Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2007

Sílvia Raquel da Silva Monteiro

Estudo genético de golfinho comum, *Delphinus delphis*, na Costa Centro/Norte de Portugal

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Doutor José Vingada, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho e do Doutor Carlos Fonseca, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

O júri

presidente

Doutor Fernando José Mendes Gonçalves
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro
Departamento de Biologia

Doutor José Victor Sousa Vingada (orientador)
Professor Auxiliar da Universidade do Minho
Departamento de Biologia
Campus de Gualtar
4710-057 Braga

Doutor Carlos Manuel Martins Santos Fonseca (co-orientador)
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro
Departamento de Biologia

Doutor Alfredo López Fernández – CEMMA/CSIC
CEMMA – Coordinadora para o estudio dos mamíferos marinhos
Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo – CSIC
Apdo. de Correos Nº 15,
36380- Gondomar (Pontevedra) Espanha

Agradecimentos

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro por me ter aceite como aluna de mestrado.
Ao Professor Doutor Carlos Fonseca e ao Professor Doutor José Vingada por me terem aceite como orientada.
Ao Mestre Luís Souto Miranda por toda a disponibilidade em ajudar-me a entrar no mundo da genética.
À minha família. Pelos momentos em que não estive, pela paciência e força e principalmente pelos sorrisos e o abraço caloroso de cada regresso a casa. A boa disposição da nossa família unida serve-me de rumo e vocês servem-me de exemplo para a vida.
À Ni. Pelas gargalhadas quando mais precisava. Por partilharmos muitos sonhos. Obrigada.
Ao João. Pelas palavras ditas no momento certo, pelo calor de um abraço, pela compreensão, pelos sorrisos partilhados.
Ás biogajas. A distância é unida pela força do pensamento e pelo sentimento de constante presença transmitido pela alegria, boa disposição e saudade.
Ao Migas, à Té, à Sofia e ao Fernando pelas falhas nos cafezinhos e pelos momentos em que uma simples conversa nos dá mais força.
Ao Tiago e ao Manú, pelas loucuras que cada vez mais me dão sanidade mental.
À Belucha, à Susana e ao Nuno. Pelos cafezinhos e pela imensa paciência para ouvir as minhas eternas queixas e preocupações.
À família Origami, Elena, Patri, Padji, Marco, Paula e Airton. Este ano foi sem dúvida um conjunto de novas vivências e sensações partilhadas. “With you by my side, I have the strenght to fight them all…”
À Marisa. Por apresentar-me o mundo dos cetáceos, pelas amostras, pelos momentos “ bem passados” a percorrer as praias e a fazer necrópsias.
À Liliana, à Sandra e principalmente à Helena pelos momentos passados no laboratório e por toda a ajuda.
Ao pessoal da casa do Marcolino, Paula, Jorge e Catarina. Obrigado. Os dias aí passados transmitiram calma e inspiração, apesar das poucas horas de sono. Um obrigado especial à Catarina pela revisão e sugestões.
A Frank Zachos, pela ajuda prestada na análise estatística dos dados obtidos.

Resumo

A influência antropogénica nas espécies de cetáceos, nomeadamente através da interacção com as pescas (exploração directa ou acidental), poluição e degradação de *habitat*, tem-se revelado uma ameaça à integridade das populações selvagens de cetáceos a nível mundial. Para legislação de protecção dos cetáceos torna-se necessário conhecer as populações em termos genéticos (estrutura e diversidade), a sua ecologia (abundância, distribuição, taxas de sobrevivência, reprodução, mortalidade e migração) e morfologia, bem como o impacto das actividades humanas sobre essas espécies, dados desconhecidos para muitos dos cetáceos que ocorrem em Portugal. Abordando apenas uma das áreas que se torna essencial conhecer relativamente a estas espécies para posterior aplicação em estratégias de gestão e conservação, o presente estudo avaliou o nível de estruturação e variabilidade genética de golfinho comum de bico curto (*Delphinus delphis*) no centro/norte de Portugal, através da análise da região controlo mitocondrial de animais arrojados nesta área. Dentro desta população, com intenção de determinar o impacto causado pelas capturas acidentais destes animais em artes de pesca, com base nos dados obtidos, foi avaliada a existência de relações entre as capturas acidentais e a estrutura social, analisando as relações entre haplótipos dos animais capturados.

Numa análise global, com o objectivo de detectar relações com populações de outras regiões e identificar a origem destes animais, será realizada uma comparação da população de Portugal centro/norte com sequências provenientes do Açores, Canárias, Mar Negro e Pacífico.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou a inexistência de estruturação populacional desta espécie na costa centro/norte de Portugal, sugerindo um elevado fluxo genético entre os indivíduos. Após uma análise global, observou-se que a população da área de estudo se enquadra numa população única a nível do Oceano Atlântico, uma vez que não houve diferenciação genética entre as populações atlânticas analisadas, sendo a população do Pacífico a única significativamente divergente.

A análise da informação existente *à priori* sobre os arrojamentos (ano, mês, localização, sexo do animal, estado de decomposição do corpo e indício de captura acidental) em conjugação com os dados genéticos obtidos permitiu sugerir relações de parentesco, possivelmente mais fortes que a partilha de linhagem materna, sendo também reforçadas as hipóteses existentes sobre a organização social desta espécie. Todos os resultados são relacionados com dados existentes sobre capturas acidentais por arte de pesca, de modo a alertar sobre a importância da definição de estratégias de gestão e conservação, bem como sobre a implementação de medidas de mitigação para apoiar a sustentabilidade de cetáceos.

Abstract

The influence of human activities on cetacean species, including interaction with fisheries (direct exploitation or bycatch), pollution or habitat degradation, is considered one of the major threats to cetacean populations worldwide. In order to implement legislation on cetacean protection, it is necessary to obtain data on population genetics (structure and diversity), ecology (abundance, distribution, rates of survival, reproduction, mortality and migration) and morphology. It is also necessary to assess the impact of human activities on these wildlife species. However, such data are unavailable for most of the cetacean species occurring in Portugal. Therefore, the present study assessed the level of genetic population diversity and structure of short-beak common dolphin (*Delphinus delphis*) in the center/north region of Portugal, by analysing the mitochondrial control region of animals stranded in that geographic area, thus focusing on an essential subject to any management and conservation strategy. In this population, the relations between haplotypes of the studied animals were investigated, aiming at assessing relationships between accidental captures of common dolphin and their social structure thus determining the impact of bycatch on the population in the study area.

Furthermore, in a global analysis, samples from center/north of Portugal were compared with those from Azores, Canary Islands, Black Sea and Pacific populations in order to investigate the genetic relation between different populations and identify the origin of these individuals.

The analysis of the molecular variance (AMOVA) revealed the absence of population structure in *Delphinus delphis* occurring in the center/north coast of Portugal, suggesting a high genetic flow between individuals. Overall data lead to the hypothesis that the center/north Portuguese population is a part of a single population occurring in the Atlantic Ocean. In fact, there was no genetic differentiation between the Atlantic regions analysed, the only significantly divergent population being that from the Pacific.

By integrating data on stranded animals (year and month of stranding, geographic location, sex, state of decomposition of the body and signs of bycatch) with the genetic data, parental relationships between some individuals were suggested, which were probably stronger than a maternal lineage. The results also reinforced the hypothesised social organization of this species. All results were compared with available data on common dolphin bycatch in the Atlantic Ocean, thus emphasising the need to define management and conservation strategies, as well as to implement mitigation measures to support the sustainability of wildlife cetacean populations.

Siglas e Terminologia

ADN - Ácido desoxirribonucleico, em substituição da sigla inglesa “DNA”.

AFLP - Sigla derivada da terminologia inglesa “Amplified fragment length polymorphism”, cuja tradução será Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado.

Afunilamento – Fenómeno de efeito gargalo, redução acentuada do tamanho efectivo de uma população. Adopta-se este termo em substituição do termo inglês “bottleneck”.

ARN - Ácido ribonucleico, em substituição da sigla inglesa “RNA”.

Atribuição - Em substituição do termo inglês “assignment”, como por exemplo em “assignment tests”.

“Boleia” genética - Processo pelo qual um alelo ou mutação neutral ou, em alguns casos deletéria, se pode espalhar ao longo do pool genético devido ao facto de estar ligado a uma mutação benéfica. Adopta-se este termo em substituição do termo inglês “ genetic hitchhiking”.

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamónio.

Deslizamento da polimerase - Relativo ao mecanismo de mutação cuja designação inglesa é “polymerase slippage”.

Haplogrupo - Um grupo de haplótipos relacionados entre si.

Haplótipo - Variações das sequências de ADN mitocondrial dentro de um indivíduo.

Heteroplasmia - Referente à presença de diferentes tipos de ADN mitocondrial na mesma mitocôndria, célula ou indivíduo.

ISM - Sigla derivada da terminologia inglesa “infinite site model”, cuja tradução poderá ser modelo com número infinito de sítios.

Iniciador - Em substituição do termo inglês “primer”, utilizado para definir a sequência oligonucleotídica iniciadora utilizada na reacção de amplificação em cadeia da polimerase

PCR - Sigla derivada da terminologia inglesa “Polymerase Chain Reaction”, cuja tradução será Reacção em Cadeia da Polimerase.

Pool genético - Conjunto completo de alelos únicos que podem ser encontrados no material genético de cada um dos organismos vivos de uma espécie ou população.

Stock – Este termo consiste na unidade populacional utilizada para definição de estratégias de gestão. De um modo geral, aceita-se a existência do stock genético, como populações naturais que se encontram estruturadas em populações locais que

funcionam como unidades isoladas com pouca ou nenhuma troca genética entre si, e do stock fenotípico ou ambiental, como unidades que apesar de não apresentarem diferenciação genética entre si, adaptaram-se separadamente aos respectivos habitats, consoante a técnica utilizada para definir este agrupamento.

Transmissão acidental paterna - Transmissão acidental de mitocôndrias paternas durante a fertilização. Adopta-se este termo em substituição do termo inglês “parental leakage”.

Índice

Capítulo 1: introdução

1.1. O golfinho comum e a sua ocorrência em Portugal 3
1.1.1. Caracterização taxonómica 3
1.1.2. Distribuição 3
1.1.3. Organização social 5
1.2. Actividades humanas e a conservação dos cetáceos 6
1.3. Ecologia molecular como ferramenta de conservação e gestão 8
1.4. Características dos marcadores moleculares 11
1.4.1. ADN mitocondrial 11
1.5. Objectivos e estrutura da tese 14

Capítulo 2: Metodologia

2.1. Área de estudo 19
2.2. Amostragem 20
2.3. Extracção de ADN Total 21
2.4. Amplificação e sequenciação 21
2.5. Análise e tratamento de dados 23
2.4.1. Análise da estruturação populacional de *Delphinus delphis* 24
2.4.1.1. Relações entre haplótipos 24
2.4.1.2. Medidas de diversidade genética 25
2.4.1.3. Medidas de divergência genética 26
2.4.1.4. Testes de Neutralidade 28
2.4.2. Análise da linhagem materna e relação com capturas acidentais 29

Capítulo 3: Resultados e Discussão Geral

3.1. Estruturação populacional de *Delphinus delphis* 33
3.1.1. Estruturação populacional a nível local 33
3.1.1.1. Testes de neutralidade 38

3.1.2. Estruturação populacional a nível global 39
3.4. Análise da linhagem materna e relação com capturas acidentais em pesca 52

Capítulo 4: Discussão Geral e Considerações Finais

4.1. Discussão Geral 59
4.2. Considerações Finais 63

Referências Bibliográficas

Anexos

Índice das Figuras

Figura 1 - Mapa de distribuição do género *Delphinus*. (Adaptado de Perrin, 2002). 4

Figura 2 - Área de Estudo (adaptado de Ferreira, 2007) 19

Figura 3 - Árvore *Maximum-Parsimony* ilustrando as relações filogenéticas entre os 27 haplótipos de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. 35

Figura 4 - Árvore *Neighbour-Joining* ilustrando as relações filogenéticas entre os 27 haplótipos de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. 35

Figura 5 - Rede *Median Joining* entre os haplótipos da região controlo mitocondrial de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. 36

Figura 6 - Rede *Median Joining* da partilha de haplótipos da região controlo mitocondrial de *Delphinus delphis* entre diferentes populações. 41

Índice das Tabelas

Tabela I - Características dos marcadores da região controlo mitocondrial seleccionados. 22

Tabela II - Medidas de diversidade genética estimadas para a população de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. 33

Tabela III - Estimativas dos testes de neutralidade. 39

Tabela IV- Sumário das medidas de variabilidade genética das diferentes populações de *Delphinus delphis*. 42

Tabela V- Estimativas da divergência genética nucleotídica entre as diferentes populações (D_A), segundo Nei & Li (1979), para a região controlo mitocondrial. 43

Tabela VI- Estimativas de divergência genética (Φ_{ST} e F_{ST}) entre as diferentes populações, para a região controlo mitocondrial. 44

Tabela VII- Valores da estimativa da taxa de migração Nfm, calculada segundo Slatkin (1991), entre as diferentes populações. 46

Tabela VIII- Estimativas de divergência genética entre as diferentes populações (Φ_{ST} e F_{ST}), para a região controlo mitocondrial, em diferentes épocas do ano (Primavera-Verão vs. Outono-Inverno). 50

Tabela IX – Características das amostras pertencentes aos haplótipos A, V, U e S. 54

Capítulo 1 Introdução

1.1. O golfinho comum e a sua ocorrência em Portugal

1.1.1. Caracterização taxonómica

O golfinho comum de bico curto (*Delphinus delphis*) é um mamífero social pertencente à Ordem Cetacea. Existe ainda alguma controvérsia relativamente à taxonomia deste género, uma vez que as variações geográficas existentes sugerem uma grande diversidade de espécies. No entanto, estudos baseados na comparação de sequências mitocondriais (Rosel *et al.*, 1994; LeDuc *et al.*, 1999; Amaral *et al.*, 2007) e marcadores nucleares (Kingston & Rosel, 2004; Natoli *et al.*, 2006) foram desenvolvidos de modo a tentar desvendar a relação genética entre os morfotipos do género *Delphinus* - o golfinho comum de bico curto *(D. delphis)* e o golfinho comum de bico comprido (*D. capensis*) - já descritos anteriormente por outros autores (Heyning & Perrin, 1994). Um estudo filogenético do género *Delphinus*, baseado na análise da região controlo do ADN mitocondrial, demonstrou que não havia partilha de haplótipos entre os dois morfotipos, sendo sugerido que a divergência genética nucleotídica (1,1%) associada às variações morfológicas existentes, poderiam representar diferentes espécies, com monofilia recíproca (Rosel *et al.*, 1994). No entanto, outros estudos genéticos da família Delphinidae, assentes na análise do citocromo b mitocondrial (LeDuc *et al.*, 1999; Amaral *et al.*, 2007) e em marcadores nucleares (Kingston & Rosel, 2004), demonstraram que as espécies não eram reciprocamente monofiléticas, indicando uma divergência genética muito recente. A acrescer a estes resultados, Natoli *et al.* (2006) sugerem que o baixo nível de diferenciação genética verificada ao longo da vasta área geográfica estudada, conjuntamente com as variações morfológicas verificadas, poderão ser derivadas de adaptações locais, em vez de diferenciação filogenética. Apesar de toda a controvérsia, é assumido pelos taxonomistas e pela maioria dos estudos realizados com o género *Delphinus*, que este apresenta duas espécies, *D. delphis* e *D. capensis*.

