selected from these 1794 initial sequences and sequences obtained later two other phylogenetic trees were created (using *Sotalia fluviatilis* as an outgroup and another 6 species of Delphinidae), PcoA analysis graphs and a genetic distance table.

Results

A total of 1794 sequences from the mitochondrial control region and *D-loop* of the genus *Tursiops* were found, 1106 from *T. truncatus*, 198 from *T. aduncus*, 51 from *T. gephyreus*, 6 from *T. australis*. From the construction of phylogenetic trees, graphs and the table of genetic distances, it was observed that in all methods *T. gephyreus* and *T. truncatus* were grouped.

Discussion

The analysis of the results demonstrated the low amount of samples sequenced for *T. gephyreus* and the variety of molecular markers used to obtain them. Even so, by refining the searches, using sequences of selected works, it was possible to hypothesize some relationships between the species. The low sample number of *T. gephyreus* sequences and genes did not allow for more robust analyses.

Keywords: Phylogeny. Control region. *D-loop*. *Tursiops*. *Delphinidae*.

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento de delimitações taxonômicas dentro do gênero *Tursiops* Gervais, 1855, é uma tarefa complexa. Desde sua descrição, mais de 20 espécies já foram nomeadas ou transferidas para o grupo, e diversas espécies foram sinonimizadas à *T. truncatus*, que é a espécie-tipo do gênero (Wickert *et al.* 2016). Além disso, variações fenotípicas entre ecótipos costeiros e oceânicos de *Tursiops* estão sendo demonstradas em diversos estudos (e.g. PERRIN *et al.* 2011; SANINO *et al.* 2005). Em estudo anterior, uma espécie nova foi descrita na Austrália, *Tursiops australis* Charlton *et al.* 2006. No Atlântico Sul Ocidental, Barreto (2000), utilizando caracteres fenotípicos (e.g. morfologia e morfometria craniana) e sequências da região controle do mtDNA, sugeriu a presença de duas linhagens de *Tursiops* habitando o sul do Brasil, Argentina e Uruguai, o que está em concordância com o proposto por Lahille (1908), quando descreveu *Tursiops gephyreus*.

Ambas linhagens habitam a costa atlântica da América do Sul, porém *T. truncatus* (golfinho-nariz-de-garrafa) apresenta uma distribuição mais ampla em toda a costa brasileira desde o Pará até o Rio Grande do Sul, habitando regiões mais pelágicas, podendo ser observado, também, em ambientes costeiros. Por sua vez, boto-de-Lahille é encontrado apenas em regiões costeiras do sul do Brasil, Uruguai e Argentina e é uma das espécies de cetáceos mais ameaçadas da América do Sul.

Não existem dúvidas para afirmar que o boto-de-Lahille é uma linhagem diferente das demais espécies do gênero (WICKERT *et al.* 2016; HOHL *et al.* 2020, COSTA *et al.* 2016; SIMÕES-LOPES *et al.* 2019; COSTA *et al.* 2021; FRUET *et al.* 2014), porém não há consenso quanto a sua classificação como espécie. Além disso, ao examinar o histórico de publicações da literatura, não existem, até o momento, trabalhos publicados que examinem concomitantemente as diferentes linhagens de *Tursiops* (*T. truncatus*, *T. aduncus* e *T. gephyreus*) através de marcadores moleculares. Somente estudos utilizando caracteres fenotípicos ou morfológicos foram realizados com as três linhagens (MORENO 2008, HOHL *et al.* 2020). Moreno (2008), investigando as relações filogenéticas da família Delphinidae

encontrou que o boto-de-Lahille é grupo irmão de *T. aduncus* (golfinho-nariz-de-garrafa do Indo-pacífico) e os dois formam um clado irmão com o golfinho-nariz-de-garrafa.

HersHKovitz (1966), sem maiores explicações, sinonimizou o boto-de-Lahille ao golfinho-nariz-de-garrafa do Indo-pacífico e *T. gephyreus* foi perdendo o uso em nível mundial embora muitos trabalhos publicados na Argentina e no Uruguai não deixassem de utilizá-lo (e.g. PILLERI & GIHR 1972, MORENO *et al.* 1984). Sendo assim, um estudo das relações filogenéticas entre as diferentes linhagens/espécies de *Tursiops* é importante para poder determinar como ocorreu a evolução do gênero e, de que forma e em que momento ocorreu a divergência entre as espécies.

O boto-de-Lahille está classificado como vulnerável à extinção em nível mundial de acordo com a lista vermelha da IUCN (VERMEULEN *et al.* 2019), em nível nacional (CONABIO 2021) e em nível Estadual (Rio Grande do Sul, 2014). As principais ameaças à conservação dessa espécie são: capturas acidentais, poluição marinha, pesca e coleta de recursos aquáticos que podem levar ao esgotamento das presas dos botos e perturbações antrópicas causadas por atividades recreativas e turismo. A presença de embarcações pode interferir, inclusive, no sistema de ecolocalização dos botos (BRASIL, 2011). Além disso, devido ao fato de apresentarem hábitos costeiros, estão mais vulneráveis às crescentes perturbações antrópicas, como o desenvolvimento urbano desordenado.

Diante da abordagem realizada, identificar o nível de divergência entre as linhagens do gênero pode ser importante para inferir a sua trajetória evolutiva. Além disso, pode ser um importante passo para verificar se a linhagem é de fato uma espécie ou deve ser considerada uma sub-espécie. Assim será possível que sejam tomadas medidas mais contundentes para a conservação desses botos. Essa última questão é de grande importância, visto que as políticas de conservação utilizam, principalmente, observações a nível de espécie como indicadores de vulnerabilidade populacional e ambiental (ALEIXO, 2009).

O presente estudo teve por objetivo fazer um levantamento detalhado das sequências de *Tursiops* disponíveis no banco de dados GenBank do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e reconstruir, com base nos marcadores moleculares encontrados em comum, as relações filogenéticas entre as linhagens do gênero. Além disso, visou-se avaliar, mais detalhadamente, como o boto-de-Lahille se relaciona filogeneticamente com outras linhagens do gênero.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Para Wickert et al. (2016) e Hohl et al. (2020) existem evidências suficientes para elevar o boto-de-Lahille à espécie. Em um estudo realizado com representantes de *Tursiops* distribuídos ao longo da costa sul e sudeste do Brasil concluiu-se que as duas linhagens que habitam essa região são distinguíveis em campo por características morfológicas como coloração e formato da nadadeira dorsal (SIMÕES-LOPES et al 2019). Nota-se, também, como demonstrado em diversas produções científicas (RIGON, 2015, COSTA et al. 2016; WICKERT et al. 2016; SANTOS, 2015, SIMÕES-LOPES et al. 2019) que variações fenotípicas (crânio, tímpano-periódicos e coluna vertebral) entre elas são muito evidentes. Porém, estudos genéticos e fenotípicos (ver WICKERT et al 2016 e SIMÕES-LOPES et al. 2019) em conjunto com uma ampla amostragem geográfica, podem ajudar a confirmar se as linhagens, representam subespécies ou se, possivelmente, devem ser elevados ao nível de espécie (COSTA et al. 2016).

Não obstante, um estudo comparativo realizado entre os ecótipos costeiro e oceânico do oeste do Atlântico Sul com o ecótipo oceânico do oeste do Atlântico Norte constatou uma maior proximidade genética entre os ecótipos oceânicos do Oeste do Atlântico Sul (OAS) e Oeste do Atlântico Norte (OAN), do que entre os ecótipos oceânico e costeiro do Oeste do Atlântico Sul. Porém, a árvore filogenética apresentada pelo estudo, não refletiu esse resultado. Isso pode ser explicado pelo fato de ter sido analisado apenas um pequeno fragmento mitocondrial, pois a história evolutiva revelada por um gene pode não ser a mesma quando comparada em nível maior, como o genoma inteiro (nuclear + mitocondrial). O uso de dados de sequência mais longos, ou seja, genomas mitocondriais inteiros, pode melhorar a resolução filogenética desses táxons (COSTA et al. 2021). O resequenciamento de genomas nucleares e mitocondriais inteiros em diversas amostras também deverá propiciar um perfil detalhado das relações filogenéticas nos próximos anos.

Uma das ferramentas utilizadas para a análise filogenética é a construção de árvores de parentesco. Para isso, é necessário primeiramente realizar o alinhamento

das sequências de interesse, a partir de programas como o R (R CORE TEAM, 2022) e o MEGA (TAMURA et al., 2021). Posteriormente, seleciona-se o melhor modelo de substituição nucleotídica e o método de reconstrução filogenética. Além disso, realiza-se um teste de reamostragem *bootstrap*, para analisar a confiabilidade dos ramos da árvore.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DEFINIÇÃO DE TAXA

Inicialmente, foram definidas as espécies para as buscas de sequências a serem analisadas no estudo. A espécie *Stenella frontalis* (CUVIER, 1829) foi selecionada devido a estudos que demonstram semelhanças da espécie com o golfinho-nariz-de-garrafa (LeDUC et al. 1999; MORENO, 2008). Os demais representantes do gênero *Stenella* foram selecionados, pois, o gênero *Stenella* Gray, 1866, pertence à subfamília *Delphininae* Fraser & Purves, 1960, assim como o gênero *Tursiops*. Já a seleção de uma espécie do gênero *Steno* Gray, 1846, como grupo externo é baseada no fato de que essa espécie pertence a uma subfamília diferente das demais espécies, a subfamília *Steninae* Fraser & Purves, 1960. De qualquer modo, todas as espécies selecionadas pertencem à família *Delphinidae* Gray, 1821. Em síntese, as espécies selecionadas inicialmente foram: *Tursiops truncatus* (MONTAGU, 1821), *Tursiops aduncus* (EHRENBERG, 1833), *Tursiops gephyreus* Lahille, 1908, *Tursiops australis* Charlton-Robb et al., 2011, *Stenella frontalis* (G. CUVIER, 1829), *Stenella attenuata* (GRAY, 1846), *Stenella clymene* (GRAY, 1850), e *Steno bredanensis* (LESSON, 1828). A espécie *Steno bredanensis* foi definida como grupo externo, no entanto, após as análises filogenéticas, verificou-se a necessidade de substituí-la por *Sotalia fluviatilis*. Nas tabelas 1 e 2, foram compiladas informações a respeito da distribuição, da classificação de acordo com a IUCN e do hábito (costeiro ou oceânico) de cada uma das espécies selecionadas para o estudo. A tabela 1 refere-se aos representantes dos gêneros *Stenella* e *Steno* e a tabela 2 refere-se aos representantes do gênero *Tursiops*.