1.1.2. Distribuição

A espécie golfinho comum de bico curto (doravante denominada apenas como golfinho comum) apresenta uma vasta distribuição, ocorrendo em águas temperadas e

tropicais de todos os oceanos e alguns mares, em simpatria com o golfinho comum de bico longo (Bearzi *et al.*, 2003) (Figura 1).

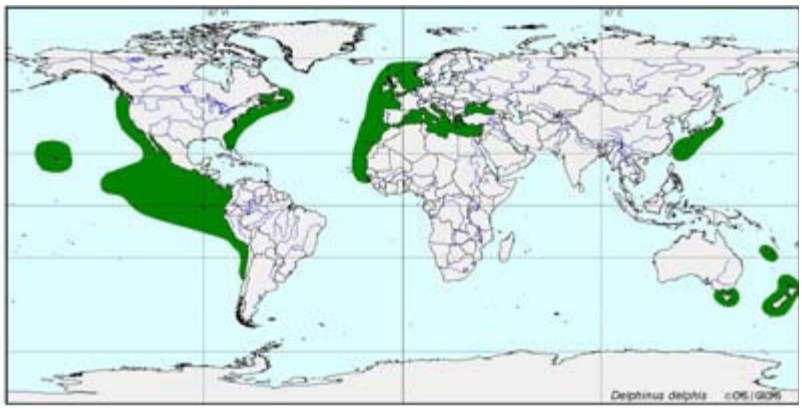

Figura 1 - Mapa de distribuição do género *Delphinus*. (Adaptado de Perrin, 2002).

O golfinho comum é uma das espécies mais numerosas do Nordeste Atlântico, sendo frequentemente avistado nas zonas costeiras europeias (López, 2003; Reid *et al.*, 2003; Silva & Sequeira, 2003; López *et al.*, 2004; Wall *et al.*, 2006; Ferreira, 2007). De notar que, estudos de morfologia (Westgate, 2007), genética (Natoli *et al.,* 2006), ocorrência e abundância (Waring *et al.,* 2007) sugerem que apenas existe a espécie *Delphinus delphis* no Atlântico.

De acordo com Natoli *et al.* (2006), a análise genética mitocondrial e nuclear de diferentes populações desta espécie apresentou pouco ou nenhum nível de divergência genética entre populações do mesmo lado do oceano, o que pode evidenciar um grande nível de fluxo genético entre si, reflectindo a grande mobilidade desta espécie e a sua estrutura social fluida. No entanto, alguns estudos sugerem diferenciação entre as populações de *Delphinus delphis* no Oceano Atlântico. A análise da região controlo e do citocromo b mitocondrial de populações do Atlântico (Escócia, Espanha e Portugal) permitiu detectar um grupo muito divergente das restantes amostras, sendo indicadas como hipóteses para este resultado a possibilidade de serem linhagens divergentes que evoluíram independentemente, subespécies ou eventos de hibridação introgressiva (Amaral *et al.*, 2007). De igual modo, um estudo morfológico baseado nas características cranianas desta espécie, indicou algum nível de diferenciação nas populações do Atlântico, principalmente indivíduos de Portugal que apresentavam segregação relativamente a outras áreas (Murphy *et al.*, 2006)

Na costa portuguesa, o golfinho comum está presente durante todo o ano, no entanto aparenta ter uma distribuição mais abundante nas regiões Norte e Centro. Ferreira (2007) verificou que esta espécie apresenta a frequência de arrojamentos mais elevada (63,9%) na zona centro/norte do país, o que demonstra que este poderá ser o cetáceo mais abundante nessa região, tal como já havia sido referido por Silva & Sequeira (2003). Alguns estudos sustentam a hipótese de que a sua distribuição está dependente do movimento e da disponibilidade das suas presas, que consistem em peixes pelágicos, cefalópodes e crustáceos (Morizur *et al.*, 1999; Silva, 1999; López *et al.,* 2004).

1.1.3. Organização social

Crê-se que os grupos de golfinho comum são compostos por indivíduos provavelmente relacionados entre si (Evans, 1994; Schaffar-Delaney, 2004). No geral, alguns estudos sugerem a existência de três tipos de grupos dentro das sociedades de cetáceos: "escolas" que incluem apenas fêmeas, grávidas ou lactantes com as suas crias; grupos mistos dos dois sexos e todas as idades e grupos de machos compostos apenas por machos imaturos ou por machos de todas as idades (Moller *et al.,* 2001; Silva & Sequeira, 2003; Schaffar-Delaney, 2004).

Tal como a maioria das espécies oceânicas é provável que o golfinho comum coabite numa sociedade de fissão-fusão, onde a composição dos grupos varia diariamente, mas mantém associações a longo prazo e subgrupos funcionais (Moller *et al.*, 2001, 2006). Aparentemente, estas divisões funcionais e segregação sexual e/ou etária ocorre em diversas populações e espécies de golfinhos (Perryman & Lynn, 1994; Escorza-Trevino & Dizon, 2000; Moller *et al.,* 2001, 2006; Silva & Sequeira, 2003; Martin & Silva, 2004; Natoli *et al.,* 2005) e baleias (Lyrholm *et al.*, 1999; Gowans *et al.,* 2001). Vários estudos sugerem a ocorrência de segregação sexual, quer através da formação de "escolas" compostas por fêmeas e crias onde só surgem machos adultos na época de acasalamento, quer através da utilização de diferentes *habitats* (O'Corry-Crowe *et al.*, 1997; Baird & Whitehead, 2000; Christal & Whitehead, 2001; Gowans *et al.*, 2001; Martin & Silva, 2004; Moller & Beheregaray, 2004; Murphy *et al.*, 2005; Westgate & Read, 2007). No entanto as razões para este tipo de segregação são ainda desconhecidas, apesar de poder dever-se à competição masculina, à tentativa de evitar endocruzamentos e à competição pelos mesmos recursos (Greenwood, 1980; Handley & Perrin, 2007).

Na maioria das espécies de cetáceos, o cuidado das crias é uniparental, sendo uma função exclusivamente desempenhada pelas fêmeas, pelo que é provável que estas exerçam um papel fundamental na estrutura social das populações de golfinhos e baleias (Schaffar-Delaney, 2004). No entanto, as relações progenitora-cria e a organização social de *Delphinus delphis* ainda são pouco conhecidas, uma vez que os poucos estudos relacionados com a reprodução desta espécie incidiram sobre a sazonalidade da época reprodutiva e as características morfológicas e fisiológicas (Murphy *et al.*, 2005; Danil & Chivers, 2007; Westgate & Read, 2007).

Apesar dos diversos estudos recentes relativos ao golfinho comum, existe ainda ausência de conhecimento acerca de características ecológicas, genéticas e demográficas, bem como sobre o impacto das actividades humanas nesta espécie, que podem, de uma maneira geral, afectar fortemente a sua sustentabilidade e sobrevivência.

1.2. Actividades humanas e a conservação dos cetáceos

A influência antropogénica nas espécies de cetáceos, nomeadamente através da interacção com as pescas (exploração directa ou captura acidental), da poluição e da degradação do *habitat*, tem-se revelado uma ameaça à integridade e à viabilidade das populações selvagens de cetáceos a nível mundial (Bearzi *et al.*, 2003; López *et al.*, 2003; Reeves *et al.*, 2003; Silva & Sequeira, 2003; Baker *et al.*, 2006).

Tendo em consideração as ameaças a que os mamíferos marinhos estão expostos em águas europeias, a Directiva *Habitats* (92/43/EEC) decreta a protecção estrita para todos os cetáceos e exige a definição de Áreas Especiais de Conservação para o roaz corvineiro (*Tursiops truncatus)* e o bôto (*Phocoena phocoena)*. A implementação desta legislação e consequente definição de áreas de protecção marinhas, implica o conhecimento de vários aspectos da ecologia populacional das espécies (abundância, estrutura, distribuição, taxas de sobrevivência, mortalidade, reprodução e migração, genética, morfologia) e do impacto das actividades humanas sobre essas espécies (Hastie *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2003; Cañadas *et al.*, 2005). Na costa continental portuguesa, a informação referente a cetáceos é limitada em termos de ecologia, não existindo dados fidedignos sobre as taxas de mortalidade das diversas espécies (quer natural quer resultante de factores antropogénicos), o que resulta na classificação de “Insuficientemente Conhecidas” para muitas espécies (Cabral *et al.*, 2006; IUCN, 2006). Tal situação dificulta a implementação das diversas

directivas da União Europeia e de Planos de Conservação e Gestão. Em termos conservacionistas, em Portugal, o golfinho comum foi classificado com o estatuto de "Pouco preocupante" (Cabral *et al.*, 2006; IUCN, 2006), estando, em termos internacionais, incluído no Apêndice II das Convenções CITES e Berna e no Anexo IV da Directiva *Habitats*.

As capturas acidentais de pequenos cetáceos em artes de pesca constituem um problema mundial, sendo apontada por muitos autores como uma ameaça à integridade das populações de cetáceos existentes (Silvani *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2000; López *et al.*, 2002; Read *et al.,* 2006; Ferreira, 2007). As redes de emalhar e o arrasto pelágico são responsáveis pela maioria da mortalidade acidental de cetáceos, tendo já sido descritos nos diversos estudos referentes à interacção dos cetáceos com a pesca (Tregenza *et al.*, 1997; Morizur *et al.,* 1999; Silva *et al.*, 2002; Kaschner, 2003; López *et al.*, 2003; Zollett & Rosenberg, 2005; Ferreira, 2007; Wise *et al.*, 2007).

Na legislação portuguesa, a protecção de cetáceos é contemplada pelo Decreto-Lei nº263/81, de 3 de Setembro, que proíbe a captura intencional, transporte e morte destes animais em águas portuguesas e pela transposição da Directiva *Habitats* para a legislação portuguesa (Decreto-Lei 140/99, de 24 de Abril com a redacção dada pelo Decreto-Lei 49/2005 de 24 de Fevereiro). No entanto, apesar de existir pouca informação sobre a interacção cetáceos-pesca nas águas continentais portuguesas, os registos de arrojamentos e os relatos dos pescadores indicam que ocorrem inúmeras capturas acidentais e uma mortalidade considerável de cetáceos (Sequeira & Ferreira, 1994; Silva *et al.*, 2002; López *et al.*, 2003; Silva & Sequeira, 2003; Ferreira, 2007; Wise *et al.*, 2007). Ferreira (2007) realizou um estudo sobre ocorrência e captura acidental de pequenos cetáceos na costa centro e norte de Portugal, através da análise de animais arrojados, com metodologia padronizada utilizada também por outras redes de detecção de arrojamentos europeias. Com este estudo, concluiu que dos animais observados, 55% apresentavam evidências de captura acidental e 11% provavelmente morreram devido a captura acidental em artes de pesca.

Relativamente ao golfinho comum, tanto nas pescarias de Portugal continental como nas da Galiza, esta espécie parece ser a principal vítima de captura e mortalidade acidentais, já que dos animais analisados por Ferreira (2007), cerca de 61% apresentavam vestígios de captura acidental, enquanto que López *et al.* (2002) registaram que cerca de 23% dos golfinhos comuns arrojados na costa galega resultavam de capturas acidentais. A causa mais provável destas capturas acidentais parece ser a competição directa ou indirecta entre os mamíferos marinhos e as diferentes artes de pesca pelas mesmas espécies

(Morizur *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002). O golfinho comum é identificado como um predador oportunista, isto é, alimenta-se das presas mais abundantes (Silva, 1999). Estudos realizados demonstram que a sardinha (*Sardina pilchardus*), principal espécie-alvo da pesca de cerco, é uma das principais presas do golfinho comum nas águas portuguesas e que outras espécies de peixes pelágicos que se encontram distribuídos pela área de actividade das artes de pesca fazem parte da composição da dieta de várias espécies de cetáceos que ocorrem na costa portuguesa (Silva, 1999).

O impacto das capturas acidentais nas populações de golfinho comum em Portugal é desconhecido pelo que se torna fundamental a realização de estudos relacionados com a sua distribuição, abundância, reprodução e genética, de modo a conseguir quantificar esse impacto e assim poder contribuir para a sustentabilidade desta espécie. Apesar de ser uma das espécies mais abundantes da costa portuguesa e águas europeias (López, 2003; Reid *et al.*, 2003; Silva & Sequeira, 2003; López *et al.*, 2004; Wall *et al.*, 2006; Ferreira, 2007), o desconhecimento acerca das suas taxas reais de mortalidade, quer natural quer devido à acção humana, não permite avaliar a sustentabilidade desta espécie a longo prazo.

1.3. Ecologia molecular como ferramenta de conservação e gestão

O aumento do impacto das actividades humanas nos ecossistemas marinhos conduziu à necessidade de estabelecer estratégias eficientes de gestão e conservação relacionadas com os mamíferos marinhos. Para tal, tornou-se fundamental o desenvolvimento de ferramentas apropriadas para compreender as relações populacionais em cetáceos e para caracterizar processos demográficos que influenciam a sua sobrevivência, sendo que essa informação é praticamente inexistente para a maioria das espécies. A utilização de marcadores genéticos de ADN nuclear e mitocondrial como ferramentas de apoio a tomadas de decisão em gestão e conservação da vida selvagem, tem proliferado nos últimos anos, já que permite inferir sobre a ecologia das espécies, bem como determinar o grau de estruturação de populações, a frequência de fenómenos migratórios, o fluxo genético, o afunilamento demográfico, a redução do tamanho efectivo de uma população, tendo ainda aplicações forenses, tais como o rastreio de pescas ilegais (Rosel & Rojas-Bracho, 1999; Pichler & Bacher, 2000; Chivers *et al.*, 2003; Cerchio *et al.*, 2005; Lang *et al.*, 2005; Segura *et al.*, 2006; Mendez *et al.*, 2007).

Para determinar os processos demográficos que poderão influenciar a sobrevivência de uma população, torna-se imprescindível obter dados relativos à reprodução, além de informações relativas à taxa de mortalidade e sobrevivência. Para tal, uma das possíveis aplicações de marcadores moleculares é o estudo da estrutura social e dos sistemas de acasalamento. Diversos estudos foram desenvolvidos numa tentativa de definir e ampliar conhecimentos sobre os comportamentos e as estratégias sexuais adoptadas pelos cetáceos, bem como sobre o sucesso reprodutivo das espécies (Cerchio *et al*., 2005; Lang *et al*., 2005). Um exemplo da utilização da ecologia molecular para a conservação de espécies consiste num estudo de paternidade de baleia cinzenta (*Eschrichtius robustus*), uma espécie em perigo de extinção, devido em grande parte, ao baixo sucesso reprodutivo das fêmeas. Assim, através da aplicação de microsatélites, Lang *et al*. (2005) pretenderam determinar qual o sucesso reprodutivo dos machos. Apesar desta análise não ter permitido alcançar a totalidade dos objectivos do estudo, os autores enfatizaram a importância de identificar os locais de reprodução desta espécie e implementar medidas de conservação para estes locais. Um estudo de paternidade em baleia de bossa (*Megaptera novaeangliae*), realizado com 13 microsatélites, demonstrou a existência de poliginia como sistema de acasalamento nesta espécie, mas sem a variação na taxa de sucesso reprodutivo característica deste tipo de sistema de acasalamento, devido a enviesamento no rácio sexual (Cerchio *et al*., 2005). Existem ainda outros estudos de ecologia molecular que apoiam a definição de ecótipos e possível divergência genética de cetáceos, importantes para a definição e implementação de áreas de protecção marinhas (Segura *et al*., 2006; Mendez *et al*., 2007; Quérouil *et al*., 2007).

Tal como referido anteriormente, uma das maiores ameaças enfrentadas pelos cetáceos são as capturas acidentais em artes de pesca. Chivers *et al*. (2003) pretenderam comprovar através da análise de ADN mitocondrial se haveria estrutura social na população de golfinho comum numa área de gestão do Pacífico Norte, onde esta espécie sofre elevados níveis de captura acidental. Estes autores sugeriram, apesar da pequena amostra, que aparentemente existem diferenças na população, propondo um estudo mais aprofundado de modo a apoiar a definição de mais unidades de gestão, nessa região. Um outro estudo desenvolvido sobre o golfinho franciscana (*Pontoporia blainvillei*), uma espécie ameaçada do Norte da Argentina que sofre elevados níveis de capturas acidentais permitiu a aplicação de ferramentas genéticas (análise da região controlo do ADN mitocondrial) para compreender a estrutura populacional, migração e dispersão sexual nesta população

(Mendez *et al*., 2007). O mesmo estudo avaliou também o potencial impacto genético e demográfico das capturas acidentais, de modo a possibilitar a definição de uma área de protecção para esta espécie. De igual modo, foram analisadas sequências da região controlo mitocondrial de golfinho de Hector (*Cephalorhynchus hectori),* uma espécie descrita como vulnerável, devido à associação de baixas taxas reprodutivas e pequenas populações fragmentadas (e possível endocruzamento) com capturas acidentais em artes de pesca ou poluição (Pichler & Baker, 2000). Neste estudo, os autores estabelecem uma previsão de 20 anos para a perda total da variedade do ADN mitocondrial, se não forem tomadas medidas de gestão e conservação. Rosel & Rojas-Bracho (1999) estudaram a variabilidade genética da região controlo do ADN mitocondrial de vaquita (*Phocoena sinus*), uma espécie em perigo de extinção. Tendo detectado que não existia qualquer tipo de polimorfismo nesta região do ADN, como consequência de um possível forte afunilamento ou efeito fundador por altura da formação da espécie seguido por redução do tamanho da população, os autores recomendaram a utilização desta informação para o estabelecimento de decisões de conservação para recuperação desta espécie rara. Natoli *et al*. (2007), realizaram um estudo sobre o impacto genético das redes de captura de tubarões na África do Sul na população costeira e oceânica de uma espécie de roaz presente no Índico e Pacífico (*Tursiops aduncus),* através da análise de marcadores mitocondriais e nucleares. Estes autores concluíram que, considerando as elevadas taxas de captura acidental nestas redes, juntamente com o baixo nível de diversidade genética e com as evidências de possível diferenciação genética entre populações costeiras, seria aconselhável retirar as redes de capturas de tubarões, principalmente na zona norte da área de estudo, onde ocorre maior diferenciação genética entre as populações costeiras de *Tursiops* (Natoli *et al*., 2007).

Outro exemplo da aplicação de técnicas moleculares na conservação e gestão de cetáceos consiste em estudos relacionados com a pesca e venda ilegal das espécies. Num estudo de estrutura populacional realizado em populações oceânicas e costeiras de roaz corvineiro (*Tursiops truncatus)*, através da análise de ADN mitocondrial, conjuntamente com dados morfológicos, Segura *et al*. (2006) chegaram à conclusão que na Califórnia existem diferenças nestas populações, talvez devido ao isolamento recente ou ao fluxo genético, sendo importante esta informação para apoiar medidas de decisão de gestão e conservação, uma vez que a procura por esta espécie protegida nos mercados mexicanos está a aumentar. Um outro estudo, baseado na análise de sequências da região controlo e do citocromo b mitocondrial, teve como objectivo a detecção de venda ilegal de carne de

cetáceos em mercados coreanos, proveniente de capturas acidentais (Baker *et al.*, 2006), sendo a análise de carnes de cetáceos comercializadas ilegalmente em mercados, o objectivo de diversos estudos descritos em Dizon *et al.* (2000).

1.4. Características dos marcadores moleculares

1.4.1. ADN mitocondrial

Os marcadores de ADN mitocondrial têm tido uma vasta utilização em estudos evolutivos, filogenéticos e populacionais. Isto deve-se, em parte, ao facto de apresentarem um elevado número de cópias por célula e à sua localização extra-nuclear, o que permite obter melhores resultados que o ADN nuclear em amostras degradadas (como é, geralmente, o caso das amostras provenientes de cetáceos arrojados) e também em amostras de difícil extracção como é o caso dos pêlos, unhas ou ossos (Carracedo *et al.*, 2000; Pakendorf & Stoneking, 2005). No entanto, as cópias de ADN mitocondrial podem não ser idênticas, permitindo a existência de diversos tipos de ADN mitocondrial no mesmo indivíduo (heteroplasmia) (Carracedo *et al.*, 2000), o que pode dificultar alguns estudos populacionais. Existem teorias sobre a heteroplasmia mitocondrial referindo que o fenómeno talvez se possa dever a mutações somáticas de um indivíduo, heteroplasmia dos óocitos ou a transmissão acidental de mitocôndrias paternas durante a fertilização (Kvist *et al.*, 2003). Avise (1991) concluiu, após avaliação de alguns estudos de homoplasmia em populações naturais, que a heteroplasmia normalmente resulta de mutações dentro da linhagem feminina, em vez da transmissão acidental paterna e que o estado heteroplásmico tem pouca duração evolutiva. Estas diferenças nas teorias relacionadas com a heteroplasmia devem-se, em parte, à controvérsia gerada sobre a possível intervenção paterna na transmissão mitocondrial à descendência. Uma característica vantajosa do ADN mitocondrial consiste na sua transmissão exclusivamente materna, ou seja, exceptuando possíveis mutações, as sequências de ADN mitocondrial são semelhantes para todos os indivíduos relacionados maternalmente, permitindo a definição de linhagens, sublinhando os ancestrais maternos de uma população, sem a confusa intervenção de dados biparentais ou recombinação, como descrito por alguns autores (Lansman *et al.*, 1983; Avise, 1991; Carracedo *et al.*, 2000; Pakendorf & Stoneking, 2005). Assim, cada tipo de ADN mitocondrial é definido como uma sequência (haplótipo) e é tratado como um *locus* (Carracedo *et al.*,

2000). No entanto, estes pressupostos - herança exclusivamente materna e inexistência de recombinação – têm causado alguma controvérsia. Alguns estudos animais e humanos defendem que não deve ser totalmente excluída a hipótese de que os machos tenham uma pequena contribuição de ADN mitocondrial para a descendência, sugerindo diversas teorias para a sua explicação (Kondo *et al.*, 1990; Avise, 1991; Schwartz & Vissing, 2002; Kvist *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004; Sherengul *et al.*, 2006).

De igual modo, foram já descritos estudos que demonstram a possibilidade de ocorrência de recombinação de ADN mitocondrial paterno e materno tanto em humanos (Ladoukakis & Eyre-Walker, 2004) como em animais (Ladoukakis & Zouros, 2001; Hoarau *et al.*, 2002; Piganeau *et al.*, 2004), sublinhando a existência de uma recombinase funcional nas mitocôndrias (Pakendorf & Stoneking, 2005). No entanto, ainda não é conhecido o mecanismo através do qual as mitocôndrias se fundem e trocam material genético, sendo de referir que, na ausência de transmissão paterna e de sequências de ADN heteroplásmicas (processos tidos como raros, ainda), qualquer evento de recombinação resultaria em sequências semelhantes à original, ou seja, novos haplótipos são formados apenas na presença de sequências heteroplásmicas ou transmissão paterna (Hoarau *et al.*, 2002; Rokas *et al.*, 2003; Pakendorf & Stoneking, 2005).

Apesar das funções vitais desempenhadas por este tipo de genoma, que podem pressupor uma taxa evolutiva relativamente lenta, o ADN mitocondrial apresenta uma elevada taxa de mutação (cerca de 5-10 vezes superior ao material nuclear). As alterações nas sequências de ADN mitocondrial podem surgir de diversos fenómenos (rearranjos, adições, delecções ou substituições). No entanto, as substituições nucleotídicas são consideradas a maior causa de divergência entre sequências em estudos filogenéticos, sendo que alguns estudos apresentaram taxas de substituição nucleotídica silenciosa da ordem de 4.7×10^{-8} sítio/ano neste genoma, apesar de este valor ser ainda controverso (Brown *et al.*, 1979; Avise, 1991; Hoelzel *et al.*, 1991; Pakendorf & Stoneking, 2005). Um relaxamento nas obrigações funcionais ou a falta ou ineficácia de um sistema de reparação que possa corrigir as mutações características do ADN mitocondrial podem também explicar a rápida evolução deste tipo de genoma (Avise, 1991). A existência de um sistema de reparação deveria resultar numa divergência uniforme em todas as posições nucleotídicas do ADN mitocondrial, mas diversos estudos fazem referência a zonas hipervariáveis - zonas com maior concentração de alterações genéticas que a média - sendo sugerido algum tipo de selecção como explicação para este fenómeno (Avise, 1991; Stoneking, 2000). O maior

grau de variação no ADN mitocondrial entre indivíduos, ocorre na região não codificante (região controlo), que possui "pontos quentes" mutacionais que evoluem a uma taxa 4 a 5 vezes superior à média, como por exemplo, as duas zonas hipervariáveis HVI e HVII (Carracedo *et al.*, 2000; Stoneking, 2000; Pakendorf & Stoneking, 2005). Nestas zonas, a substituição das bases não é uniforme, uma vez que as transições ocorrem mais frequentemente que as transversões, o número de transições de pirimidinas é superior ao de purinas e as taxas de substituição são variáveis de acordo com os locais do genoma (Hoelzel *et al.*, 1991; Tamura & Nei, 1993; Meyer *et al.*, 1999), permitindo que os múltiplos polimorfismos destas regiões possam ser utilizados na distinção de indivíduos baseada em haplótipos, já que permitem distinguir entre indivíduos relacionados ou não por via maternal.

As ferramentas fornecidas pela Ciência, hoje em dia, permitiram a optimização de técnicas para a utilização de ADN mitocondrial para a análise forense, mais especificamente, para identificação de indivíduos ou definição de relações de parentesco através da linhagem materna. Tal como já foi referido, este é o tipo de ADN eleito em situações com amostras em estado avançado de degradação onde existe pouca quantidade de ADN, como é o caso de amostras provenientes de fatalidades em massa ou crimes (acidentes, catástrofes naturais, situações de guerra, violações, assassinatos), onde habitualmente se torna necessário identificar cadáveres humanos ou um suspeito (Coble *et al.*, 2004). Quando aplicado a amostras animais, e tendo em conta o objectivo deste estudo, é excelente para a análise de amostras provenientes de arrojamentos. Outra vantagem do ADN mitocondrial é a sua aplicação em situações em que só existem parentes de linhagem materna como amostras de referência (Coble *et al.*, 2004).

No entanto, este tipo de ADN apresenta uma fraqueza, que reside no seu baixo poder de discriminação. Diversos estudos têm sido realizados com o objectivo de maximizar esse poder, tanto através do desenvolvimento de técnicas que aperfeiçoem os resultados obtidos por ADN mitocondrial em aplicações forenses, como através do desenvolvimento de práticas laboratoriais que minimizem a possível interferência das contaminações e erros na análise das amostras (Dizon *et al.*, 2000; Parsons & Coble, 2001; Coble *et al.*, 2004, 2006; Just *et al.*, 2004). A outra desvantagem da utilização de ADN mitocondrial advém da falta de bases de dados de referência com elevada qualidade para comparação das amostras analisadas (Edson *et al.*, 2004; Just *et al.*, 2004), sendo a situação agravada na área animal (Dizon *et al.*, 2000).

Relativamente aos cetáceos, um estudo realizado por Hoelzel *et al*. (1991) demonstrou, após análise da região controlo mitocondrial em diferentes espécies de cetáceos, que estes animais apresentam uma taxa de substituição nucleotídica (0,5%/Milhões de anos) inferior à descrita por alguns estudos para a região controlo mitocondrial humana, chegando mesmo a sugerir que os valores de substituição nucleotídica encontrada para a região controlo não diferem muito dos valores descritos para o resto do genoma. No entanto, os resultados obtidos para cetáceos foram consistentes com resultados anteriormente obtidos para a variação das sequências mitocondriais em primatas e roedores. O mesmo estudo permitiu igualmente concluir que as delecções e inserções são menos comuns na região controlo dos cetáceos do que noutros vertebrados e encontram-se normalmente nas zonas extremas 5' e 3'. Estes autores sugerem que as possíveis explicações para uma evolução mais rápida desta região do genoma mitocondrial, comparativamente com o restante genoma poderão estar relacionadas com processos de deslizamento de ADN, possíveis mutações compensatórias para conservar a estrutura do ARN e processo de selecção dentro da região controlo (Hoelzel *et al*., 1991; Árnason *et al*., 1993).

1.5. Objectivos e estrutura da tese

No contexto nacional, existe uma lacuna no conhecimento ecológico e genético sobre as populações de cetáceos. Assim, abordando apenas uma das áreas vitais para a posterior aplicação em estratégias de gestão e conservação, aponta-se como objectivo principal deste estudo a avaliação do nível de estruturação e da variabilidade genética de golfinho comum de bico curto (*Delphinus delphis*) no centro/norte de Portugal, através da análise da região controlo mitocondrial de animais arrojados nesta área. Nesta população, foi também determinado o impacto causado pela captura acidental destes animais em artes de pesca com base nos dados obtidos, através da avaliação da existência de relações entre as capturas acidentais e a estrutura social destes animais, analisando as relações entre os haplótipos dos animais capturados.

Por último, com o objectivo de detectar relações com populações de outros locais e identificar a origem destes animais, será realizada uma comparação desta população com sequências mitocondriais provenientes de animais dos Açores, Canárias, Mar Negro e Pacífico.

Estrutura da tese:

O presente capítulo (Introdução) consiste num enquadramento teórico à dissertação. Os métodos utilizados para atingir os objectivos propostos estão descritos no capítulo 2 e os resultados produzidos apresentam-se no capítulo 3, bem como a sua discussão. Por sua vez, o capítulo 4 consiste numa síntese do trabalho efectuado, em que se destacam as principais conclusões e considerações finais apontando-se algumas linhas de trabalho futuro a desenvolver.

Capítulo 2 Metodologia

2.1. Área de estudo

A área de estudo onde foram recolhidas as amostras, situa-se entre a Figueira da Foz e Ovar (Figura 2) e abrange parte das regiões Centro e Norte de acordo com Sequeira & Ferreira (1994).

Relativamente à morfologia da plataforma continental, destaca-se a presença de um canhão submarino (canhão de Aveiro), cujas cabeceiras estão entalhadas na plataforma em forma de anfiteatro voltado para Noroeste (Carta Batimétrica Internacional do Atlântico Central e Oriental 2002).

Relativamente às correntes marinhas existentes nesta área é importante referir que as componentes básicas do sistema de correntes de Portugal incluem (Âmbar, 2002):

(i) A Corrente de Portugal, uma circulação superficial permanente, para Sul, ao largo da margem continental portuguesa (a cinza, Figura 2);

(ii) A Corrente Costeira de Portugal, uma corrente superficial para sul na vizinhança do bordo da plataforma continental associada ao regime de afloramento costeiro, que ocorre durante o Verão (a cinza, Figura 2);

(iii) A Contracorrente Costeira de Portugal, uma corrente superficial para norte ao longo da vertente superior, que ocorre durante o Outono – Inverno (a preto, Figura 2);

(iv) uma Subcorrente Mediterrânea, em profundidades intermédias, transportando para norte, ao longo da vertente continental, uma massa de água quente e salgada, de origem mediterrânica (a preto, Figura 2).