Tabela 1 - Características das espécies pertencentes aos gêneros *Stenella* e *Steno* selecionadas para este estudo. Status de conservação baseado em: The IUCN red list of threatened species.

	<i>Stenella attenuata</i>	<i>Stenella clymene</i>	<i>Stenella frontalis</i>	<i>Steno bredanensis</i>
Nome comum	Golfinho-pintado-pantropical	Golfinho-de-clymene	Golfinho-pintado-do-Atlântico	Golfinho-de-dentes-rugosos
Distribuição	Ocorrem em todas as águas tropicais e subtropicais dos oceanos Índico, Atlântico e Pacífico	Encontrado apenas no Oceano Atlântico tropical e subtropical (incluindo o Mar do Caribe, Golfo do México e Golfo da Guiné)	Endêmico do oceano Atlântico e são encontrados em águas tropicais e temperadas quentes de 50 ° N à 25-30 ° S de latitude	Habitam águas oceânicas tropicais e temperadas quentes em todos os três principais oceanos, principalmente entre 40 ° N e 35 ° S de latitude.
Status IUCN	Pouco preocupante	Pouco preocupante	Pouco preocupante	Pouco preocupante
Hábito	Oceânico	Oceânico	Oceânico	Costeiro/Oceânico

Tabela 2 - Características das espécies, pertencentes ao gênero *Tursiops* selecionadas para este estudo. Status de conservação baseado em: The IUCN red list of threatened species.

	<i>Tursiops australis</i>	<i>Tursiops aduncus</i>	<i>Tursiops gephyreus</i>	<i>Tursiops truncatus</i>
Nome comum	Golfinho-burrunan	Golfinho-nariz-de-garrafa do Indo-pacífico	Boto-de-Lahille	Golfinho-nariz-de-garrafa
Distribuição	Endêmico do sudeste e sul da Austrália	Distribuição descontínua em águas temperadas quentes e tropicais da região indo-pacífica	Endêmico do Atlântico Sul Ocidental	Distribuição cosmopolita: águas tropicais e temperadas costeiras, costeiras, oceânicas e plataforma continental.
Status IUCN	Não avaliado	Quase ameaçada	Vulnerável	Pouco Preocupante
Hábito	Costeiro	Costeiro	Costeiro	Oceânico/costeiro

(¹) CHARLTON *et al.*, 2011.

3.2 DEFINIÇÃO DE SEQUÊNCIAS: ESTRATÉGIA PARA BUSCA E COMPILAÇÃO

As sequências de nucleotídeos utilizadas no estudo foram obtidas a partir do GenBank do NCBI e foram selecionadas através da aba "POPSET" a partir de termos de busca. Apenas sequências de região controle mitocondrial e *D-Loop* foram encontradas para *T. gephyreus*. De acordo com Bronstein *et al* (2018), a região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) é um segmento não codificante do genoma mitocondrial. Essa região controla a transcrição e replicação do mtDNA (ANDRES, 2017). Comumente, as denominações "região controle" (região não codificante) e "*D-loop*" são utilizadas como equivalentes, porém essa sinonimização não é adequada, já que o *D-loop* não ocupa toda a região controle e pode não estar presente em todas as moléculas de mtDNA a todo momento (NICHOLLS & MINCZUK, 2014). O *D-loop* é uma estrutura estável em forma alça formada por 3 fitas de DNA, a partir da introdução da fita de DNA 7S (NICHOLLS & MINCZUK, 2014) entre as fitas principais da região controle. Sendo assim, foi utilizado um filtro de pesquisa para cada espécie: "*D-Loop*" ou "Control Region" + "nome da espécie". A partir desse filtro foram encontradas: 267 sequências para *S. attenuata*, 20 para *S. clymene*, 339 para *S. frontalis*, 48 para *Steno bredanensis*, 1.106 para *T. truncatus*, 51 para *T. gephyreus*, 198 para *T. aduncus* e 6 para *T. australis*. No total, 2035 sequências foram encontradas. Com base nas sequências, obtidas através da pesquisa, elaborou-se uma tabela contendo o código identificador do conjunto de sequências (POPSET), as características de interesse (número de indivíduos amostrados, área de estudo e em que condições as amostras foram obtidas: biópsia de animais livres, animais em cativeiro, ou carcaças de animais encalhados) dos estudos a partir dos quais as sequências foram obtidas, link de acesso ao artigo, link de acesso à sequência no NCBI e a data de acesso à sequência e ao artigo. A elaboração da tabela teve por objetivo a compilação de dados para posterior verificação caso as sequências apresentassem algum tipo de incoerência no alinhamento ou na construção da árvore filogenética.

3.2 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

O alinhamento foi realizado no programa R (R CORE TEAM, 2021). O algoritmo utilizado para o alinhamento foi o ClustalW. Já o pacote utilizado foi o 'DECIPHER' (WRIGHT, 2016), considerando que para esse estudo foram utilizadas apenas sequências provenientes de segmentos de genomas mitocondriais. Após o alinhamento das 2035 sequências iniciais, foram retiradas as sequências que apresentaram incongruências em relação às demais. Além disso, sequências que se apresentaram mais curtas em relação à quantidade de pares de bases (pb) das sequências de *T. gephyreus* também foram retiradas do estudo. Para prosseguir com a análise, 1794 sequências foram retidas, com um comprimento máximo de 215 pb.

3.3 SELEÇÃO DO MODELO EVOLUTIVO E RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

A reconstrução filogenética também foi realizada no programa R (R CORE TEAM, 2021). Utilizando o critério Bayesiano (*Bayesian Information Criterion* - BIC), buscou-se o melhor modelo de substituição nucleotídica para o alinhamento realizado. Neste estudo, o modelo com menor BIC foi o "HKY+G+I" - Hasegawa-Kishino-Yano + distribuição Gama + proporção de sítios invariáveis. A partir do modelo de substituição nucleotídica, a reconstrução filogenética foi realizada pelo método de máxima verossimilhança seguido de teste de reamostragem *bootstrap* com 500 repetições. O pacote "phangorn" (SHLIEP, 2010) foi utilizado na escolha do melhor método de substituição nucleotídica e na reconstrução filogenética. Além do "phangorn" (SHLIEP, 2010), outros pacotes também foram utilizados na reconstrução filogenética e sua representação gráfica: "rhierBAPS" (TONKIN-HILL *et al.* 2018), "phytools" (REVELL, 2011), "APE" (PARADIS *et al.* 2004) e "ggtree" (YU, 2020). As edições finais da árvore, como as cores dos ramos e o formato da árvore, foram baseadas nos seguintes pacotes: "pegas" (PARADIS, 2010), "ggtree" (YU, 2020), "ggplot2" (GÓMEZ-RUBIO, 2017), "phytools" (REVELL, 2011) e "stats" (R CORE TEAM, 2021).

3.4 REFINAMENTO DAS ANÁLISES COM SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS

Além da árvore filogenética construída a partir das 1794 sequências finais, também foi realizada a construção de uma segunda árvore filogenética contendo sequências selecionadas segundo critérios mais específicos: estudos que obtiveram suas amostras a partir de biópsias de animais vivos e de vida livre foram priorizados em relação aos que utilizaram amostras de animais encalhados mortos e carcaças. O local onde os indivíduos foram amostrados para o estudo também foi considerado, visando assim diminuir amostras de possíveis híbridos ou de indivíduos classificados de forma incorreta. Para as espécies *T. truncatus*, *T. gephyreus*, *T. australis*, *S. frontalis* e *S. clymene* foram escolhidas 32, 31, 6, 20 e 12 sequências, respectivamente, dentro das 1794 sequências que já haviam sido utilizadas para construir a primeira árvore. Já para *T. aduncus* foram obtidas 11 novas sequências pelo NCBI, a partir do artigo de WANG *et al* (1999). E, para *T. truncatus* foram adicionadas 21 sequências novas ainda não publicadas, além das 32 que já estavam no conjunto de dados, disponibilizadas pelos projetos: A Fauna de Odontocetos do Brasil, biogeografia taxonomia: subsídios para a conservação (UFRGS) e Distribuição, riqueza, abundância e uso do habitat pelos cetáceos e aves marinhas entre a costa Brasileira e o Arquipélago de Trindade e Martin Vaz em relação a parâmetros fisiográficos e oceanográficos (FURG). Não foram adicionadas sequências da espécie *Stenella attenuata* na segunda árvore, considerando que elas prejudicaram o alinhamento devido a diferenças no comprimento. A espécie *Steno bredadensis*, foi substituída por *Sotalia fluviatilis*, como grupo externo. Os indivíduos pertencentes à espécie *S. fluviatilis* são animais de água doce que, no Brasil, distribuem-se nos principais afluentes da Bacia do rio Amazonas/Solimões e também podem ser encontrados em drenagens amazônicas do Peru, Colômbia e Equador (DA SILVA *et al.* 2020). Atualmente, esses animais são classificados como "EM PERIGO" pela lista vermelha da IUCN (DA SILVA *et al.* 2020). Foram utilizadas 13 sequências de *S. fluviatilis*, totalizando 146 sequências utilizadas na construção da segunda árvore filogenética, seguindo os mesmos princípios de reconstrução anteriormente descritos. Essas 146 sequências são todas pertencentes a região controle e o comprimento máximo das mesmas foi de 318 pb

(figura 1). Além disso, também foi realizada uma terceira árvore filogenética, utilizando as mesmas 146 sequências, porém separando-as por localidade de amostragem.

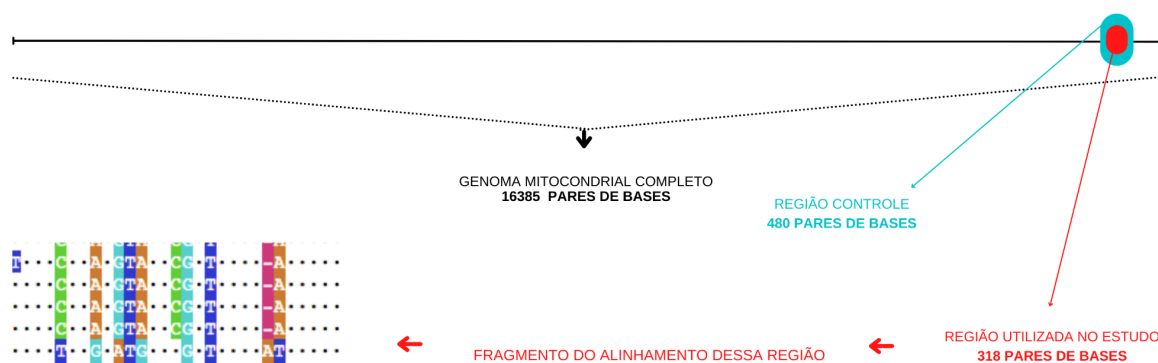


Figura 1 - Esquema demonstrando a localização e o comprimento das sequências utilizadas no estudo, em relação à região controle e ao genoma mitocondrial completo. As sequências utilizadas como referência para a elaboração desse esquema são pertencentes à espécie *T. truncatus*.

Fonte: Autora (2022)

3.5 ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS

Além das árvores filogenéticas, foi realizada uma análise PcoA (Análise de Coordenadas Principais), utilizando as 146 sequências selecionadas para a segunda árvore. Para essa análise utilizou-se o pacote GenAlex 6.5 (PEAKALL *et al.* 2012), como macro executável no Excel. A PCoA foi construída a partir de matriz de distâncias genéticas computadas a partir das sequências, e foi analisada a partir de combinações das três primeiras coordenadas. Não obstante, também foi elaborada uma tabela de distâncias evolutivas e calculado o coeficiente de diferenciação evolutiva (assim como o erro padrão obtido por teste *bootstrap* com 500 repetições), utilizando as mesmas sequências através do programa MEGA 11. O cálculo do coeficiente de diferenciação evolutiva e as reamostragens foram baseadas no modelo Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993), com distribuição gama.

4 RESULTADOS

4.1 ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Foram obtidas três árvores filogenéticas: a primeira árvore (figura 2) - contendo 1794 sequências, a segunda árvore (figura 3) - contemplando 146 sequências e a terceira árvore (figura 4) obtida a partir das mesmas 146 sequências da segunda árvore, porém separadas por local de amostragem. Na primeira árvore, observou-se que: *T. gephyreus* ficou agrupado em um mesmo clado junto a *T. truncatus*, não sendo possível distinguir as espécies. *T. australis* ficou mais próximo de *S. frontalis* do que dos demais representantes do gênero *Tursiops*. Alguns representantes de *T. aduncus* ficaram mais próximos aos representantes dos gêneros *Stenella* e *Steno* e outros ficaram próximos dos representantes do gênero *Truncatus*. Além disso, nota-se a separação da árvore em dois grandes grupos: primeiro, na parte superior agruparam-se os representantes de *T. gephyreus*, a grande maioria das sequências de *T. truncatus* e alguns representantes de *T. aduncus*. Já na parte inferior da árvore, formou-se outro grupo composto por representantes dos gêneros *Stenella* e *Steno*, assim como as sequências de *T. australis* e algumas sequências de *T. truncatus* e *T. aduncus*. *S. bredanensis*, que deveria servir como grupo externo, agrupou-se com *S. frontalis*, *S. attenuata*, *T. australis* e *T. truncatus*.

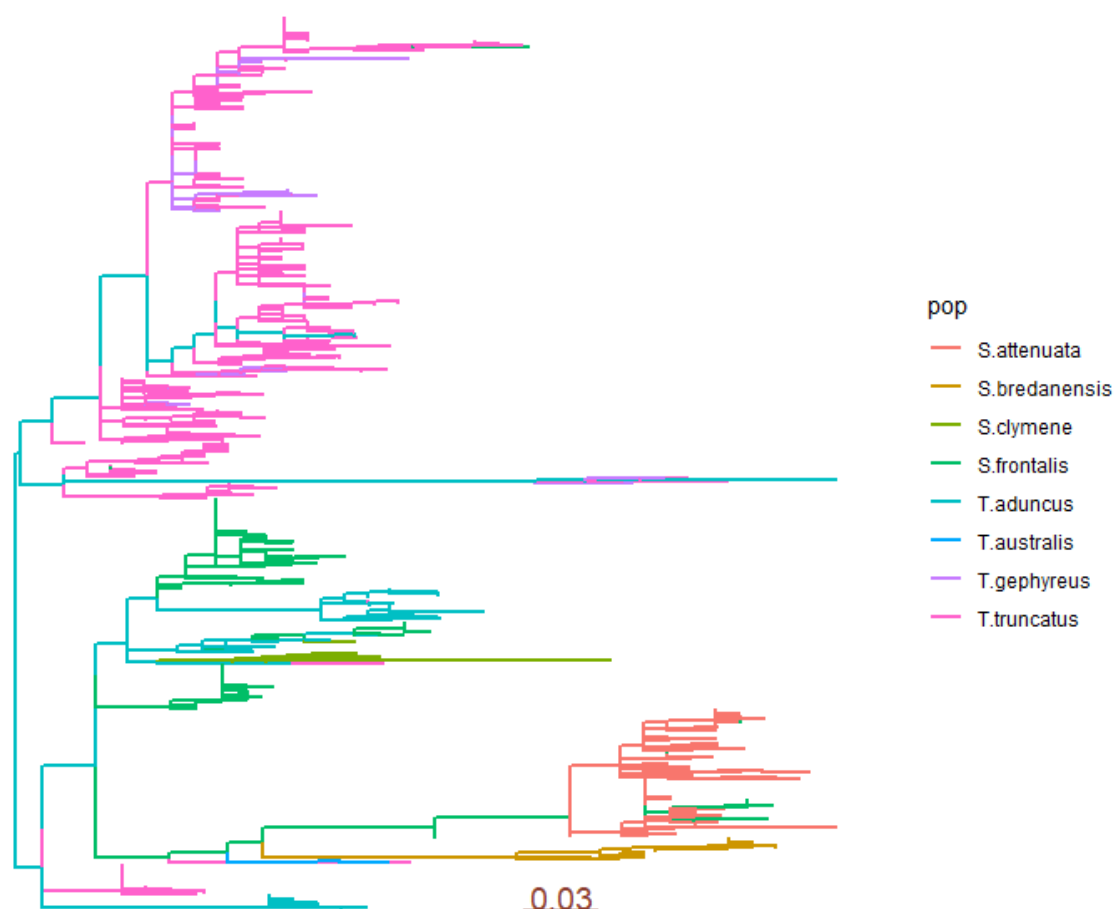


Figura 2 - Primeira árvore filogenética contendo 1794 sequências de região controle com, no máximo, 215 pb de comprimento

Já na segunda árvore nota-se a formação de pequenos subgrupos de *T. gephyreus* e *T. truncatus*, mesmo que essas espécies tenham ficado no mesmo grupo (figura 3). Além disso, *T. australis* ficou mais próximo de *T. gephyreus* e *T. truncatus*. Não obstante, *T. aduncus* agrupou-se com os demais representantes do gênero *Tursiops* e com um representante de *S. clymene*. Também é possível observar um agrupamento consistente entre os demais representantes de *S. clymene* e entre os representantes de *S. frontalis*. Assim como, as sequências de *Sotalia fluviatilis* agruparam-se e formaram um grupo externo evidente.

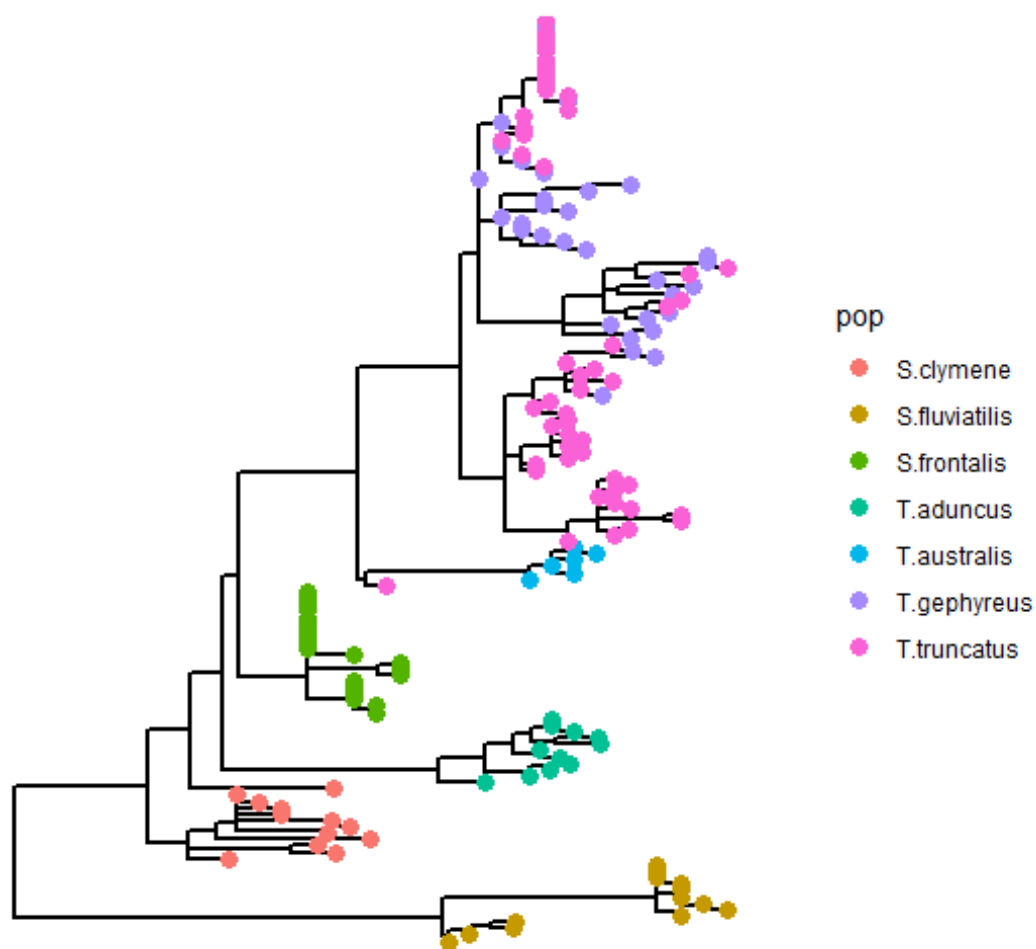


Figura 3 - Segunda árvore filogenética contendo 146 sequências selecionadas com comprimento máximo de 318 pb sem distinção por localização de amostragem.

A terceira árvore segue o mesmo padrão de ramificação da segunda árvore, porém é possível notar uma subdivisão, do grupamento das espécies, de acordo com o local de amostragem (figura 4).