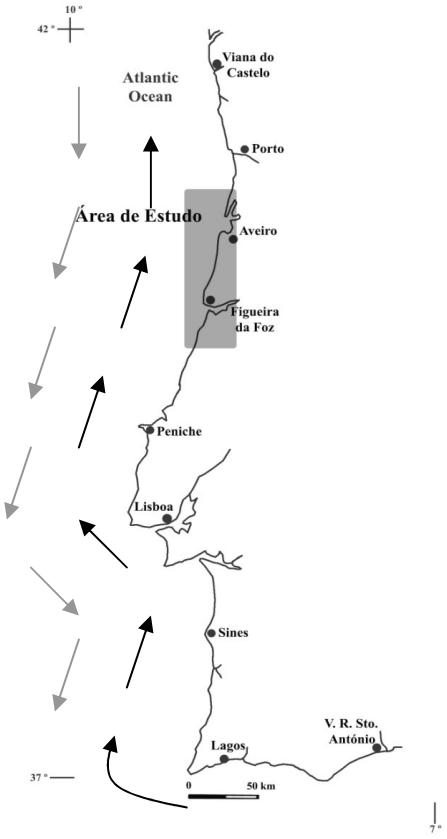

Figura 2 - Área de estudo (adaptado de Ferreira, 2007). As setas assinalam a direcção das diferentes correntes do sistema português.

A costa tem uma orientação no sentido Norte/Sul e é desabrigada dos ventos predominantes que sopram dos quadrantes noroeste e sudoeste, resultando ser muito batida pelas vagas. Em consequência dos diferentes regimes de vento, a agitação marítima ao largo da costa oeste ao longo do ano tem uma direcção que se situa próxima de oeste nos meses de Inverno, rodando para noroeste nos meses de Verão (IM, 2004).

Na área de estudo existem dois portos de pesca comerciais (Aveiro e Figueira da Foz) com importantes comunidades piscatórias. Existem também vários portos naturais que dão abrigo a embarcações que realizam a pesca das artes, também conhecida por arte de Xávega. Os portos de pesca da área de estudo estão sob a jurisdição da Capitania do Porto de Aveiro e da Capitania do Porto da Figueira da Foz. A primeira tem jurisdição sobre as áreas desde o Sul da Praia da Cortegaça (Ovar) até à margem Sul da Lagoa de Mira (Mira). A segunda tem jurisdição desde a margem Sul da Lagoa de Mira até à Praia do Pedrógão.

2.2. Amostragem

Entre os anos 2000 e 2006, foram realizadas vistorias ao longo da linha costeira situada na Costa Norte e Centro Portuguesa, pela rede de arrojamentos da Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem (SPVS) em parceria com o Instituto para a Conservação da Natureza e da Biodiversidade (ICNB). Nestas vistorias, os cetáceos arrojados foram identificados e procedeu-se ao registo de biometrias e ao processo de necrópsia, segundo protocolos padronizados (Kuiken & Hartmann, 1991; Geracy & Lounsbury, 1993; Rowles *et al.*, 2001), para determinação da possível causa de morte, patologias e para recolha de amostras biológicas, para posteriores estudos de reprodução, toxicologia, genética e parasitologia.

Para o presente estudo, foram utilizadas 41 amostras de tecido (pele e músculo) de golfinho comum (*Delphinus delphis*), resultantes de arrojamentos entre a Figueira da Foz e Ovar, entre 2004 e 2006 (ver Anexo I) e conservadas em etanol 70%.

2.3. Extracção de ADN Total

As amostras foram extraídas por método de Fenol:Clorofórmio, como descrito em Sambrook *et al*. (1989). Este método consistiu na digestão de uma porção de amostra com 300 µl de CTAB e 25 µl de proteinase K (20 $mgml^{-1}$), seguido de agitação e incubação a 37ºC durante a noite, após a qual foram adicionados 25 µl de solução RNA-ase (20 $mgml^{-1}$) no tubo, incubando novamente a 37ºC durante 1 hora. Após incubação, foram adicionados ao tubo 350 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24:1), seguido de agitação durante 1 hora, à temperatura ambiente, de modo a proporcionar uma mistura eficaz das duas fases e centrifugado a 14000 rpm durante 5 min, para separação da fase aquosa da fase orgânica. Depois de retirar o sobrenadante para um novo tubo, realizou-se nova extracção com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A agitação e a centrifugação nos tubos foram efectuadas nas condições anteriormente descritas, obtendo-se uma fase aquosa límpida. Após extracção, o ADN foi precipitado com etanol absoluto seguido de centrifugação a 14000 rpm, durante 5 s, sendo realizado o mesmo protocolo de centrifugação após nova precipitação com etanol 70%. No final, o ADN precipitado foi ressuspenso com 100 µl de água esterilizada.

O ADN de amostras mais difíceis foi extraído através do método Chelex (Walsh *et al*., 1991). Neste método, foi adicionado 1 ml de água destilada a uma porção de cerca de 9 mm^2 de amostra, seguido de incubação à temperatura ambiente durante cerca de 15 a 30 min. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm, durante 3 min, sendo de seguida retirado parte do sobrenadante, uma vez que ficaram no tubo cerca de 25 µl de sobrenadante, ao qual se adicionou 175 µl de Chelex 5%. Após nova incubação durante 15 a 30 min a 56ºC e agitação, o tubo foi colocado num banho em ebulição durante 8 min. Por fim, foi de novo misturado e centrifugado 3 min a 14000 rpm.

Em ambos os procedimentos, as amostras foram utilizadas logo após extracção ou congeladas até posterior utilização.

2.4. Amplificação e sequenciação

Os marcadores utilizados para a amplificação e sequenciação da região controlo do ADN mitocondrial, descritos por Rosel *et al*. (1994), foram desenhados para amplificar uma área central conservada dentro da região de controlo (Tabela I).

Tabela I - Características dos marcadores da região controlo mitocondrial seleccionados.

Marcador	Sequência	Tamanho
L15926	5'aca cca gtc ttg taa acc 3'	630 bp
H00034	5' tac caa atg tat gaa acc tca g 3'	

As condições da reacção de amplificação da região controlo do ADN mitocondrial de *Delphinus delphis* foram realizadas utilizando o Qiagen Taq PCR Core Kit® num volume total de 25 µl, contendo 0,4 µM de cada iniciador, 1x tampão com $MgCl_2$ (1,5mM), 200 µM de dNTPs, Solução Q (1x), 0,1U de *Taq* DNA Polymerase e 1 µl de amostra de ADN. O programa de amplificação consistiu em: 4 min a 94ºC; 35 ciclos de 45s a 94ºC, 45s a 50ºC, 1min a 72ºC; 8min a 72ºC.

Após amplificação, a purificação de cada amostra amplificada (5 µl) foi realizada com a enzima Exosap-It® (2 µl), tendo o programa de purificação consistido em: 15 min a 57ºC, 15 min a 80ºC. Após purificação, as reacções de amplificação para sequenciação foram realizadas com o ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit® num volume total de 10 µl, contendo 1 µM de iniciador directo, tampão de sequenciação (0,5x), 2 µl de Kit de sequenciação e 2 µl de amostra purificada. O programa de amplificação utilizado consistiu em: 1min a 96ºC; 25 ciclos de 10s a 90ºC, 5s a 50ºC, 4min a 60ºC. De notar que, as amostras que após sequenciação, apresentaram uma sequência difícil de analisar foram amplificadas novamente com a reacção de amplificação descrita anteriormente, substituindo o iniciador directo pelo reverso.

Após amplificação, o produto amplificado foi precipitado com 2 µl de acetato de sódio (3M com pH = 4,6) e 50 µl de etanol 95% e após incubação à temperatura ambiente durante 20 min e centrifugação a 14000 rpm durante 20 min, foi ressuspenso com 250 µl de etanol 70% e de novo centrifugado durante 5 min a 14000 rpm. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante e secou-se o precipitado. De seguida, a amostra foi preparada para ser sequenciada num sequenciador automático ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Em cada aplicação no sequenciador automático foram utilizados 25µl de formamida desionizada. A visualização dos resultados foi efectuada com a aplicação Sequencing Analysis® 3.7 da Applied Biosystems.

2.5. Análise e tratamento de dados

As sequências foram editadas e alinhadas utilizando os programas BioEdit v.4.0® (Hall, 1999) e Clustal W® (Thompson *et al.*, 1994, 1997) e foram comparadas com 42 sequências publicadas de populações de *Delphinus delphis* do Pacífico e Mar Negro (Rosel *et al.*, 1994), Açores (Matzen Silva *et al.*, 2002) e Canárias (Hildebrandt *et al.*, 2006). Foi utilizada uma sequência de *Delphinus delphis* como amostra de referência para detecção de polimorfismos (Acesso GenBank: DQ378098).

Diversos estudos referem os cuidados a ter na análise de ADN mitocondrial de modo a definir protocolos para evitar ou minimizar os efeitos de possíveis contaminações ou erros de análise no resultado final (Carracedo *et al.*, 2000; Dizon *et al.*, 2000; Bandelt *et al.*, 2001; Edson *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; Budowle *et al.*, 2005). Em análise de ADN mitocondrial são referidos como a maior causa de equívocos, os erros consequentes da verificação do processo de sequenciação de amostras, que consistem, na maioria das vezes em trocas de bases, referências ambíguas, mutações fantasma e artefactos na recombinação (Bandelt *et al.*, 2001).

Os protocolos utilizados neste estudo para obtenção de sequências da região controlo mitocondrial de golfinho comum, de modo a tentar ultrapassar os entraves resultantes dos erros acima descritos, consistiram no alinhamento e posterior revisão das sequências das amostras, realizada por duas pessoas, e criação de uma lista de polimorfismos, através da comparação com uma amostra de *Delphinus delphis* (Acesso GenBank: DQ378098), que apresentava maior percentagem de identidade com as amostras utilizadas neste estudo. De notar, que algumas amostras, como já descrito acima, foram sequenciadas nos dois sentidos de forma a obter resultados mais robustos e a eliminar dúvidas. De seguida, em casos humanos é aconselhável inserir as sequências das amostras numa base de dados com indivíduos de referência dentro da população de modo a tentar perceber como se relacionam filogeneticamente com indivíduos do mesmo haplogrupo e até de haplogrupos vizinhos e assim conseguir detectar possíveis artefactos de recombinação e mutações fantasma (Bandelt *et al.*, 2001). Neste estudo, foi utilizada uma base de dados de sequências de cetáceos (NCBI, 2007), e realizada uma comparação com todas as sequências de cetáceos de espécies e populações existentes na base de dados, para verificar se a detecção de polimorfismos estaria a ser bem realizada.

2.4.1. Análise da estruturação populacional de *Delphinus delphis*

2.4.1.1. Relações entre haplótipos

Foram utilizados diversos métodos para reconstruir as relações filogenéticas entre os haplótipos encontrados para a região controlo mitocondrial: 1) o método de *Neighbour-Joining* (Saitou & Nei, 1987), 2) o método *Maximum Parsimony* (Eck & Dayhoff, 1966) e 3) o método *Median Joining* (Bandelt *et al*., 1999).

O método de *Neighbour-Joining* considera as distâncias evolutivas entre um conjunto de sequências para reconstruir a sua história evolutiva. Tem como princípio definir unidades taxonómicas operacionais (OTUs), sendo preferida, em cada passo do algoritmo, a topologia que envolva o menor comprimento total dos ramos. Neste método, a árvore foi construída utilizando o programa PAUP v.4® (Swofford, 2003), com 1000 réplicas *bootstrap*, sendo as distâncias genéticas baseadas no modelo de distância Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). Foi tido em conta um critério de 50% para retenção dos nós (*majority rule consensus*) e as falhas (*gaps*) foram consideradas como uma 5ª base.

O método *Maximum Parsimony* baseia-se nos caracteres filogenéticos discretos dos taxa a analisar, de modo a seleccionar a árvore que requer o menor número de eventos mutacionais necessários para determinar a evolução de um conjunto de sequências a partir de um ancestral comum. Quando o conjunto de dados a ser analisado é considerável, torna-se aconselhável realizar uma pesquisa *heurística*, que consiste numa árvore inicial que vai sendo rearranjada de modo a tentar alcançar o critério seleccionado como óptimo nesta análise (geralmente o menor comprimento dos ramos). Neste método, as árvores foram construídas utilizando o programa PAUP v.4® (Swofford, 2003), tendo em conta uma pesquisa heurística com o algoritmo *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR), para a alteração dos ramos e com 1000 réplicas *bootstrap*. Foi tido em conta um critério de 50% para retenção dos nós (*majority rule consensus*) e as falhas (*gaps*) foram consideradas com uma 5ª base.

As relações entre haplótipos foram também inferidas utilizando o método *Median Joining* (Bandelt *et al*., 1999). Ao contrário dos métodos anteriores, as relações obtidas a partir deste método não estão limitadas ao formato árvore, permitindo assim que estas formem estruturas gráficas interconectadas entre si, onde cada conexão adicional representa caminhos mutacionais alternativos (igualmente parsimónios), de um haplótipo para o outro.

Além disso, este método é indicado para o estudo das relações entre haplótipos ao nível populacional que normalmente apresentam distâncias genéticas reduzidas entre indivíduos, uma vez que considera a ocorrência de recombinação, a existência de haplótipos ancestrais na população e tem em consideração a falta de variação nucleotídica a nível intrapopulacional, que os métodos "tradicionais" não conseguem contemplar (Bandelt *et al.*, 1999; Clement *et al.*, 2000; Posada & Crandall, 2001). Este método combina o algoritmo de Kruskal, que selecciona árvores onde são favorecidas as conexões mais curtas, com o algoritmo heurístico de máxima parsimónia de Farris, que sequencialmente lhes adiciona novos vértices baseados em haplótipos intermédios, de forma a reduzir o comprimento total da árvore (Bandelt *et al.*, 1999). Foram realizadas duas simulações neste método, nas quais se alterou o peso das substituições nucleotídicas, sendo consideradas como razões transversões:transições os valores 1:1 e 3:1, uma vez que diversos estudos baseados em análise de ADN mitocondrial humano, mas também animal (nomeadamente de cetáceos), concluíram que a nível mitocondrial as transições ocorrem muito mais frequentemente que as transversões, aceitando-se um nível de 3:1 (Hoelzel *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1999). Foi construída uma rede de haplótipos, utilizando o programa NETWORK v.4.2.0.1® (Bandelt *et al.*, 1999).

2.4.1.2. Medidas de diversidade genética

As estimativas de medidas de diversidade genética e estrutura populacional foram calculadas utilizando os programas DnaSp v.4.10.9® (Rozas *et al.*, 2003) e ARLEQUIN v.3.1® (Excoffier *et al.*, 2005).

Como medidas de diversidade genética foram estimadas as quantidades relacionadas com as diversidades nucleotídica (π) e haplotípica (h). A estimativa da diversidade haplotípica resulta de uma função entre o número de haplótipos existente na população e das suas frequências (Nei & Tajima, 1981). Relativamente à estimativa da diversidade nucleotídica (π), esta pode ser calculada a partir da divisão da proporção média de diferenças nucleotídicas entre os pares de sequências (K) pelo comprimento total da sequência analisada (Nei, 1987).

Foi estimada a diversidade nucleotídica para as amostras de golfinho comum da costa continental portuguesa centro/norte, mas também para os *Delphinus delphis* dos Açores, Pacífico, Mar Negro e Canárias, com o objectivo de ter em conta as diversas

subdivisões que poderão ocorrer entre as amostras, tal como já realizado por alguns estudos (Rosel *et al.*, 1994; Amaral *et al.*, 2007).