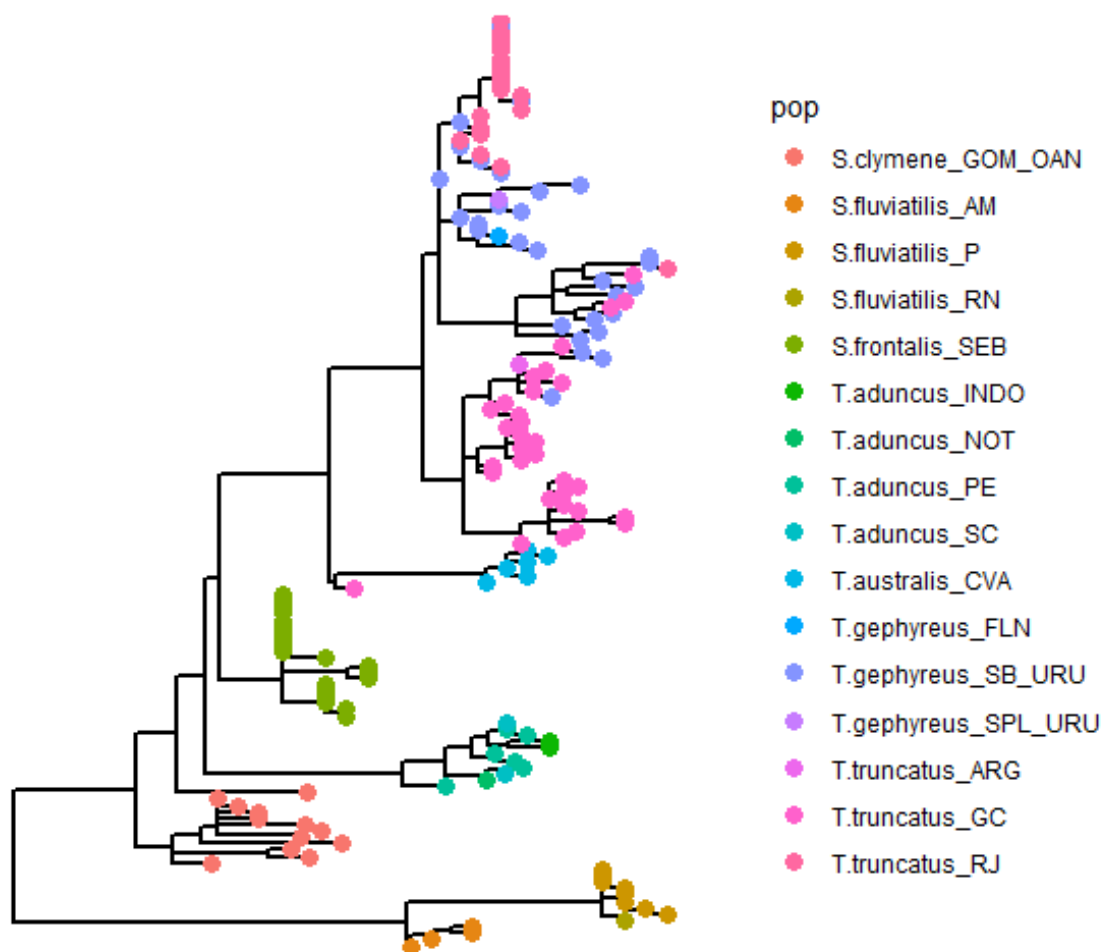


Figura 4 - Terceira árvore filogenética contendo 146 sequências selecionadas com comprimento máximo de 318 pb com distinção por localização de amostragem.

Legenda: GOM = Golfo do México; OAN = Oeste do Atlântico Norte; AM = Amazônia (espécie ribeirinha); P = Pará; RN = Rio Grande do Norte; SEB = Sudeste do Brasil; CVA = Costa de Victória (Sul da Austrália); INDO = Indonésia; SC = Sul da China; NOT = Noroeste do Taiwan; PE = Ilha Penghu (TAIWAN); GC = Golfo da Califórnia; FLN = Florianópolis; SB_URU = Sul do Brasil/Uruguai; SPL_URU = Sul da Lagoa dos Patos/Uruguai; RJ = Rio de Janeiro.

4.2 ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS

Foram obtidos 3 gráficos (figura 5) a partir da análise de coordenadas principais: o gráfico 5-a que explica 40% das variações nucleotídicas; o 5-b, explicando cerca 30% das variações nucleotídicas; o gráfico 5-c que explica cerca de 20% das variações nucleotídicas. A partir da representação dos três gráficos (comparando coordenadas diferentes entre eles), ressalta-se que ao analisar diferentes componentes da variação, a disposição de alguns haplótipos (ou indivíduos) muda de um gráfico para outro (dependendo dos nucleotídeos envolvidos na diferenciação). No gráfico 5-a, *S. frontalis*, *S. clymene* e *T. aduncus* agruparam-se, *T. australis* ficou mais próximo a *T. truncatus*, *T. truncatus* e *T. gephyreus* agruparam-se, mas é possível notar uma subdivisão entre as espécies e as sequências de *S. fluviatilis* formaram um grupo distante das demais espécies. Já no gráfico 5-b, *T. aduncus* formou um grupo isolado e *S. fluviatilis* também formou um grupo isolado, mas ficou mais próxima de *S. frontalis* e *S. clymene*. No gráfico 5-c, apenas *T. aduncus* e *S. fluviatilis* formaram grupos isolados.

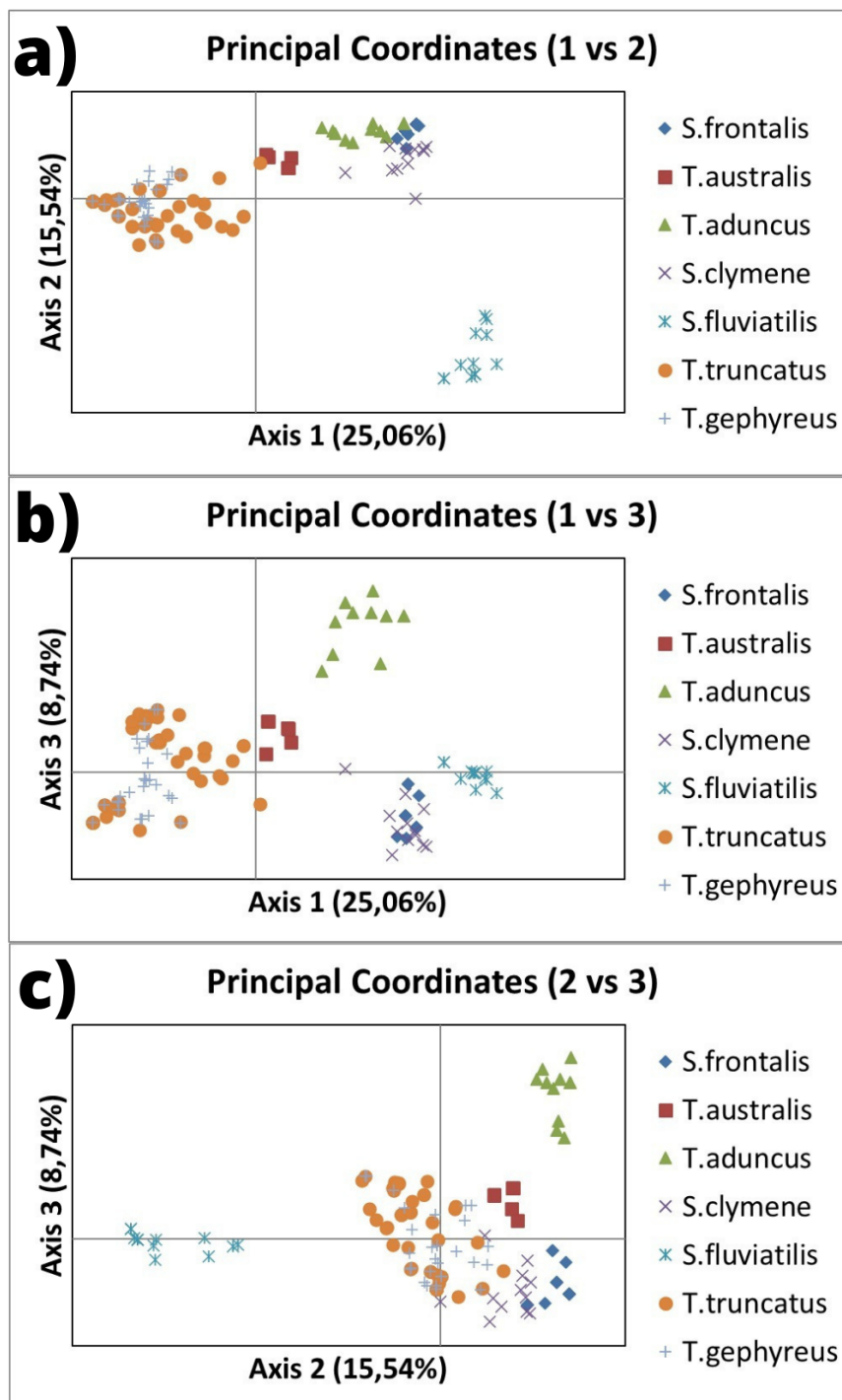


Figura 5 - Gráficos de análise de coordenadas principais

Legenda: a) gráfico combinando a primeira coordenada com a segunda coordenada, b) combinação da primeira coordenada e a terceira coordenada, e c) combinação da segunda coordenada e a terceira coordenada.

4.3 DISTÂNCIA GENÉTICA

Diretamente em nível de sequências, após o alinhamento, 72 variações nucleotídicas foram identificadas, permitindo cálculos de divergência nucleotídica entre as sequências. A partir do que é apresentado na tabela 3, nota-se que *T. gephyreus* e *T. truncatus* apresentarem a menor distância genética, contudo seu valor é diferente de zero o que indica uma diferença evolutiva. Além disso, as distâncias genéticas entre *T. aduncus* e *T. gephyreus* ($D = 0,0638$), e entre *T. aduncus* e *T. truncatus* ($D = 0,0625$), tiveram resultados intermediários com relação aos demais valores encontrados. Em contrapartida, as maiores distâncias foram obtidas ao comparar a espécie *S. fluvialis* com as demais espécies.

Tabela 3 - Relação de distâncias genéticas entre as diferentes espécies (¹).

	<i>S. frontalis</i>	<i>T. australis</i>	<i>T. aduncus</i>	<i>S. clymene</i>	<i>S. fluvialis</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>T. gephyreus</i>
<i>S. frontalis</i>							
<i>T. australis</i>	0,0513						
<i>T. aduncus</i>	0,0455	0,0658					
<i>S. clymene</i>	0,0388	0,0628	0,0596				
<i>S. fluvialis</i>	0,0758	0,0976	0,0947	0,0792			
<i>T. truncatus</i>	0,0476	0,0500	0,0625	0,0577	0,0805		
<i>T. gephyreus</i>	0,0491	0,0511	0,0638	0,0604	0,0861	0,0239	

(¹) O coeficiente de divergência evolutiva do presente estudo foi de 0.65 e o erro padrão de 0.04.