2.4.1.3. Medidas de divergência genética

Para determinar possíveis subpopulações dentro da população portuguesa centro/norte foram utilizados os métodos filogenéticos descritos no ponto 2.4.1 deste Capítulo. Posteriormente, foram calculadas as medidas de divergência genética numa tentativa de averiguar a possível existência de estruturação, tanto a nível local, na população de Portugal centro/norte, quanto a nível global, na comparação da população portuguesa com as populações de *Delphinus delphis* dos Açores, Canárias, Mar Negro e Pacífico.

Foi calculado o valor de divergência nucleotídica entre populações, através da estimativa do número de diferenças nucleotídicas que ocorrem entre as populações (D_A). Esta medida incorpora informação tanto das frequências haplotípicas quanto das diferenças nucleotídicas entre haplótipos, fornecendo o nível de distância genética entre as populações e pode ser estimada por:

$$D_A = \pi xy - \frac{\pi x + \pi y}{2} \qquad \text{(Nei \& Li, 1979)}$$

Onde:

πxy – número médio de substituições nucleotídicas, por local nucleotídico, entre duas populações;

πx e πy – número médio de substituições nucleotídicas, por local nucleotídico, dentro de cada população.

Este cálculo foi realizado tendo em conta a distância de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), com uma correcção gama de 0,05, através da utilização do programa ARLEQUIN v.3.1® (Excoffier *et al.*, 2005).

Outro método estatístico utilizado neste estudo para avaliar o grau de divergência genética entre as populações definidas, foi a estimativa dos parâmetros F_{ST} (Wright, 1951) e o seu análogo Φ_{ST} (Excoffier *et al.*, 1992). A estatística F_{ST} através da combinação de várias medidas de heterozigotia a diferentes níveis (indivíduos, subpopulações e população total),

permite uma descrição detalhada da estrutura populacional (Hartl & Clark, 1997). A estatística Φ_{ST} permite igualmente a estimativa do grau de subdivisão entre as populações definidas (devido a variação entre populações, entre grupos dentro das populações e dentro dos grupos das populações), no entanto incorpora as distâncias genéticas entre os haplótipos conjuntamente com as frequências haplotípicas (Excoffier *et al.*, 1992), ao contrário de F_{ST}, que apenas tem em consideração as diferenças entre haplótipos e as suas frequências. Esta estimativa foi calculada através de uma análise de variância molecular hierárquica, AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), incorporada no software ARLEQUIN v.3.1®. Esta análise permite estimar índices de estrutura genética, baseada na informação alélica dos haplótipos, bem como a sua frequência, podendo determinar diversos níveis de estruturação genética, através de procedimentos de permutações não paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992). Para tal, foi utilizado o método de distância Tamura – Nei (Tamura & Nei, 1993), com uma correcção gama (α = 0,5). A significância estatística dos dados foi testada através de simulações com 1000 permutações.

Numa tentativa de detectar a origem das amostras tendo em conta as correntes marinhas existentes na costa portuguesa foi realizada uma análise da diferenciação existente entre as amostras do centro/norte de Portugal detectadas no Verão e no Inverno e as diferentes populações. Na literatura disponível encontram-se principalmente 2 tipos de agrupamentos: Inverno (Dezembro - Fevereiro), Primavera (Março - Maio), Verão (Junho - Agosto) e Outono (Setembro - Novembro) (Silva & Sequeira, 2003; Ferreira, 2007) *versus* Inverno (Janeiro – Março), Primavera (Abril – Junho), Verão (Julho – Setembro) e Outono (Outubro – Dezembro) (Murphy, 2004). Ferreira (2007) no seu estudo de ocorrência e captura acidental de cetáceos na mesma área do presente estudo, realizou a análise trimestral de arrojamentos de golfinho comum tendo em conta o primeiro agrupamento descrito, de acordo com os resultados de uma Análise de Componentes Principais (PCA), que agruparam os arrojamentos desta espécie segundo as suas similaridades. Tendo em conta este estudo já realizado na mesma área geográfica e que as correntes que compõem o sistema português apresentam uma sazonalidade dividida entre Verão e Outono-Inverno, foram definidos os agrupamentos Primavera – Verão (Março - Agosto) e Outono – Inverno (Setembro - Fevereiro).

Após a definição dos agrupamentos foram estimados os parâmetros F_{ST} (Wright, 1951) e o seu análogo Φ_{ST} (Excoffier *et al.,* 1992), através de uma análise de variância molecular hierárquica, AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), incorporada no software ARLEQUIN

v.3.1®. Para tal, foi utilizado o método de distância Tamura – Nei (Tamura & Nei, 1993), com uma correcção gama (α = 0,5). A significância estatística dos dados foi testada através de simulações com 1000 permutações.

Por fim, foi utilizado um método indirecto para a estimativa dos níveis de fluxo genético existente entre as diferentes populações em termos do número efectivo de migrantes. Foi avaliada a taxa de migração de indivíduos, através da estimativa do parâmetro de migração $N_f m$ calculado a partir de F_{ST} ou do seu análogo $\Phi_{ST,}$ tendo em conta a fórmula:

$$N_f m = \frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}} \qquad \text{(Slatkin, 1991)}$$

Onde, N_f é o número médio de fêmeas na população e m é a proporção de migrantes por geração, sendo $N_f m$ o número absoluto de fêmeas que migram entre as populações. Esta fórmula segue o modelo de ilha de Wright (1951), que tal como sugerido por Vrijenhoek (1997), é o modelo mais adequado para espécies com capacidade de dispersão de longas distâncias. É importante recordar que, a estimativa $N_f m$ é influenciada tanto pela variação existente dentro de cada população, como pelo tipo de isolamento das populações (isolamento por distância ou por barreira geográfica) (Pichler, 2002).

2.4.1.4. Testes de Neutralidade

Para testar se o polimorfismo observado nas regiões do ADN estudadas é consistente com o modelo de evolução neutral, foram estimadas as estatísticas D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs (Fu, 1997). Estes testes indicam se a selecção e/ou processos demográficos são factores a considerar como explicação das frequências haplotípicas observadas, por oposição à deriva genética e selectividade neutral.

A medida D de Tajima (1989) é baseada no modelo de número infinito de sítios (ISM) e para testar a hipótese nula de selectividade neutral e população em equilíbrio, compara dois parâmetros de Θ (medida de diferenciação genética baseada nos polimorfismos entre sequências), através da fórmula:

$$D = \frac{\theta k - \theta s}{\sqrt{Var(\theta k - \theta s)}}$$ (Tajima, 1989)

Onde:

k - número médio de diferenças nucleotídicas entre os pares de sequências

s – número de polimorfismos nucleotídicos observados na amostra.

Por sua vez, o teste Fs de Fu (1997), tal como o teste de Tajima baseia-se na teoria do número infinito de sítios (ISM), para avaliar a probabilidade de existir uma amostra neutral com o número de alelos igual ou inferior ao observado, dado o número de diferenças entre duas sequências (S'). Esta estimativa pode ser obtida através da fórmula:

$$Fs = \left(\frac{S'}{1 - S'} \right)$$ (Fu, 1997)

Estas estatísticas de selectividade neutral foram calculadas através de 1000 simulações, recorrendo ao programa ARLEQUIN v.3.1® (Excoffier *et al.*, 2005).

2.4.2. Análise da linhagem materna e relação com capturas acidentais

Determinaram-se as diferenças genéticas entre pares de haplótipos através da análise das relações filogenéticas entre estes, obtidas pelos métodos de inferência descritos no ponto 2.4.1 deste Capítulo.

Uma vez que o ADN mitocondrial é maternalmente herdado, todos os parentes de linhagem materna apresentam sequências de ADN mitocondrial idênticas entre si, se não ocorrerem mutações, tal como já foi referido por diversos estudos (Lansman *et al.*, 1983; Avise, 1991; Carracedo *et al.,* 2000; Pakendorf & Stoneking, 2005). No presente estudo, como uma das intenções era analisar a possível ocorrência de capturas acidentais de grupos familiares de golfinho comum conciliaram-se as informações genéticas obtidas relativamente à partilha de linhagens maternas com as informações que se possuíam *à priori* sobre as amostras, nomeadamente o ano, o mês e a localização dos arrojamentos, o sexo do animal,

o estado de decomposição do corpo, a ocorrência de indícios de captura acidental e a arte de pesca envolvida.

Capítulo 3 Resultados e Discussão

3.1. Estruturação populacional de *Delphinus delphis*

3.1.1. Estruturação populacional a nível local

O primeiro passo, neste estudo, foi a análise das medidas de diversidade genética apresentadas pelos 589 pares de bases sequenciados da região controlo mitocondrial das amostras de *Delphinus delphis* arrojados na área de estudo (centro/norte de Portugal) e a detecção da sua possível estruturação genética. Nestes indivíduos, esta região apresenta 40 *loci* polimórficos (*s*), sendo que 37 das 40 (92,5%) mutações detectadas foram transições e não ocorreram delecções, um resultado consistente com a taxa de substituições descritas para outras espécies de cetáceos (Hoelzel *et al.*, 1991). No entanto, ocorreu uma inserção de uma base nas sequências de alguns indivíduos, fenómeno também já verificado no estudo realizado por Amaral *et al.* (2007)**.** Os polimorfismos descritos conduziram à definição de 27 haplótipos (Anexo II), que foram aplicados na análise da estruturação desta população.

A Tabela II sumaria os resultados estatísticos de diversidade genética apresentados por esta população. Os valores obtidos em termos de diversidade nucleotídica (π) foram relativamente elevados e similares a valores obtidos para outras populações da mesma espécie, como a população do Pacífico (1,8%) (Rosel *et al.*, 1994) e populações do Atlântico (1,4% - 1,8%) (Natoli *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2007).

Tabela II - Medidas de diversidade genética estimadas para a população de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte.

N	*h*	Π (%)	*K*	*S*
41	0.97 +/- 0.02	1.33 +/- 0. 70	7.68	40

N – número de indivíduos; *h* - Diversidade haplotípica (média+/-desvio padrão); π – Diversidade nucleotídica (média+/-desvio padrão); *k* - número médio de diferenças nucleotídicas entre os pares de sequências; *s* - proporção de polimorfismos nucleotídicos observados na amostra.

A amostragem de indivíduos de golfinho comum realizada, resulta de arrojamentos limitados a uma região relativamente reduzida tendo em consideração a capacidade de movimentação destes animais. No entanto, diversos factores relacionados com a localização

dos animais por altura da sua morte ou com a influência das condições atmosféricas ou marinhas no transporte das carcaças, levam a que indivíduos que arrojem na mesma área, possam provir de diferentes populações.

Uma população de grandes dimensões pode encontrar-se dividida em subpopulações que consistem em unidades base onde ocorrem acasalamentos aleatórios e onde existe maior probabilidade de os indivíduos acasalarem entre si do que com indivíduos de outras subpopulações (Hartl & Clark, 1997). Relativamente à população em estudo, não foi possível efectuar uma abordagem comum à maioria dos estudos de estruturação populacional, que consiste na definição de subpopulações baseando-se na distribuição geográfica das amostras, uma vez que estas provêm, tal como referido anteriormente, de animais arrojados numa área de amostragem relativamente pequena. Assim, de modo a reduzir ao máximo a subjectividade associada à definição de subpopulações, o nível de estruturação genética desta população foi obtida através da combinação de vários métodos filogenéticos. Foram simulados vários cenários, com a variação de alguns parâmetros e foram introduzidas replicações *boostrap* nos métodos *Neighbour-Joining* e *Maximum Parsimony*, de modo a avaliar a robustez das inferências. O valor *bootstrap* resulta da reamostragem de nucleótidos das sequências a analisar filogeneticamente e sucessiva reconstrução de árvores, sendo a variação entre as árvores importante para definir o erro resultante das estimativas a partir das sequências originais. Para esta medida, os valores abaixo de 50 % não deverão ser considerados, sendo óptimos os valores que se aproximam de 100%, os quais indicam que os caracteres informativos desse grupo comprovam que se trata de um grupo (Felsenstein, 1985).

Após a realização das simulações, os métodos seleccionados para a análise filogenética não permitiram agrupar os diferentes haplótipos em diferentes subpopulações. Os métodos filogenéticos *Neighbour-Joining* e *Maximum Parsimony* permitiram alcançar resultados similares entre si (Figuras 3 e 4). Estes métodos demonstraram que, de uma forma geral, os indivíduos amostrados aparentemente não apresentam suficiente proximidade genética entre si para que ocorra diferenciação de “grupos” relativamente aos restantes indivíduos. Esta inexistência de afinidade é comprovada pelos valores *bootstrap*, uma vez que valores abaixo de 50% não foram considerados e as únicas relações filogenéticas representadas são as existentes entre os haplótipos L - V, B - E, G - K, D - U e N - O e a separação dos haplótipos AB, I e S dos restantes (Figura 3 e 4).

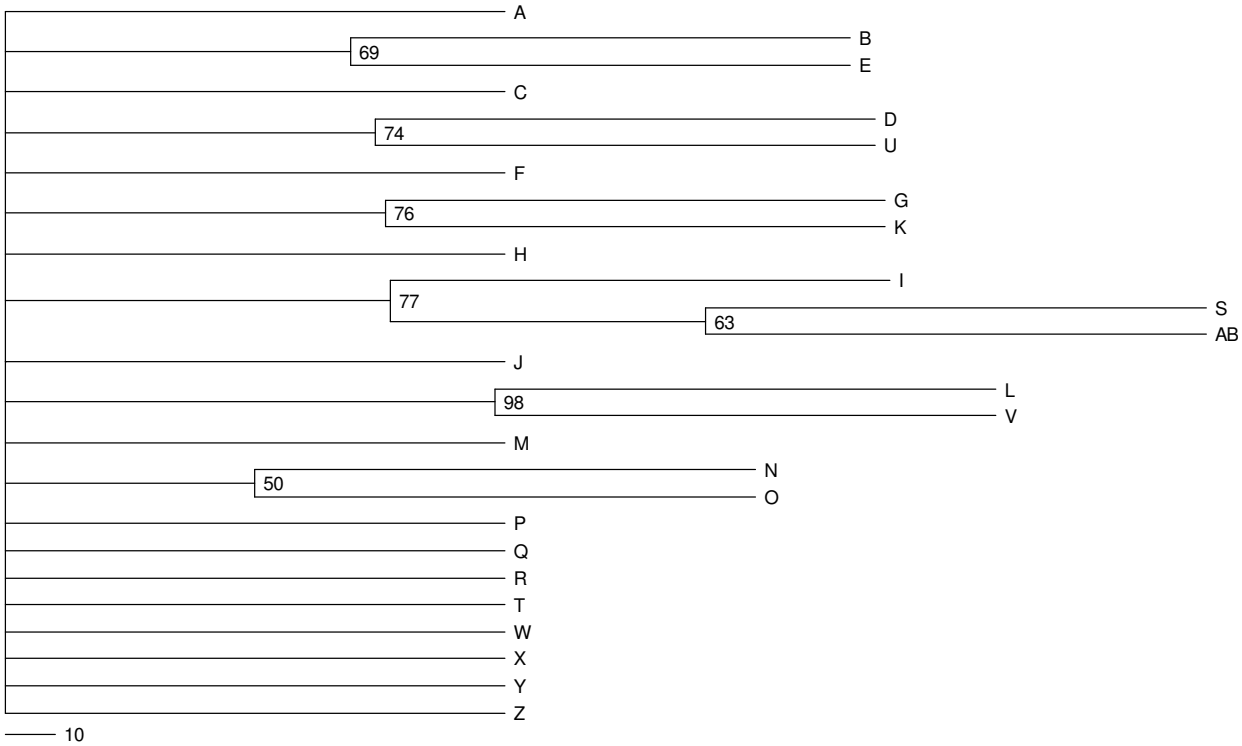

Figura 3 - Árvore *Maximum-Parsimony* ilustrando as relações filogenéticas entre os 27 haplótipos de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. São indicados os valores *bootstrap* acima de 50%.

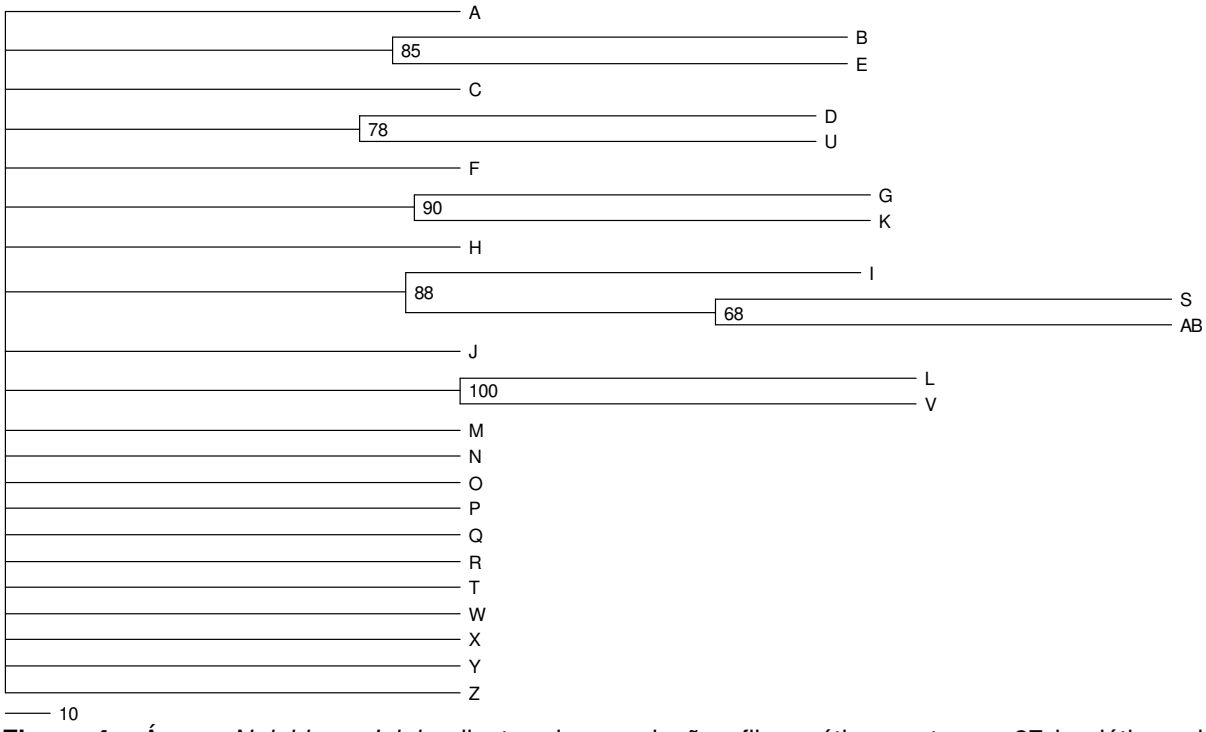

Figura 4 - Árvore *Neighbour-Joining* ilustrando as relações filogenéticas entre os 27 haplótipos de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. São indicados os valores *bootstrap* acima de 50%.

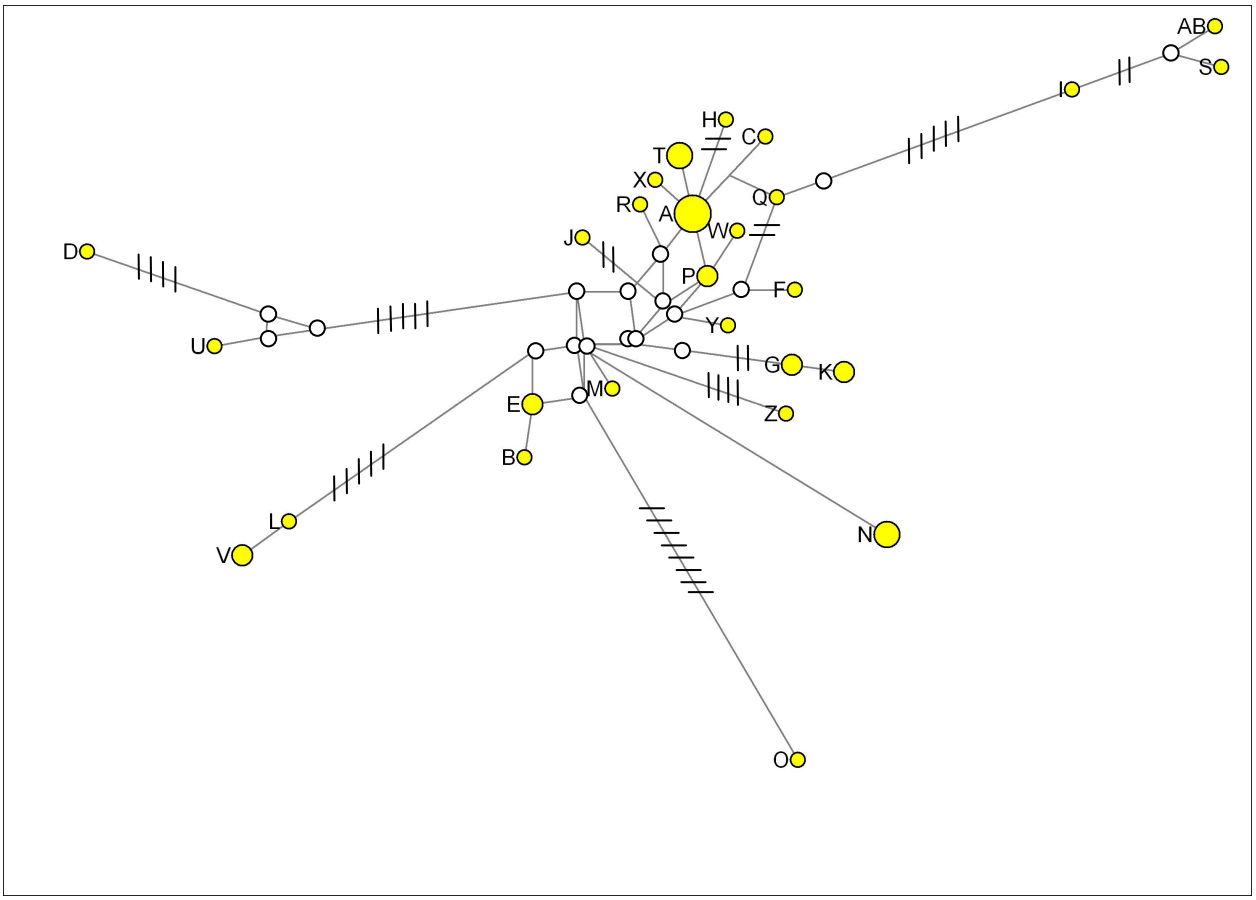

Figura 5 - Rede *Median Joining* entre os haplótipos da região controlo mitocondrial de *Delphinus delphis* de Portugal centro/norte. O tamanho do círculo é proporcional ao número de indivíduos que apresentam o respectivo haplótipo. Os círculos brancos representam haplótipos extintos ou não amostrados. Os traços representam o número de mutações entre haplótipos quando mais de uma mutação está presente.

As diferenças entre as duas redes *Median Joining* não foram significativas, sendo apenas representada a rede que considera as transversões:transições de 1:1. Esta permite visualizar um agregado de haplótipos na zona central em formato de estrela, onde se evidencia o haplótipo A, que se encontra a menos de um passo mutacional dos haplótipos T, X e P. Este resultado, juntamente com as árvores filogenéticas acima representadas, demonstra que os haplótipos pertencentes ao núcleo central, terão divergido recentemente. Mais distantes da zona central da rede, separados por haplótipos já extintos ou que não foram amostrados, apresentam-se os haplótipos E, B, G, K, L, V, AB, I e S, apenas a um passo mutacional entre si, em concordância com os resultados obtidos anteriormente através dos métodos filogenéticos “tradicionais” (Figura 5). Estes haplótipos são, regra geral,

partilhados por indivíduos de diferentes anos, recolhidos em diferentes locais (Anexos II e III), com excepção dos haplótipos A e V, o que será discutido mais adiante.

Numa tentativa de comprovar e reforçar estatisticamente os resultados de estruturação populacional e assim conferir mais robustez a esta análise, foram analisados os valores dos índices de fixação F_{ST} e Φ_{ST}, tendo em conta as populações de diferentes anos. Em ADN mitocondrial, a estatística F_{ST} é baseada na correlação de um par de haplótipos ao acaso na subpopulação, relativamente à população total (Wright, 1951), considerando apenas diferenças qualitativas e as frequências dos haplótipos, em vez da distância genética entre eles (Excoffier *et al.*, 1992). No entanto, a medida $\Phi_{ST,}$ ao contrário do $F_{ST,}$ já integra as distâncias genéticas entre os diferentes haplótipos e as suas frequências para determinar o grau de variação intra e interpopulacional (Excoffier *et al.*, 1992). Os valores de diferenciação variam entre 0 (indicando nenhuma variação entre a população total e as suas subpopulações) e um máximo teórico 1, ainda que na prática, populações com elevado nível de diferenciação apresentam valores muito abaixo de 1. Assim, valores de diferenciação entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada, entre 0,15 e 0,25, diferenciação elevada e valores superiores a 0,25 indicam um grau muito elevado de diferenciação (Hartl & Clark, 1997). Quando consideradas apenas as diferenças na identidade e frequências dos haplótipos (F_{ST}), a população geral apresentou um valor muito baixo (0,000), estatisticamente não significativo ($p>0,05$), tendo sido obtidos resultados similares com a estatística Φ_{ST} (0,019). Estes resultados indicam que apenas 1,9% da variância das distâncias genéticas entre haplótipos é devida a diferenças interpopulacionais, sendo este um valor muito baixo comparativamente com outros estudos populacionais desta e de outras espécies de cetáceos (41% em populações de roaz corvineiro: Parsons *et al.*, 2002; 8,9 - 86,7% em populações de roaz corvineiro: Natoli *et al.*, 2004; 5 - 24,4% em populações de golfinho comum: Natoli *et al.*, 2006).

Estes valores comprovam os resultados obtidos filogeneticamente, indicando que aparentemente não existe estruturação subpopulacional dentro desta população de golfinho comum, passando os indivíduos de Portugal centro / norte a ser tratados como uma única população nas análises estatísticas seguintes. Estes resultados são coincidentes com o estudo populacional desta espécie, realizado a nível do Oceano Atlântico por Natoli *et al.*, (2006). A análise genética mitocondrial e nuclear de diferentes populações de golfinho comum do lado nordeste do Atlântico (Escócia, Galiza, Açores, Madeira e Canárias), segundo este autor, apresentou pouco ou nenhum nível de divergência genética entre

populações, evidenciando grande fluxo genético entre si e reflectindo a grande mobilidade desta espécie e a sua estrutura social fluida. No entanto, outro estudo baseado na análise da região controlo e do citocromo b mitocondrial de populações da Escócia, Espanha e Portugal sugeriu algum nível de diferenciação entre estas populações (Amaral *et al.*, 2007). De igual modo, foram obtidos resultados similares num estudo morfológico das características cranianas desta espécie, principalmente para indivíduos de Portugal que apresentavam segregação relativamente a outras áreas geográficas (Murphy *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo sugerem a existência de apenas uma população de *Delphinus delphis* ao longo do Atlântico Nordeste, no entanto, torna-se necessária uma análise mais global do nível de estruturação genética desta espécie para clarificar a divergência de resultados obtidos em estudos populacionais de golfinho comum.

3.1.1.1. Testes de neutralidade

O ADN mitocondrial tem sido vastamente utilizado em estudos de genética populacional, filogeografia e filogenia, assumindo que as frequências haplotípicas são devidas principalmente a migração e deriva genética e que a maioria da variação intraespecífica é selectivamente neutral, sendo o ADN mitocondrial considerado um marcador neutral (Ballard & Rand, 2005).

Tendo em conta os testes de neutralidade analisados neste estudo, se a população estiver a evoluir com base na teoria da evolução neutral, em equilíbrio, o valor de D deveria ser igual ou muito próximo de 0 (Tajima, 1989). No entanto, a selecção natural altera a estrutura de variação genética intrapopulacional e as estimativas de Θ serão afectadas de diferentes modos, uma vez que a ocorrência de mutações deletérias poderá afectar fortemente a estimativa *s* ao contrário de *k*, conduzindo a diferentes valores de Θs e Θk, se as mutações observadas tiverem um papel selectivo. Segundo Hartl & Clark (1997), valores negativos de D podem evidenciar uma população em crescimento, uma vez que o aumento da variação ocorre primeiro em alelos raros, o que mais rapidamente afectará o valor de *s*.

Relativamente à estatística Fs, esta tende a apresentar um valor negativo quando existe um excesso de mutações recentes e consequentemente um excesso de alelos raros, sendo considerado contra a neutralidade das mutações se o valor negativo for muito elevado (Fu, 1997). Um valor significativo de Fs pode indiciar que processos como crescimento efectivo populacional ou ”boleia” genética aconteceram no passado (Fu, 1997).

Na tabela III são apresentados os valores obtidos para os dois testes de neutralidade. A conjugação dos resultados obtidos nos dois testes permite indiciar um crescimento da população, com excesso de mutações recentes, apesar de o valor de D não ser significativo (p>0,05). Este resultado relativamente à estimativa D, por sua vez, indica que não existem evidências de que a selecção esteja a actuar neste fragmento de ADN.

Tabela III - Estimativas dos testes de neutralidade.

	D	**Fs**
Delphinus delphis	-0.625	-24.954***

D – estimativa calculada segundo Tajima (1989); Fs – estimativa calculada segundo Fu (1997); (***) – p<0,001.

O valor de Fs vem reforçar o resultado obtido na rede *Median Joining* da população de Portugal centro/norte (Figura 4), uma vez que o formato estrela dos haplótipos centrais, juntamente com este valor podem indicar possível expansão recente desta população.

3.1.2. Estruturação populacional a nível global

Realizou-se uma análise populacional global, onde se compararam as sequências obtidas neste estudo, com sequências pertencentes a outras populações desta espécie, retiradas do Genebank, que incluíram quatro sequências dos Açores (Matzen Silva *et al.*, 2002), 21 sequências das Canárias (Hildebrandt *et al.*, 2006), três sequências do Mar Negro (Rosel *et al.,* 1994) e 14 sequências do Pacífico (Rosel *et al.*, 1994). De notar que, apesar de nesta análise serem calculadas estimativas de diversidade e divergência genética, tendo em conta todas as populações, iremos incidir sobre os resultados relativos à comparação da população de Portugal centro/norte com as restantes populações, de modo a tentar perceber se as amostras resultantes de arrojamentos analisadas anteriormente, poderão ter origem ou relação com alguma das populações mencionadas.

O alinhamento destas sequências resultou num total de 392 pares de bases com 58 posições polimórficas, tendo sido definidos 58 haplótipos, dos quais 24 eram comuns a Portugal centro/norte.