Fonte: Autora (2022)

5 DISCUSSÃO

5.1 DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial é amplamente empregado em análises filogenéticas de representantes da infraordem Cetacea (KINGSTON *et al.* 2009). Fato esse que foi refletido no presente estudo, tendo em vista que o único tipo de sequência disponível para todas as espécies do estudo foi proveniente da região controle do DNA mitocondrial. Porém, a análise filogenética utilizando apenas um *locus* apresenta limitações, mesmo com a alta taxa de mutações que a região controle mitocondrial apresenta. Essa alta taxa de mutações se deve à falta de histonas protetoras da estrutura do DNA, sistemas de reparo de DNA ineficazes e à constante exposição aos efeitos dos radicais de oxigênio (SHARMA *et al.* 2005). Uma das limitações de análises filogenéticas que utilizam apenas um gene, como é o caso do mtDNA, é a de que elas levam à uma percepção limitada da história evolutiva de espécies proximalmente relacionadas, já que ao utilizar uma informação tão específica, as variações entre os *loci* são frequentes (KINGSTON *et al.* 2009). Além disso, a região controle apresenta pouco poder de resolução para a filogenia de *Delphininae*, já que a recente radiação do grupo faz com que o mtDNA apresente altos níveis de divergência intraespecífica e baixos níveis de variação interespecífica (KINGSTON *et al.* 2009). Além disso, a pequena distância genética apresentada entre *T. gephyreus* e *T. aduncus*, pode ser devido às limitações da utilização apenas da região controle para análise.

Todavia, a utilização de mtDNA em análises filogenéticas também apresenta benefícios como: (i) praticidade, visto que existem mais primers e marcadores genéticos bem definidos para o mtDNA do que para o DNA nuclear (RUBINOFF & HOLLAND, 2005); (ii) eficácia para medir a hibridação, tendo em vista que a baixa taxa de recombinação do mtDNA sugere que as posições dos genes mitocondriais introgressam juntas, em bloco (SMITH, 1992); (iii) efetividade para inferir relações genealógicas evolutivas tanto entre quanto dentro de populações, já que as sequências de mtDNA, geralmente, evoluem de forma mais rápida do que

sequências nucleares (BROWN et al., 1979; KOCHER, 1991; RUBINOFF & HOLLAND, 2005), a quantidade de sítios variáveis e informativos, frequentemente, é maior no mtDNA do que no nuclear (RUBINOFF & HOLLAND, 2005). Também é útil para análises em nível de espécie e gênero, devido às maiores taxas de substituição nucleotídica (RUBINOFF & HOLLAND, 2005).

Outro aspecto controverso da utilização de mtDNA para análise filogenética é o fato de esse gene refletir apenas a herança materna e sendo assim, não refletiria a herança genômica real. Porém, a mitocôndria apresenta funções essenciais para a sobrevivência celular e, sendo assim, sua herança e seus padrões de seleção representados no seu genoma não são informações banais (RUBINOFF & HOLLAND, 2005).

Além da região controle, as sequências mitocondriais de citocromo B (CytB), também são bastante utilizadas em análises filogenéticas (ROSA & PAIVA, 2009). Inclusive foram encontradas diversas sequências de CytB, para a maioria das espécies, durante a pesquisa de sequências no NCBI para o presente estudo, porém não foram encontradas sequências dessas regiões do mtDNA para *T. gephyreus*. Isso impossibilitou a utilização de sequências dessas regiões no estudo. Apesar de o CytB apresentar um padrão de menor taxa de mutações do que da região controle em mamíferos (TAMADA *et al.* 2005), essa região pode ser mais confiável do que a região controle para identificar espécies relacionadas que não estão completamente classificadas ainda (AMARAL *et al.*, 2017). Não obstante, diferentes regiões mitocondriais podem ser mais ou menos informativas para determinados grupos taxonômicos (DUCHÊNE *et al.* 2011). Sendo assim, a utilização de sequências obtidas a partir de outros marcadores mitocondriais poderia aumentar a resolução da análise filogenética.

5.2 GÊNERO *TURSIOPS*

Existem algumas questões relacionadas ao gênero *Tursiops* que podem apresentar alguma influência no resultado final das árvores filogenéticas. Como os problemas taxonômicos apresentados entre os representantes dos gêneros *Tursiops* e *Stenella*. De acordo com Perrin *et al* (1987), *S. frontalis* e *T. truncatus* apresentam um padrão de coloração muito parecido. Além disso, um estudo que realizou uma análise cladística de *Delphinidae*, demonstrou que *T. aduncus* não ficou como grupo irmão de *T. truncatus* e ficou proximalmente relacionado com *S. frontalis* (LeDuc *et al.* 1999), o que também foi verificado no presente estudo. Devido a essas dificuldades na classificação dos indivíduos pertencentes a ambos os gêneros, Moreno (2008) sugeriu uma nova classificação de *Delphinidae* para torná-los monofiléticos. Perrin *et al.* (2017) sugeriram, que, devido às dificuldades de resolver as relações filogenéticas da sub-família Delphininae, principalmente devido à parafilia de *Tursiops* e *Stenella*, uma solução poderia ser de fundir todas essas espécies dos gêneros *Lagenodelphis*, *Stenella*, *Sousa* e *Tursiops* no gênero *Delphinus*. Entretanto Wang (2014) e Jefferson (2014), sugerem que essa opção não seria a mais adequada. Eles apontam, entre outras coisas, que o super gênero *Delphinus* embora possa solucionar a monofilia da sub-família, traria instabilidade taxonômica, poderia potencializar os problemas de conservação de algumas espécies e que estudos futuros podem ajudar a trazer mais resolução para este tema tão desafiador.

Neste estudo, as espécies *T. truncatus* e *T. gephyreus* ficaram no mesmo agrupamento em ambas as árvores, a partir do fragmento de região controle utilizado. Porém, outros indícios, como por exemplo características morfológicas (WICKERT, 2013, HOHL, et al 2020, RIGON 2015, SANTOS 2016), demonstram divergências entre as espécies. Assim é necessário que mais marcadores moleculares sejam integrados a estudos fenotípicos para poder entender melhor a complexa história evolutiva do gênero *Tursiops* e principalmente do boto-de-Lahille. Esta espécie endêmica do Oceano Atlântico Sul Ocidental se encontra em risco iminente de desaparecer para sempre. Identificar corretamente o status taxonômico de linhagens ameaçadas de extinção é importante do ponto de vista da conservação

e manejo, pois vale lembrar que quando Rice (1998) sinonimizou as duas linhagens de *Platanista* os esforços de conservação se diluíram (JEFFERSON, 2014).

5.3 MATERIAL DISPONÍVEL

O tamanho e o tipo de marcador molecular das sequências utilizadas no estudo foram limitados pelo material disponível para *T. gephyreus* no NCBI, demonstrando a pouca quantidade de sequências disponíveis para essa espécie. Sendo assim, seria necessário intensificar o sequenciamento genético de *T. gephyreus* utilizando não só marcadores moleculares mitocondriais, mas também nucleares. Tendo em vista que análises filogenéticas que utilizam sequências mitocondriais e nucleares associadas podem apresentar uma melhor resolução (RUBINOFF & HOLLAND, 2005). Além disso, a busca por sequências que se encaixassem nos critérios, estabelecidos no estudo, evidenciou que alguns dados relevantes para esse tipo de análise não são especificados em alguns estudos. Como por exemplo a discriminação da condição do animal no momento da coleta (animais vivos ou carcaças) para cada sequência obtida no estudo. Apesar de, na maioria dos estudos analisados, ser informado como foram obtidas as amostras, não há um detalhamento posterior dessas informações para cada sequência gerada pelo estudo. Ao considerar que amostras provenientes de animais encalhados mortos podem apresentar algum nível de dano ao DNA, essas informações são essenciais para a elaboração de um estudo filogenético consistente. Além disso, ao utilizar apenas amostras de carcaças pode-se subestimar a diferenciação genética populacional e dificultar a determinação da localização natural dos indivíduos (BILGMANN *et al.* 2011). Além disso, segundo Min e Hickey (2007) o tamanho das sequências moleculares é diretamente proporcional à resolução dos nós mais internos da árvore filogenética, quanto menor o tamanho da sequência menor a resolução.

É importante salientar que embora as sequências disponíveis no NCBI tenham sido bastante limitadas, tanto no tipo de marcador quanto no número de sequências para cada espécie, estudos, *in silico* como este, podem trazer diversas

questões para ampliar o conhecimento. Isso se torna ainda verdadeiro em tempos de Pandemia de COVID 19 onde não foi possível desenvolver outros tipos de trabalhos em que era necessário atividade presencial.

5.4 MORFOLOGIA E GENÉTICA

Além disso, o processo de especiação pode não levar a mudanças morfológicas e moleculares em uma mesma taxa ou que sigam uma determinada ordem, considerando que substituições nucleotídicas neutras não refletem mudanças funcionais (SCHWARTZ & BONESS, 2017). Como por exemplo, mutações silenciosas que não alteram o aminoácido que é produzido na cadeia polipeptídica. Assim como, uma pequena quantidade de genes ou até mesmo um único gene pode levar a mudanças fenotípicas que impeçam a reprodução entre os indivíduos (SCHWARTZ & BONESS, 2017). Não obstante, a espécie *T. truncatus* é considerada uma espécie plástica em relação aos seus hábitos alimentares (SHANE, 1990), que mudam de acordo com a distribuição. Essa plasticidade às condições ambientais pode fazer com que o indivíduo apresente mudanças morfológicas antes mudanças genéticas (CROZIER & HUTCHINGS, 2014). Um estudo analisando a estrutura genética populacional de *Stenella frontalis* ao longo de sua distribuição, utilizando a região controle mitocondrial como marcador, constatou que a contribuição de fatores ambientais na variação genética não pode ser desconsiderada (AMARAL *et al.* 2021).

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pelo presente estudo observou-se que os marcadores utilizados não apresentaram a mesma discriminação de outros marcadores moleculares e de característica morfológicas para *T. gephyreus* e *T. truncatus*. Não obstante, existe a possibilidade de que as diferenças morfológicas observadas entre *T. gephyreus* e *T. truncatus* não sejam refletidas em nível molecular. Além disso, existem poucas sequências de *T. gephyreus* e, as sequências disponíveis apresentam reduzida variação nucleotídica (somente região controle mitocondrial). Sendo assim, seriam necessários novos estudos utilizando mais genes e o ressequenciamento de genomas completos, principalmente devido ao fato de *T. gephyreus* ser uma espécie ameaçada de extinção, tanto a nível regional quanto nacional e internacional. Destaca-se também a importância dos bancos de dados de sequências para esse tipo de estudo com análise filogenética e a relevância de refinar as sequências a serem utilizadas na análise, averiguando os artigos dos quais as sequências foram obtidas.