Numa abordagem filogenética inicial, é possível verificar que, dos 24 haplótipos definidos para a população de Portugal centro/norte, existe partilha de haplótipos entre esta população e amostras dos Açores (1), das Canárias (5) e do Mar Negro (2), ao contrário do que acontece com o Pacífico que não partilha nenhum haplótipo com a população de Portugal centro/norte (Figura 6). Apesar de aparentemente existirem haplótipos não amostrados, estes resultados podem evidenciar possíveis relações de linhagem materna entre as diferentes populações que partilham haplótipos entre si, bem como elevados níveis de fluxo genético, principalmente entre indivíduos de Portugal centro/norte e das Canárias, o que revela a grande capacidade de dispersão desta espécie. Segundo Crandall & Templeton (1993), haplótipos ancestrais ocupam posições centrais nas filogenias, apresentando um número elevado de conexões mutacionais, que originam haplótipos mais raros e existem em grandes frequências. Estas características são partilhadas pelo haplótipo H1, o que sugere que este haverá estado presente na população ancestral e subsequentemente distribuiu-se à medida que novas áreas iam sendo colonizadas. A presença de haplótipos comuns nas diferentes populações, juntamente com a ocorrência de haplótipos mais raros poderá sugerir, tal como descrito por Escorza-Trevino & Dizon (2000), uma radiação evolutiva conjugada com elevados níveis de fluxo genético que homogeneizaram as populações.

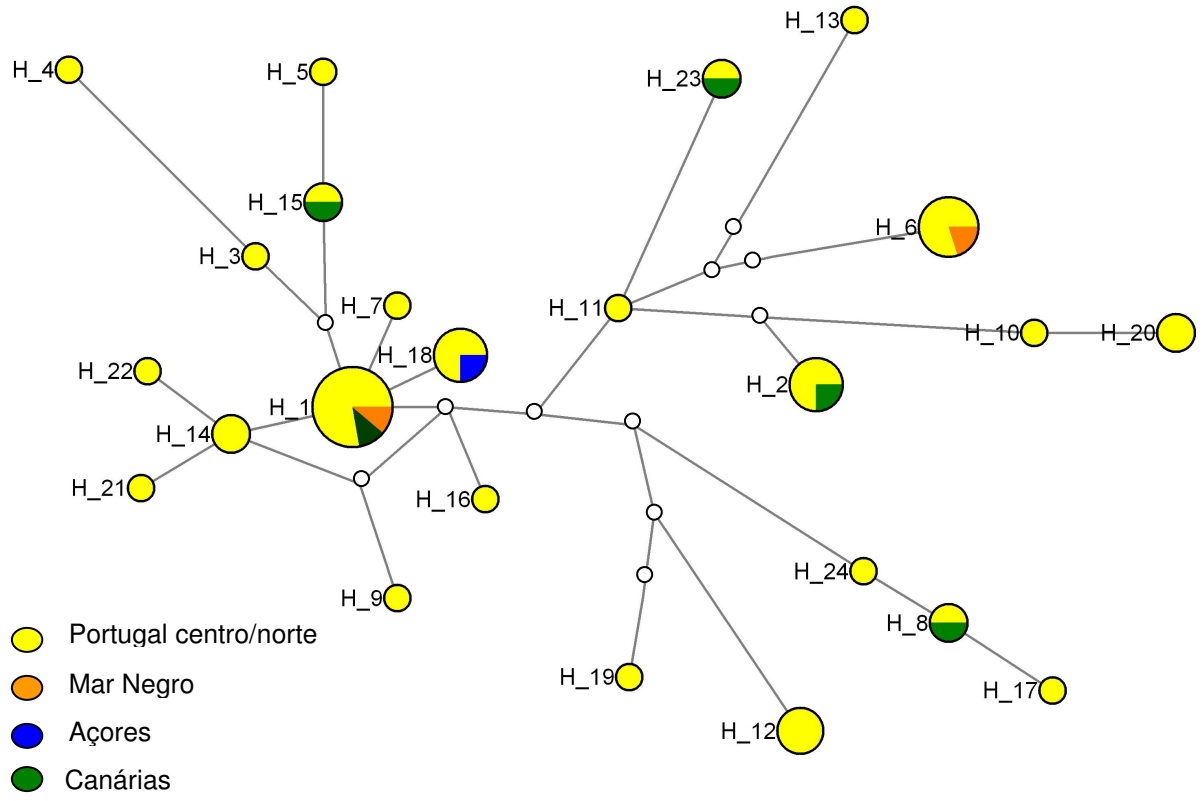

Figura 6 - Rede *Median Joining* da partilha de haplótipos da região controlo mitocondrial de *Delphinus delphis* entre diferentes populações. O tamanho do círculo é proporcional ao número de indivíduos que apresentam o respectivo haplótipo. Os círculos brancos representam haplótipos extintos ou não amostrados. Os haplótipos não pertencentes à população de Portugal centro/norte com frequência igual a 1 não foram considerados.

Foram estimadas as medidas de diversidade genética, para cada uma das populações descritas. Apesar de serem apresentadas todas as estimativas de diversidade (Tabela IV), é sugerida a utilização da diversidade nucleotídica (π) como estimativa da variação entre populações, uma vez que alguns estudos referem que quando a diversidade genética é estimada entre populações, a medida de diversidade nucleotídica é mais informativa que a heterozigotia ou diversidade haplotípica, uma vez que esta fornece informação sobre as diferenças entre sequências de ADN entre os genes (ou haplótipos), a nível nucleotídico, enquanto que a heterozigotia apenas indica se dois genes (ou haplótipos) são ou não os mesmos (Nei & Li, 1979; Tajima, 1983).

Relativamente às medidas de diversidade genética calculadas para estas populações (Tabela IV), é possível verificar que as populações dos Açores e Pacífico apresentam maior diversidade nucleotídica, sendo a população do Mar Negro a que apresenta menor variação

nucleotídica, o que pode ser derivado da ocorrência de uma origem mais antiga das outras populações, do tamanho efectivo desta população ser relativamente pequeno ou do isolamento geográfico a que está sujeita, uma vez que as outras populações analisadas poderão ter mais contacto com outros agrupamentos da espécie, favorecendo o fluxo genético. Relativamente à diversidade haplotípica, todas as populações apresentam valores elevados desta estimativa, sendo Portugal centro/norte a que possui o valor mais baixo.

Tabela IV- Sumário das medidas de variabilidade genética das diferentes populações de *Delphinus delphis.*

	Portugal centro/norte (presente estudo)	**Açores** (Matzen Silva *et al.*, 2002)	**Canárias** (Hildebrandt *et al.*, 2006)	**Mar Negro** (Rosel *et al*, 1994)	**Pacífico** (Rosel *et al.*, 1994)
N	41	4	21	3	14
h	0.95+/- 0.01	1.00 +/- 0.18	1.00 +/- 0.02	1.00 +/- 0.27	1.00 +/- 0.03
Π (%)	1.51 +/- 0.81	1.92 +/- 1.36	1.72 +/- 0.9	1.03 +/- 0.87	1.97 +/- 1.10
k	5.89	7.50	6.71	4.00	7.70
s	30	14	25	6	34

N - número de indivíduos analisados; *h* - diversidade haplotípica (média+/-desvio padrão); π - diversidade nucleotídica (média+/-desvio padrão); *K* - número médio de diferenças nucleotídicas entre os pares de sequências; *s* - número de polimorfismos nucleotídicos.

Para analisar estatisticamente a estruturação destas populações e possíveis relações entre elas foram utilizadas medidas de análise de divergência genética como o número de diferenças nucleotídicas que ocorrem entre as populações (D_A) (Nei & Li, 1979), o índice de fixação F_{ST} (Wright, 1951) e o seu análogo Φ_{ST} (Excoffier *et al.*, 1992).

Uma vez que o ADN mitocondrial apresenta elevada taxa de substituição nucleotídica, Nei & Li (1979) descreveram a estatística D_A de modo a que fosse possível determinar o grau de divergência genética entre espécies próximas, tendo em conta esta característica do ADN mitocondrial. Na Tabela V, encontram-se descritos os valores de divergência genética da região controlo mitocondrial entre as diferentes populações de golfinho comum, tendo em conta o número médio de diferenças nucleotídicas que ocorrem entre as populações (D_A). Estudos populacionais de cetáceos consideraram diferentes valores de divergência genética nucleotídica (D_A) como limite de definição da estruturação de populações. Rosel *et al.* (1994) consideraram 1,09 % de divergência entre sequências de

populações simpátricas dos morfotipos de *Delphinus*, um valor suficientemente elevado para definir diferentes populações e sugerir até diferentes espécies. De igual modo, um estudo populacional de baleia corcunda (*Megaptera novaengliae*) descreveu níveis de divergência nucleotídica entre subpopulações que variavam entre 0,11 e 0,22% (Baker *et al*., 1990). No presente estudo, da análise desta estimativa resultaram valores de divergência nucleotídica baixos para as populações de Açores e Canárias relativamente a Portugal centro/norte. Esta análise reforça também o nível relativamente elevado (0,22%) de distância genética entre Portugal centro/norte e as amostras do Pacífico, verificando-se também a ocorrência de um valor similar entre o Mar Negro e Portugal centro/norte (0,21%). Estes resultados sugerem que, a população do Mar Negro encontra-se tão afastada geneticamente de Portugal centro/norte quanto a população do Pacífico, apesar da análise filogenética ter detectado partilha de haplótipos entre o Mar Negro e Portugal centro/norte. De igual modo, reforçou resultados já descritos por outros autores, indicando que deverá existir apenas uma população ao longo do Atlântico Nordeste (Natoli *et al*., 2006; Amaral *et al*., 2007), uma vez que as populações das Canárias e Açores apresentam valores de divergência nucleotídica baixos entre si e valores relativamente elevados quando comparadas com as populações do Mar Negro e Pacífico, com excepção de um valor curiosamente baixo entre os Açores e a população do Mar Negro.

Tabela V- Estimativas da divergência genética nucleotídica entre as diferentes populações (D_A), segundo Nei & Li (1979), para a região controlo mitocondrial.

	Portugal centro/norte	**Açores**	**Canárias**	**Mar Negro**	**Pacífico**
Açores	-0.00050	-			
Canárias	0.00024	0.00041	-		
Mar Negro	0.00210	-0.00042	0.00307	-	
Pacífico	0.00224	0.00315	0.00164	0.00406	-

A análise de variância molecular (AMOVA) resultou num nível médio de Φ_{ST} igual a 0,0597 ($p < 0,001$), para o grupo composto pelas cinco populações o que indica que existe diferenciação moderada dentro desse grupo. No entanto, de uma forma geral, a análise do nível de diferenciação entre as populações, duas a duas, resultou em estimativas de diferenciação não significativas estatisticamente ($p > 0,05$), com valores que variam entre

baixo a moderado nível de diferenciação entre a população de Portugal centro/norte e as restantes populações, tal como se encontra descrito na Tabela VI. Quando consideradas apenas as diferenças na identidade dos haplótipos (F_{ST}), nenhuma população apresenta um grau de divergência significativo em relação a Portugal centro/norte. Por sua vez, quando ponderadas as diferenças dos haplótipos tendo em conta distâncias genéticas (Φ_{ST}), a única população que apresentou diferenciação genética moderada significativa em relação à população deste estudo, bem como em relação às restantes populações, foi o Pacífico, o que comprova os valores obtidos na rede *Median Joining*, relativamente à partilha de haplótipos. Apesar de não significativos, estes resultados reforçam os valores obtidos na estimativa D_A, em que o Mar Negro apresenta também um elevado nível de diferenciação em relação a Portugal centro/norte e às Canárias, sendo mais uma vez obtido um nível baixo de diferenciação em relação aos Açores. Verifica-se também, mais uma vez, que as populações com que Portugal centro/norte apresenta maior afinidade genética são as dos Açores e das Canárias.

Tabela VI- Estimativas de divergência genética (Φ_{ST} e F_{ST}) entre as diferentes populações, para a região controlo mitocondrial.

	Portugal centro/norte	**Açores**	**Canárias**	**Mar Negro**	**Pacífico**
Portugal centro/norte	-	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Açores	0.00109	-	0.00000	0.00000	0.00000
Canárias	0.00466	0.03489	-	0.00000	0.00000
Mar Negro	0.07609	-0.05691	0.10180	-	0.00000
Pacífico	0.10748 ***	0.12754**	0.07975**	0.11654*	-

Φ_{ST} - índice de fixação de Excoffier *et al.*, (1992), abaixo da diagonal; F_{ST} - índice de fixação de Wright (1951), acima da diagonal; (*) – p<0,05 (**) – p<0,01; (***) – p<0,001

De notar que o facto de os valores de Φ_{ST} não serem significativos pode indiciar recente divergência entre os haplótipos destas populações, uma vez que como esta medida é baseada na frequência e distância genética entre os haplótipos, é necessário que tenha decorrido tempo evolutivo suficiente para que as diferenças genéticas se tenham desenvolvido e possam ser detectadas por Φ_{ST}. Por sua vez, a estatística $F_{ST,}$ sendo baseada apenas nas frequências haplotípicas, já consegue detectar estruturação entre populações se

as frequências haplotípicas diferirem entre si, mesmo que as distâncias inter-haplotípicas sejam pequenas, sendo representativo de uma divergência recente (Escorza-Trevino *et al.*, 2002). Estes factos levam a que, muitas vezes, os valores de Φ_{ST} sejam superiores aos de F_{ST}, correspondendo ao resultado esperado quando haplótipos relacionados estão associados geograficamente e o processo de mutação foi mais importante que outros factores para a diferenciação genética entre populações (Natoli *et al.*, 2006).

Resumidamente, esta análise de divergência genética global, tendo em conta as populações de Portugal centro/norte, Açores, Canárias, Mar Negro e Pacífico apesar de apresentar valores estatísticos não significativos ($p > 0,05$) para a maioria das populações, (excepto o Pacífico), evidenciou um nível de diferenciação muito baixo entre Portugal centro/norte e Açores, bem como entre Portugal centro/norte e Canárias. Por outro lado, verificam-se níveis relativamente elevados de diferenciação genética entre Portugal centro/norte e as populações do Mar Negro e Pacífico. Apesar da análise filogenética aparentemente sugerir que é a população das Canárias que possui maior afinidade com Portugal centro/norte, devido ao maior número de haplótipos partilhados entre si, verifica-se que os Açores apresentam também grande proximidade com a população deste estudo, sendo estas duas populações as mais próximas geneticamente de Portugal centro/norte. Os resultados obtidos evidenciam também a ocorrência de uma divergência recente entre estes haplótipos, exibida tanto pelos valores de Φ_{ST} e F_{ST}, como pela representação da rede *Median Joining* (formato estrela).

Segundo Waples & Gaggiotti (2006), em termos evolutivos, um dos critérios para que as populações se possam considerar isoladas em termos de gestão e conservação consiste em valores como $N_fm < 25$ ou F_{ST} (Φ_{ST})$> 0,01$. Como confirmação do elevado nível de fluxo genético entre as diferentes populações, já inferido a partir dos valores de D_A, F_{ST} e Φ_{ST}, verifica-se que a migração de indivíduos entre populações apresenta maiores valores entre Portugal centro/norte e Açores, seguido das Canárias, sendo o Pacífico a população que menos partilha indivíduos com todas as populações (Tabela VII).

Tabela VII- Valores da estimativa da taxa de migração Nfm, calculada segundo Slatkin (1991), entre as diferentes populações.