O detalhamento e a discriminação do método de coleta da amostra, utilizado para cada sequência, no estudo de origem são essenciais para possibilitar o refinamento da análise que utilizará os dados do mesmo. Não obstante, verificar os dados do estudo de onde as sequências são provenientes também é pertinente para certificar-se de que a identificação da espécie descrita na sequência está correta. Essa verificação foi importante, tendo em vista que algumas espécies podem ser confundidas e classificadas erroneamente. Além disso,, para algumas sequências utilizadas no presente estudo, amostras de *T. gephyreus* foram descritas inicialmente como *T. truncatus* pois foram publicadas antes da revalidação de *T. gephyreus*. Somente foi possível identificar a espécie de forma correta analisando o artigo de origem das mesmas à luz do conhecimento atual.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, A. Conceitos de espécies e suas implicações para a conservação. **Megadiversidade**, v. 5, n. 1 - 2, dez. de 2009. Disponível em: <https://www.caiobrito.com/uploads/2/8/0/7/28072945/aleixo_2009_conceito_de_espcie.pdf>. Acesso em: 25 de ago. de 2011.

AMARAL, A. R.; SEQUEIRA, M.; MARTÍNEZ-CEDEIRA, J.; *et al.* New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers. **Marine Biology**, v. 151, n. 5, p. 1967–1976, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00227-007-0635-y>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

AMARAL, K. B. *et al.* Seascape Genetics of the Atlantic Spotted Dolphin (*Stenella frontalis*) Based on Mitochondrial DNA. **Journal of Heredity**, v. 112, n. 7, p. 646–662, 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jhered/article/112/7/646/6359135>>. Acesso em: 10 maio 2022.

ANDRES, M. P. Estudo de polimorfismos da região controladora (D-loop) do DNA mitocondrial em amostra de mulheres brasileiras com endometriose. 2017. Disponível em <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5139/tde-29112017-082155/publico/MarinadePaulaAndres.pdf>>. Acesso em: 03 de abr. de 2022.

BARRETO, A. Variação Craniana e Genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) na Costa Atlântica da América do Sul. Publicado em março de 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268400969_Variacao_Craniana_e_Genetica_de_Tursiops_truncatus_Delphinidae_Cetacea_na_Costa_Atlantica_da_America_do_Sul>. Acesso em: 19 de ago. de 2021.

BILGMANN, Kerstin *et al.* The Use of Carcasses for the Analysis of Cetacean Population Genetic Structure: A Comparative Study in Two Dolphin Species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3105009/>>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BRAULIK, G. *et al.* *Tursiops aduncus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T41714A50381127.en.>>. Acesso em: 07 de nov. de 2021

BRAULIK, G; JEFFERSON, TA. *Stenella frontalis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T20732A50375312.en.>>. Acesso em: 07 de nov. de 2021.

BRONSTEIN *et al.* Mind the gap! The mitochondrial control region and its power as a phylogenetic marker in echinoids. **BMC Evolutionary Biology**. 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5977486/>>. Acesso em: 04 de abr. de 2022.

Committee on Taxonomy. List of Marine Mammal Species and Subspecies. **The Society for Marine Mammalogy**, jun. de 2021. Disponível em: <<https://marinemammalscience.org/science-and-publications/list-marine-mammal-species-subspecies/>>. Acesso em: 18 de ago. de 2021;

CHARLTON-ROBB, K. et al. A new dolphin species, the burrunan dolphin *Tursiops australis* sp. nov., endemic to Southern Australian coastal waters. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 14 set. 2011. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

COSTA, A. P. B. et al. Offshore and coastal common bottlenose dolphins of the western South Atlantic face-to-face: What the skull and the spine can tell us. **Marine Mammal Science**, v. 32, n. 4, p. 1433–1457, 1 out. 2016. Acesso em: 18 de ago. de 2021.

COSTA, Ana. P. B. *et al.* Ecological divergence and speciation in common bottlenose dolphins in the western South Atlantic. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 34, p.16-32, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mms.12342>>. Acesso em: 17 de ago. de 2021.

CROZIER, Lisa G.; HUTCHINGS, Jeffrey A. Plastic and evolutionary responses to climate change in fish. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 1, p. 68–87, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.12135>>. Acesso em: 10 maio 2022.

DA SILVA, V. *et al.* *Sotalia fluviatilis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2020. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/190871/50386457#habitat-ecology>>. Acesso em: 31 de mar. de 2022.

DUCHÊNE, Sebastián; ARCHER, Frederick I.; VILSTRUP, Julia; et al. Mitogenome Phylogenetics: The Impact of Using Single Regions and Partitioning Schemes on Topology, Substitution Rate and Divergence Time Estimation. **PLOS ONE**, v. 6, n. 11,, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027138>>. Acesso em: 13 de abr. de 2022.

FRUET, P. F et al. Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 4, p. 879–895, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10592-014-0586-z>>. Acesso em: 17 abr. 2022.

GÓMEZ-RUBIO, V. ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition) . **Journal of Statistical Software**, v. 77, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.18637/jss.v077.b02>>. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

HERSHKOVITZ, P. Catalog of Living Whales. **Smithsonian Institution**, Washignton, 1966. Disponível em:<https://zmmu.msu.ru/files/%D0%91%D0%B8%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0%20%D0%9F%D0%B0%D0%B2%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0/hershkovitz-1966_catalog_living_whales.pdf>. Acesso em: 20 de ago. de 2021.

HOHL, L. S. L. et al. Skull morphology of bottlenose dolphins from different ocean populations with emphasis on South America. **Journal of Morphology**, v. 281, n. 6, p. 564–577, 1 jun. 2020. Acesso em: 19 de ago. de 2021.

ICMBio - Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade. Portaria nº 58, de 12 de julho de 2011. (Plano de Ação Nacional para Conservação de Pequenos Cetáceos). Brasília: DOU de 15/07/2011. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

JEFFERSON, T. A. Taxonomy of dolphins of the subfamily Delphininae. **Marine Mammal Science**. 2014. Acesso em: 17 de abr. de 2022.

JEFFERSON, T. A., BRAULIK, G. *Stenella clymene*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em :<<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T20730A50373865.en.>>. Acesso em: 07 de nov. de 2021.

KINGSTON, Sarah *et al.* Testing mitochondrial sequences and anonymous nuclear markers for phylogeny reconstruction in a rapidly radiating group: Molecular systematics of the Delphininae (Cetacea: Odontoceti: Delphinidae). **BMC evolutionary biology**. 2009. Disponível em: "https://www.researchgate.net/publication/26878517_Testing_mitochondrial_sequences_and_anonymous_nuclear_markers_for_phylogeny_reconstruction_in_a_rapidly_radiating_group_Molecular_systematics_of_the_Delphininae_Cetacea_Odontoceti_Delphinidae". Acesso em: 24 de mar. de 2021

KISZKA, J. *et al.* *Steno bredanensis* (versão de errata publicada em 2020). **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T20738A178929751.en.>>. Acesso em: 07 nov. de 2021.

KISZKA, J., BRAULIK, G. *Stenella attenuata*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T20729A50373009.en.>>. Acesso em: 07 de nov. de 2021.

LAHILLE, F. Nota sobre un delfín. Anales del Museo Nacional de Buenos Aires, p. 347-367, 1908. Acesso em: 20 de ago. de 2021

LEDUC, R. G. *et al.* Phylogenetic relationship among the delphinid cetaceans based on full cytochrome B sequences. **Marine Mammal Science**, v. 15, n. 3, p. 618-648, jul. de 1999. Disponível em: <AJWQF2VizNIAAAAA:JdhhTvUCk9IWxlsTa7Q7ahb06mn_aHQrgmEpxcwQev9_ikV3E7eOSduUwBfz5B2qq5YUyTrvOgPJbVRg>. Acesso em: 08 de nov. de 2021.

MIN, XIANG JIA; HICKEY, DONAL A. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 365–373, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1890918/>>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MORENO, I. Relações filogenéticas entre os golfinhos da família Delphinidae. 2008, Porto Alegre. Acesso em: 15 de set. de 2021.

MORENO, V. *et al.* Distribución de mercurio total en los tejidos de un delfín nariz de botella *Tursiops gephyreus* (Lahille, 1908) de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). **Revista de investigación y desarrollo pesquero**, n. 04, 1984. Disponível em: <268448408_Distribucion_de_mercurio_total_en_los_tejidos_de_un_delfin_nariz_de_botella_Tursiops_gephyreus_Lahille_1908_de_la_Provincia_de_Buenos_Aires_Argentina>. Acesso em: 14 de abr. de 2022.

NICHOLLS, T. J. & MINCZUK M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. **Experimental Gerontology**, v. 56, p. 175-181, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556514001181>>. Acesso em: 04 de abr. de 2022.

PARADIS, E. *et al.* APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, p. 289–290, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/20/2/289/204981?login=false>>. Acesso em: 04 de abr. de 2022.

PARADIS, E. pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. **Bioinformatics**, 2010. Disponível em: <[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20080509/#:~:text=Summary%3A%20pegas%20\(Population%20and%20Evolutionary,packages%20\(ape%20and%20adegenet\).>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20080509/#:~:text=Summary%3A%20pegas%20(Population%20and%20Evolutionary,packages%20(ape%20and%20adegenet).>)>. Acesso em: 04 de abr. de 2022.

PEAKALL, R. *et al.* GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, V. 28, p. 2537 - 2539, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/19/2537/288671>>. Acesso em: 02 de abr. de 2022.

PERRIN, W. F.; MITCHELL, E. D.; MEAD, J. G.; et al. REVISION OF THE SPOTTED DOLPHINS, STENELLA SPP. **Marine Mammal Science**, v. 3, n. 2, p. 99–170, 1987. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.1987.tb00158.x>>. Acesso em: 16 abr. 2022.

PERRIN, W. F. *et al.* Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: Cranial differentiation of coastal and offshore ecotypes. **Marine Mammal Science**, v. 27, n. 4, p. 769-792, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1748-7692.2010.00442.x?casa_token=PevH4Dkpn-0AAAAA%3A11dp9RkxvUJOC0_dEV6ZKgpZd9KRwwSESdg89nYD77S3ITxH-VvqyMdU9j46PMkZtfVdrAj6Js3v20k>. Acesso em: 11 de out. de 2021.

PILLERI, G.; GIHR, M. Contribution to the knowledge of the cetaceans of Pakistan with particular reference to the genera *Neomeris*, *Sousa*, *Delphinus* and *Tursiops* and description of a new Chinese porpoise (*Neomeris asiaeorientalis*). **Investigations on Cetacea**, 1972. Disponível em: <<https://porpoise.org/library/contribution-knowledge-cetaceans-pakistan-particular-reference-genera-neomeris-sousa-delphinus-tursiops-description-new-chinese-porpoise-neomeris-asiaeorie/>>. Acesso em: 14 de abr. de 2022.

REVELL, L.J. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). **Methods in Ecology and Evolution**, 2011. Disponível em: <<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>>. Acesso em: 04 de abr. de 2022.

RIGON, C. T. O complexo tímpano-periótico do gênero *Tursiops* (CETARTIODACTYLA: DELPINIDAE) no Atlântico Sul Ocidental. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/142172>>. Acesso em: 17 de abr. de 2022.

ROSA, A. J. M., PAIVA, S. R. Marcadores Moleculares e suas Aplicações em Estudos Populacionais de Espécies de Interesse Zootécnico. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Cerrados**. 2009. Disponível em <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2010/31302/1/doc-254.pdf&ved=2ahUKewib18_XmpH3AhXZuZUCHcosDCYQFnoECD0QAQ&usg=AOvVaw0tN7TEu70bIHLaLPSOytqrf>. Acesso em: 13 de abr. de 2022.

RUBINOFF, D., HOLLAND, B. S. Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. **Systematic Biology**. v. 54, ed. 6, p. 952-961, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/sysbio/article/54/6/952/1630741#112718923>>. Acesso em: 30 de mar. de 2022.

SANINO, G. P. A preliminary note on population structure in eastern South Pacific common bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 7, p. 65-70, 2005. Disponível em: <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/40183480/A_preliminary_note_on_population_structu20151119-9241-7nwf7m-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1636662880&Signature=FWx7POg-8Csc8b6zfl-G7MI92ZQXwS2Pc8JDQDehs9FNncWa7grvn-WAU3p3sieczuiYNZJxyY6NEjqcDTj5a9sm6lv06i4ypx7ugxks5gyk4mNL0GYOdQsnRFS4B-8VgrdEPbnr7Brpvt-moWajOrSLh-XBkRMvwu0B3KHtfJdZJK0wcpyp3hfeC~UH3OMuKhMTFP~s4yVqfvEOb9l-nrWtMj3-HjauOQq8HCoWPavo9TQHqKpciPWZqbEcg05wN5>

WS1PGqaOOUbKVCnE-Kw7hd4NYqYSHVeLSJ887eflUq5yUqj~AzRpCweZIYRFQS JgJTHJGbv3dpqqGZWYXAw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA>. Acesso em: 11 de out. de 2021.

SANTOS, P. G. F. Morfologia pós-craniana do golfinho nariz-de-garrafa *Tursiops* spp. (Cetartiodactyla: Delphinidae) no Sul do Brasil. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2015. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/183383>>. Acesso em: 17 de abr. de 2022.

SCHLIEP, K. P. phangorn: Phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 592–593, fev. 2011. Acesso em: 05 de nov. de 2021;

SCHWARTZ, Michael K.; BONESS, Daryl J. Marine mammal subspecies in the age of genetics: Introductory remarks from the Associate Editor and Editor-in-Chief of Marine Mammal Science. **Marine Mammal Science**, v. 33, n. S1, p. 7–11, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mms.12416>>. Acesso em: 10 maio 2022.

SHARMA, H *et al.* “Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer.” **Cancer cell international**, vol. 5, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1352382/>>. Acesso em: 27 de mar. de 2022.

SHANE, Susan H. 31 - Comparison of Bottlenose Dolphin Behavior in Texas and Florida, with a Critique of Methods for Studying Dolphin Behavior. In: LEATHERWOOD, Stephen; REEVES, Randall R. (Orgs.). **The Bottlenose Dolphin**. San Diego: Academic Press, 1990, p. 541–558. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124402805500354>>. Acesso em: 10 maio 2022.

SIMÕES-LOPES, P. C. et al. Bottlenose dolphin ecotypes of the western south atlantic: The puzzle of habitats, coloration patterns and dorsal fin shapes. **Aquatic Biology**, v. 28, p. 101–111, 2019. Acesso em: 19 de ago. de 2021.

Smith, G. R. Introgression in fishes: Significance for the paleontology, cladistics, and evolutionary rates, **Systematic Biology**. V. 41. p. 41-57, 1992. Disponível em: <<https://academic.oup.com/sysbio/article-abstract/41/1/41/1617373>>. Acesso em: 15 de abr. de 2022.

TAMADA, T. *et al.* Diversidade genética em gatos domésticos *Felis catus* das Ilhas Tsushima, com base no DNA mitocondrial Citocromo b e Sequências Nucleotídicas da Região Controle. **Zoological Science**. 2005. Disponível em: <<https://bioone.org/journals/zoological-science/volume-22/issue-6/zsj.22.627/Genetic-Diversity-in-Domestic-Cats-Felis-catus-of-the-Tsushima/10.2108/zsj.22.627.short>>. Acesso em: 13 de abr. de 2022.

TAMURA, K. *et al.* Estimating divergence times in large molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 109, n. 47, p. 19333–19338, 20 nov. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>>. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

TAMURA, K. *et al.* MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 01 jul. 2021. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

TAMURA, K., NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**. 2021. Acesso: 12 de abr. 2022.

TONKIN-HILL, G. *et al.* RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. **Wellcome open research**, vol. 3, Jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6178908/>>. Acesso em: 04 de abril. de 2022.

TEAM, R Core. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Publicado em 2021, Viena - Áustria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

VERMEULEN, E. *et al.* *Tursiops truncatus* ssp. *gephyreus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T134822416A135190824.en>>. Acesso em 07 de nov. de 2021.

WANG, J. Y. *et al.* Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. **Molecular Ecology**. p. 1603-1612, 1999. Acesso em: 09 de mar. de 2022.

WANG, J. Y. Slow and steady: Comments on “How to contend with paraphyly in the taxonomy of the delphinine cetaceans?” by Perrin *et al.* (2013). **Marine Mammal Science**. 2014. Acesso em: 17 de abr. de 2022.

WELLS, R.S. *et al.* *Tursiops truncatus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T22563A156932432.en>>. Acesso em: 07 de nov. de 2021.

WICKERT, J. C. TURSIOPS NO OCEANO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL: REDESCRIBÇÃO E REVALIDAÇÃO DE TURSIOPS GEPHYREUS LAHILLE, 1908 (CETARTIODACTYLA: DELPHINIDAE). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2013. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/183391/000948333.pdf?sequencia=1>>. Acesso em: 16 de abr. de 2022.

WICKERT, J. C. *et al.* Revalidation of *tursiops gephyreus* lahille, 1908 (Cetartiodactyla: Delphinidae) from the southwestern Atlantic Ocean. **Journal of Mammalogy**, v. 97, n. 6, p. 1728–1737, 5 dez. 2016. Acesso em: 18 de ago. 2021.

WRIGHT, Erik S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Data in R. **The R. Journal**, v. 8, ago. de 2016. Disponível em: <<https://journal.r-project.org/archive/2016/RJ-2016-025/RJ-2016-025.pdf>>. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

YU, G. Ggtree: a serialized data object for visualization of phylogenetic tree and annotation data. Out. de 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.21.348169v1>>. Acesso em: 05 de nov. de 2021.

APÊNDICE 1 - CÓDIGOS UTILIZADOS NO PROGRAMA R

```

#REALIZANDO O ALINHAMENTO E SALVANDO EM FORMATO FASTA EM PASTA DO COMPUTADOR
require(DECIPHER)
#LINK ÚTIL:
https://corytophanes.github.io/BIO_BIT_Bioinformatics_209/sequence-alignments
.html#save-alignment-to-file
fas <-
"/Users/brunabordignonvian/Documentos/Sequencias_tcc/controlfinal.
fa"
dna <- readDNAStrngSet(fas)
dna
alinhamento <- AlignSeqs(dna)
BrowseSeqs(alinhamento, highlight=0)
writeXStringSet(alinhamento, file="controlfinal.fasta", format="fasta")

#COMO VISUALIZAR ALINHAMENTOS? (PARA FUTURAS FIGURAS)
#https://corytophanes.github.io/BIO_BIT_Bioinformatics_209/sequence-alignments
.html#visualizing-alignments-in-r

#Opening packages needed
require(phangorn)
library(rhierbaps)
library(phytools)
library(ape)
library(ggtree)

#Opening file
golfinhos <- read.dna("controlfinal.fa", format="fasta")
#golfinhos2 <-as.alignment(golfinhos)

#class(golfinhos)

golfinhos <- read.dna("controlfinal.fa", format="fasta")
golfinhos2<-as.alignment(golfinhos)
nbin<-as.DNABin(golfinhos2)
nbin
dados = as.phyDat(golfinhos2)

#Distance method
dm <- dist.ml(dados)
treeUPGMA <- upgma(dm)
treeNJ <- NJ(dm)
class(treeNJ)

#Alguns tipos de árvores mais simples como UPGMA E NEIGHBOR JOINING
layout(matrix(c(1,1), 2, 1), height=c(1,2))

```



```

plot(treeUPGMA)
plot(treeNJ, show.tip.labels = FALSE)
plot(treeNJ, "unrooted", main="NJ")

#Maximum likelihood
fit = pml(treeNJ, data=dados)
fit
methods(class="pml")

#Best substitution model
fit_m <- optim.pml(fit, TRUE)
logLik(fit_m)
mt = modelTest(dados, tree = fit$tree)
env <- attr(mt, "env")
ls(envir=env)
View(mt)

#Maximum likelihood estimation
fit_ML <- eval(get("HKY+G+I", env), env)
tree_ML= optim.pml(fit_ML, rearrangement = "stochastic",
                  optGamma=TRUE, optInv=TRUE, model="JC")

#Bootstrap
bs <- bootstrap.pml(tree_ML, bs=500, optNni=TRUE, control = pml.control(trace
= 0))
bs

#Tree design with phangorn
par(mar=c(0.001, 0.001, 0.001, 0.001))
MLtree = plot(tree_ML, type="phylogram", show.tip.label = FALSE)
tree = plotBS(midpoint(tree_ML$tree), bs, p = 50, type="phylogram",
tiplabels(pch=19), show.tip.label = FALSE, cex = 0.7)
tree

#Final tree editing with ggtree
library(pegas)
library(ggtree)
library(ggplot2)
library(phytools)
library(stats)
dev.new()
par(mar = c(0,0,0,0))
gg <- ggtree(tree, layout = "rectangular")

nname<-as.matrix(sort(labels(dados)))#to construct population names
nname

#NÃO EXECUTAR ESTE E SIM O PRÓXIMO
dados = read.table(file="nomes.txt")
attach(dados)

```

```

data.frame(dados)
krp = dados[,1]
pop = as.factor(krp)
pop

#EXECUTAR ESTE PARA COLORIR POR ESPÉCIE
krp<-list(T.truncatus = nname[1,],
          T.gephyreus = nname[2,],
          T.truncatus = nname[3:5,],
          T.gephyreus = nname[6,],
          T.truncatus = nname[7:30,],
          T.aduncus = nname[31:32,],
          T.truncatus = nname[33:40,],
          T.aduncus = nname[41:46,],
          T.truncatus = nname[47:208,],
          S.attenuata = nname[209:318,],
          T.truncatus = nname[319:349,],
          S.bredanensis = nname[350,],
          T.truncatus = nname[351,],
          S.attenuata = nname[352,],
          T.truncatus = nname[353:377,],
          S.frontalis = nname[378:568,],
          T.truncatus = nname[569,],
          S.bredanensis = nname[570,],
          T.truncatus = nname[571:623,],
          S.frontalis = nname[624:625,],
          T.truncatus = nname[626:699,],
          T.aduncus = nname[700:701,],
          S.attenuata = nname[702:711,],
          S.clymene = nname[712:723,],
          S.frontalis = nname[724:749,],
          S.attenuata = nname[750:762,],
          T.aduncus = nname[763:768,],
          T.truncatus = nname[769:887,],
          T.aduncus = nname[888:897,],
          T.truncatus = nname[898:911,],
          T.australis = nname[912:917,],
          T.truncatus = nname[918:967,],
          S.bredanensis = nname[968:980,],
          T.aduncus = nname[981,],
          S.frontalis = nname[982:1011,],
          T.truncatus = nname[1012:1018,],
          S.frontalis = nname[1019:1026,],
          T.truncatus = nname[1027:1048,],
          T.aduncus = nname[1049:1057,],
          T.truncatus = nname[1058:1095,],
          T.aduncus = nname[1096:1105,],
          T.truncatus = nname[1106:1113,],
          T.aduncus = nname[1114:1123,],
          T.truncatus = nname[1124:1198,],

```

```

S.bredanensis = nname[1199:1201,],
S.attenuata = nname[1202:1217,],
T.truncatus = nname[1218:1249,],
S.bredanensis = nname[1250:1265,],
T.truncatus = nname[1266:1320,],
S.clymene = nname[1321:1328,],
T.aduncus = nname[1329:1334,],
T.truncatus = nname[1335:1368,],
S.attenuata = nname[1369:1427,],
S.bredanensis = nname[1428,],
T.aduncus = nname[1429:1430,],
S.attenuata = nname[1431:1432,],
S.bredanensis = nname[1433:1434,],
T.aduncus = nname[1435,],
S.attenuata = nname[1436,],
T.gephyreus = nname[1437:1438,],
T.truncatus = nname[1439,],
T.gephyreus = nname[1440:1468,],
T.truncatus = nname[1469:1532],
T.aduncus = nname[1533:1554,],
T.truncatus = nname[1555,],
T.aduncus = nname[1556:1564,],
T.truncatus = nname[1565:1566,],
T.aduncus = nname[1567:1568,],
T.truncatus = nname[1569:1591,],
T.gephyreus = nname[1592:1608,],
S.frontalis = nname[1609:1690,],
T.truncatus = nname[1691:1734,],
T.aduncus = nname[1735:1764,],
S.attenuata = nname[1765:1787,],
S.bredanensis = nname[1788:1794,])

```

```
krp
```

```

groupOTU(gg, krp, 'pop') +
aes(color=pop)+theme(legend.position="right")+geom_tiplab(names(nbin), cex =
1.7, show.tip.labels = FALSE)+guides(color = guide_legend(override.aes =
list(size = 2.5)))+geom_treescale(x=-0.1, color = "coral4", fontsize = 3,
offset = 9)

```

```
#Árvore circular
```

```

emos<-ggtree(tree, layout = 'circular', branch.length='branch.length', lwd =
0.5)+xlim(-0.1, NA)
groupOTU(emos, krp, 'pop') +
aes(color=pop)+theme(legend.position="right")+geom_tiplab(names(nbin), cex =
1.7, offset=0.002)+guides(color = guide_legend(override.aes = list(size =
2.5)))+geom_treescale(x=-0.1, color = "coral4", fontsize = 3, offset = 9)
groupOTU(emos, krp, 'pop') + aes(color=pop, size =
1)+theme(legend.position="right")+guides(color = guide_legend(override.aes =
list(size = 6.0)))+geom_treescale(x=-0.1, color = "black", fontsize = 5,
offset = 2)

```

```

#Árvore retangular
emos<-ggtree(tree, layout = 'rectangular', branch.length='branch.length', lwd
= 0.9)+xlim(-0.1, NA)
groupOTU(emos, krp, 'pop') +
aes(color=pop)+theme(legend.position="right")+geom_tiplab(names(nbin), cex =
1.7, offset=0.002)+guides(color = guide_legend(override.aes = list(size =
2.5)))+geom_treescale(x=-0.1, color = "coral4", fontsize = 3, offset = 9)
groupOTU(emos, krp, 'pop') +
aes(color=pop)+theme(legend.position="right")+guides(color =
guide_legend(override.aes = list(size = 1.0)))+geom_treescale(x= 0.2, color =
"coral4", fontsize = 5, offset = -1)
groupOTU(emos, krp, 'pop') + geom_treescale(x=1, color = "coral4", fontsize =
5, offset = 2)+ geom_tippoint(aes(color=Populations), size=3)

#Sugestão final
emos<-ggtree(tree, layout = 'circular', branch.length='branch.length', lwd =
0.9)+xlim(-0.1, NA)
groupOTU(emos, krp, 'pop') + geom_treescale(x=0.12, color = "black", fontsize
= 3, offset = 0.5)+ geom_tippoint(aes(color=pop), size=3)

```

APÊNDICE 2 - CÓDIGOS DAS 146 SEQUÊNCIAS SELECIONADAS

Código	Espécie
MN339200.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339201.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339202.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339203.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339204.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339205.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339206.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339207.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339208.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339209.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339210.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339211.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339212.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339213.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339214.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339215.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339233.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339234.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339235.1	<i>Stenella frontalis</i>
MN339236.1	<i>Stenella frontalis</i>
JN571464.1	<i>Tursiops australis</i>
JN571465.1	<i>Tursiops australis</i>
JN571466.1	<i>Tursiops australis</i>
JN571467.1	<i>Tursiops australis</i>
JN571468.1	<i>Tursiops australis</i>
JN571469.1	<i>Tursiops australis</i>
AF056233.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056234.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056235.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056236.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056237.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056238.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056239.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056240.1	<i>Tursiops aduncus</i>
Código	Espécie
AF056241.1	<i>Tursiops aduncus</i>

AF056242.1	<i>Tursiops aduncus</i>
AF056243.1	<i>Tursiops aduncus</i>
GQ504137.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504138.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504139.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504140.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504141.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504142.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504143.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504144.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504145.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504146.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504147.1	<i>Stenella clymene</i>
GQ504148.1	<i>Stenella clymene</i>
AY842456.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842457.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842458.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842459.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842460.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842461.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842462.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842464.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842465.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842467.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842468.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842469.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
AY842470.1	<i>Sotalia fluviatilis</i>
MF405801.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405802.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405804.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405805.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405806.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405807.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405808.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405809.1	<i>Tursiops gephyreus</i>

Código**Espécie**

MF405810.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
------------	---------------------------

MF405811.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405812.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405813.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405814.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405815.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405816.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405817.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405818.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405820.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405821.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405822.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405823.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405824.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405825.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405826.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405827.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405828.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405829.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405830.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405831.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405832.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
MF405833.1	<i>Tursiops gephyreus</i>
DQ105702.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105703.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105704.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105705.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105706.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105707.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105708.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105709.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105710.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105711.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105712.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105713.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105714.1	<i>Tursiops truncatus</i>

Código**Espécie**

DQ105715.1	<i>Tursiops truncatus</i>
------------	---------------------------

DQ105716.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105717.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105718.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105719.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105720.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105721.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105722.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105723.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105724.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105725.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105726.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105727.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105728.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105729.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105730.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105731.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105732.1	<i>Tursiops truncatus</i>
DQ105733.1	<i>Tursiops truncatus</i>
MF405803.1	<i>Tursiops truncatus</i>
A04 002*	<i>Tursiops truncatus</i>
B04 004*	<i>Tursiops truncatus</i>
C04 006*	<i>Tursiops truncatus</i>
D04 008*	<i>Tursiops truncatus</i>
E04 010*	<i>Tursiops truncatus</i>
F04 012*	<i>Tursiops truncatus</i>
A07 001*	<i>Tursiops truncatus</i>
B07 003*	<i>Tursiops truncatus</i>
C07 005*	<i>Tursiops truncatus</i>
D07 007*	<i>Tursiops truncatus</i>
E07 009*	<i>Tursiops truncatus</i>
F07 011*	<i>Tursiops truncatus</i>
H04 016*	<i>Tursiops truncatus</i>
A05 001*	<i>Tursiops truncatus</i>
A06 002*	<i>Tursiops truncatus</i>
B05 003*	<i>Tursiops truncatus</i>

Código	Espécie
---------------	----------------

C05 005*	<i>Tursiops truncatus</i>
----------	---------------------------

E03 009*	<i>Tursiops truncatus</i>
F03 011*	<i>Tursiops truncatus</i>
G03 013*	<i>Tursiops truncatus</i>

*Sequências disponibilizadas pelos projetos: A Fauna de Odontocetos do Brasil, biogeografia taxonomia: subsídios para a conservação (UFRGS) e Distribuição, riqueza, abundância e uso do habitat pelos cetáceos e aves marinhas entre a costa Brasileira e o Arquipélago de Trindade e Martin Vaz em relação a parâmetros fisiográficos e oceanográficos (FURG).

APÊNDICE 3 - TABELA DE COMPILAÇÃO DE DADOS

Link de acesso:

<<https://docs.google.com/document/d/1f0jK7egIheXzPDaGjTzqSMjq0R7nCtb0R63P4UBtv8/edit?usp=sharing>>