	Portugal centro/norte	Açores	Canárias	Mar Negro	Pacífico
Portugal centro/norte	-				
Açores	458.82	-			
Canárias	106.88	13.83	-		
Mar Negro	6.07	Inf	4.41	-	
Pacífico	4.15	3.42	5.77	3.79	-

Segundo o paradigma evolutivo descrito por Waples & Gaggioti (2006), Portugal centro/norte só poderia ser considerado uma população diferente quando comparada com o Pacífico e o Mar Negro, uma vez que apresenta valores de diferenciação relativamente elevados e um baixo número de migrantes absolutos entre populações. Este resultado poderá ser consequência de um possível isolamento por barreira geográfica ou distância entre as populações**.** Uma análise de variância molecular realizada com os grupos Portugal centro/norte, Açores e Canárias (Atlântico) *versus* Mar Negro resultou num valor de Φ_{ST} de 6,37% entre grupos (p> 0,05) o que, apesar de não significativo estatisticamente representa um valor relativamente elevado. Alguns estudos referem que tanto o estreito de Gibraltar, como os estreitos do Bósforo e Dardanelos, que separam o Mar Mediterrânico do Mar Negro e as diferentes características associadas à topografia, salinidade e temperatura da água apresentadas por estes dois habitats, poderão representar barreiras ao fluxo genético para algumas espécies de cetáceos, como baleia comum (*Balaenoptera physalus*) (Bérubé *et al.*, 1998), golfinho riscado (*Stenella coeruleoalba*) (García-Martínez *et al.*, 1999) e roaz corvineiro (*Tursiops truncatus*) (Natoli *et al.*, 2005). Além disso, Tomilin (1957) propôs a separação da população de golfinho comum do Mar Negro numa nova subespécie (*Delphinus delphis ponticus*), sendo que foi já demonstrado que a população do Mar Negro é geneticamente (Natoli *et al.*, 2003) e morfologicamente (Amaha 1994) distinta de populações vizinhas.

De igual modo, uma análise de variância molecular realizada com os grupos Portugal centro/norte, Açores e Canárias (Atlântico) *versus* Pacífico resultou num valor de Φ_{ST} de 9,95% entre grupos (p> 0,05), o que apesar de não significativo estatisticamente representa um valor relativamente elevado. Estudos realizados em *Delphinus delphis* nos dois lados do

continente americano, ou seja, no Pacifico Este e no Atlântico Oeste e entre o Atlântico Noroeste e Nordeste sugeriram diferenças nesta espécie em termos reprodutivos (Danil & Chivers, 2007; Westgate & Read, 2007), genéticos (Westgate, 2005; Natoli *et al*., 2006) e morfológicos (Heyning & Perrin, 1994; Murphy *et al*., 2006; Westgate, 2007), tendo em conta as diferentes localizações geográficas. A acrescer a estes estudos, verifica-se que a distribuição desta espécie sugere que o continente americano constitui uma barreira geográfica ao fluxo genético entre as populações de *Delphinus delphis* do lado oeste e leste do continente (ver Figura 1 no Capítulo 1).

Os resultados obtidos relativamente às relações genéticas e ao fluxo migratório entre as populações do Atlântico analisadas (Portugal centro/norte, Açores e Canárias) foram coerentes com outros estudos de *Delphinus delphis* (Natoli *et al*., 2006; Amaral *et al*., 2007). Praticamente não existem estudos relativos à ocorrência de migrações em golfinho comum, tendo sido apenas publicados dados acerca de movimentos sazonais costeiros e oceânicos, e referentes à variação de abundâncias geográficas (Goold, 1998; Neumann, 2001). Um estudo realizado por Evans (1971), utilizando radiotelemetria, verificou que um grupo desta espécie pode viajar até 120 quilómetros num só dia. De igual modo, um estudo realizado com roaz corvineiro no Atlântico Noroeste, revelou que esta espécie consegue viajar mais de 4200 km num eixo de 2500 km em 47 dias (Wells, 1999), tendo igualmente Klatsky *et al*. (2007) revelado que esta espécie consegue percorrer até 28,3 quilómetros por dia. Estes trabalhos, juntamente com os resultados obtidos no presente estudo, salientam a grande capacidade de dispersão dos cetáceos, em particular do *Delphinus delphis*, já que foram analisados indivíduos que estão separados entre si mais de 1500 km, conseguindo manter níveis de fluxo genético suficientemente elevados para garantir a ocorrência de apenas um *stock* de golfinho comum nesta área do Oceano Atlântico, que deverá ser considerada apenas uma área de conservação e gestão (Coyle, 1998; Waples, 1998). É importante referir que, antes da exclusão da população do Mar Negro do *stock* do Oceano Atlântico que funcionará de base a medidas de gestão e conservação desta espécie, seria necessário estudar de novo a relação entre estas populações com outros marcadores mitocondriais ou marcadores nucleares, de modo a obter conclusões mais consistentes, uma vez que o índice de diferenciação genética apresentou valores não significativos, mesmo na comparação do Mar Negro com cada uma das populações Atlânticas, individualmente. De notar que, os níveis de fluxo genético podem também ser alcançados indirectamente através da mistura de grupos sociais, um processo que pode ser facilitado pela sociedade de fissão-fusão

apresentada por esta espécie, já que animais terrestres que possuem este tipo de sistema social também têm elevados níveis de fluxo genético (Gagneux *et al*., 2001). Poderá ser esta grande capacidade de dispersão ou a fluidez da estrutura social apresentada por esta espécie que estará a conduzir até à aparente expansão da população de Portugal centro/norte analisada, revelada pelos valores dos testes de neutralidade, juntamente com a estrutura da rede *Median Joining*. Torna-se importante referir, no entanto que existe ainda grande controvérsia na estimativa dos níveis de fluxos genéticos entre populações, uma vez que muitas vezes, os dados biológicos não obedecem aos pressupostos dos modelos em que se baseiam essas estimativas, o que poderá conduzir variações nos valores de F_{ST} e, consequentemente, sub- ou sobrestimativas do número de migrantes (Whitlock & McCauley, 1999; Bohonak & Roderick, 2001). Ao mesmo tempo, é importante considerar que a ocorrência de grande número de migrantes entre as populações não implica obrigatoriamente um elevado nível de fluxo genético, uma vez que para que a dispersão de indivíduos esteja directamente relacionada com o fluxo genético entre populações é necessário que os migrantes acasalem e que, pelo menos, alguma da sua descendência alcance a idade adulta (Whitlock & McCauley, 1999). Além disso, o valor de N_fm obtido não é o número actual de migrantes, mas sim um valor virtual que reflecte o número histórico de migrantes necessário para explicar o grau de diferenciação (F_{ST}) observado entre populações (Vrijenhoek, 1997; Whitlock & McCauley, 1999). Devido a todos estes factores, os resultados obtidos relativamente ao número de migradores deverão ser encarados de forma conservativa, no entanto, apesar de todas as limitações apresentadas podem fornecer informações importantes relacionadas com as relações entre populações.

Foi realizada uma análise muito preliminar tendo em conta a sazonalidade das correntes na costa portuguesa, de modo a determinar se esta componente do *habitat* poderá influenciar a caracterização genética dos indivíduos, ou seja, se as correntes poderão influenciar o movimento dos indivíduos ou das carcaças destes, desde uma população até outra, especificamente até à área de estudo. Ferreira (2007) observou a existência de um pico de mortalidade por captura acidental de golfinho comum na Primavera e refere como possíveis explicações para esta situação a variação das condições oceanográficas e climáticas, mudança na distribuição e abundância da espécie ou uma combinação de ambos os factores, referindo que Silva & Sequeira (2003) sugerem que as condições

oceanográficas podem ser a principal razão para a sazonalidade dos arrojamentos. Conjugando os dados genéticos obtidos com as características das correntes na costa portuguesa, verificou-se, através da análise de variância molecular que, consoante a época do ano, os valores variaram entre baixos e moderados, não significativos estatisticamente ($p > 0,05$) (Tabela VIII). Verifica-se que, de uma forma geral, os indivíduos que arrojaram no Outono – Inverno na área de estudo, possuem maior nível de diferenciação relativamente às populações analisadas, nomeadamente Açores, Canárias, Mar Negro, que os que arrojaram na Primavera-Verão. Estes resultados sugerem que tendo em conta a localização geográfica destas populações em relação à costa portuguesa, a única corrente que poderia ser responsável pelos valores de diferenciação obtidos seria a subcorrente mediterrânica que flui ao longo de todo o ano em direcção a norte. No entanto, estes resultados aparentemente sugerem que as afinidades genéticas entre as populações são devidas ao fluxo genético existente entre elas e não à possibilidade de na população de Portugal centro/norte amostrada existirem indivíduos que pertencem originalmente aos Açores ou Canárias e que arrojaram na área de estudo devido à movimentação das carcaças após a morte, pelas correntes. Esta sugestão advém do facto do sistema de correntes existente ao largo dos Açores apresentar um ramo com ligeira orientação para nordeste, podendo encontrar-se com a subcorrente mediterrânica, no entanto as correntes existentes nas Canárias apresentarem orientação para sul (Mason *et al.,* 2005). No entanto, só uma análise com marcadores nucleares e um estudo mais aprofundado das condições oceanográficas (principalmente da subcorrente mediterrânica), climáticas e topográficas, bem como a conciliação destes resultados com a análise genética de populações a norte, para tentar detectar possíveis diferenças que pudessem dever-se às correntes marinhas, poderia permitir a obtenção de conclusões mais robustas. Outra explicação para os resultados obtidos poderá consistir possivelmente no facto de ocorrer mais migração de indivíduos nos meses de Primavera – Verão, tornando as populações das diferentes regiões mais homogéneas. Apesar de em Portugal não existir ainda dados referentes à abundância de cetáceos, o pico de mortalidade de *Delphinus delphis* na Primavera, observado por Ferreira (2007), vai de encontro aos resultados obtidos, uma vez que sugere maior densidade de golfinho comum nesta área geográfica na altura da Primavera – Verão.

Tabela VIII- Estimativas de divergência genética entre as diferentes populações (Φ_{ST} e F_{ST}), para a região controlo mitocondrial, em diferentes épocas do ano (Primavera-Verão *vs*. Outono-Inverno).

	Primavera-Verão		**Outono-Inverno**	
	Φ_{ST}	F_{ST}	Φ_{ST}	F_{ST}
Açores	-0.01557	0.00000	0.02202	0.00000
Canárias	0.00710	0.00000	0.02194	0.00000
Mar Negro	0.05818	0.00000	0.11714	0.00000

Φ_{ST} - índice de fixação de Excoffier *et al*., (1992), abaixo da diagonal;F_{ST} - índice de fixação de Wright (1951), acima da diagonal; (**) – p<0,01; (***) – p<0,001.

Todos os resultados obtidos reforçam o facto de que a população de Portugal centro/norte, como referido anteriormente, apresenta forte relação genética com as populações dos Açores e Canárias, sugerindo a inexistência de estruturação a nível das populações do Atlântico Nordeste analisadas. Apesar da grande capacidade de dispersão e da existência de um grande nível de fluxo genético entre os indivíduos desta população já discutidos acima, a aparente existência de apenas uma população neste lado do Oceano implicará a necessidade de estratégias de conservação tendo em conta os elevados níveis de capturas acidentais existentes no Oceano Atlântico, referidos por diversos estudos (Tregenza *et al*., 1997; Morizur *et al*., 1999; López *et al*., 2002, 2003, 2004; Zollett & Rosenberg, 2005; Ferreira, 2007; Wise *et al*., 2007). Tendo por base estudos realizados sobre o tema verifica-se, por exemplo, que no Mar Mediterrâneo a pesca ilegal de peixe espada capturou 366 e 289 golfinhos comuns e riscados nas redes, em 1993 e 1994, respectivamente (Silvani *et al*., 1999), sendo de referir que devem ser adicionados a estes valores as capturas acidentais de golfinhos por frotas marroquinas nesta área, no espaço de um ano (um total de 237 indivíduos de *Delphinus delphis e Stenella coeruleoalba*) (Tudela *et al*., 2005). De igual modo, Tregenza *et al*. (1997) descreveram capturas acidentais de cerca de 230 *Delphinus delphis* em redes de emalhar, no Mar Céltico entre 1992 e 1994, tendo o mesmo autor apresentado como resultado de capturas acidentais realizadas por arrastões na Baía da Biscaia e Mar Céltico cerca de 1100 indivíduos, correspondente a 1 % da população de verão desta espécie nessa área (Tregenza & Collet, 1998). Um outro estudo realizado para avaliar o impacto das capturas acidentais de golfinho comum pela frota francesa, com redes de emalhar de deriva na Baía da Biscaia, registou a captura de cerca de 800 golfinhos comuns e riscados, em 1992 e 1993 (Goujon *et al*., 1993). Relativamente à

costa Atlântica da Península Ibérica, um estudo realizado na Galiza revelou níveis de capturas acidentais estimadas na ordem de 663 golfinhos comuns capturados em redes de emalhar localizadas longe da costa, cerca de 74 animais capturados por ano em arrastões na costa irlandesa e capturas acidentais de cerca de 101 animais por ano em redes de emalhar localizadas perto da costa (López *et al.*, 2003). Relativamente a Portugal, tal como já foi referido, não existem dados que revelem o impacto das capturas acidentais de cetáceos em artes de pesca, no entanto, um estudo realizado sobre animais arrojados na mesma área do presente estudo, revelou que cerca de 457 golfinhos comuns poderão ter morrido no espaço de seis anos, devido a interacção com artes de pesca, considerando que, segundo López *et al.* (2003), os animais arrojados representam apenas 14% dos indivíduos mortos devido a interacção com pescas (Ferreira, 2007). Um outro estudo realizado para avaliar o impacto da pesca do atum em *Delphinus delphis* observou a captura acidental de 109 indivíduos desta espécie entre 1998 e 2000 nos Açores (Silva *et al.*, 2002).

Uma das questões relacionadas com a gestão de espécies selvagens consiste na dúvida "se uma população (ou *stock*) for reduzida devido a excesso de capturas poderá recuperar a partir de recrutamento ocorrido noutros locais?", levantada por Waples (1998). Esta questão eleva a importância do fluxo genético na conservação, especialmente em animais marinhos capturados pelo Homem, uma vez que as populações podem não ser muito próximas geograficamente, mas o fluxo genético pode ser suficientemente elevado para garantir a homogeneização genética. Existem ainda poucos dados relativos à mortalidade de cetáceos em Portugal devido a capturas acidentais, pelo que se torna necessário ter em conta os resultados acima descritos de estudos que pretenderam avaliar o impacto das pescas em *Delphinus delphis* em diversas regiões europeias. Assim, a conjugação desses dados com os resultados obtidos relativamente ao número de migrantes absolutos que ocorrem entre as diferentes populações do Atlântico analisadas (Portugal centro/norte, Açores e Canárias) (Tabela VII), que por sua vez podem reflectir o fluxo genético entre populações, sugere que a situação poderá vir a ser insustentável para a população do Atlântico, num futuro próximo. É fundamental que se realizem estudos de densidade desta espécie e que se avalie a taxa de mortalidade de golfinho comum por capturas (intencionais ou acidentais), poluição e causas naturais, já que, apesar do fluxo genético ser elevado poderá não conseguir compensar o impacto negativo que o Homem está a exercer sobre esta espécie, afectando assim a sua sustentabilidade e capacidade de resiliência, tal como já descrito para outras espécies (Pichler & Baker, 2000).

3.4. Análise da linhagem materna e relação com capturas acidentais em pesca

Utilizando a informação existente *à priori* sobre as amostras, mais especificamente a localização espacial e temporal do arrojamento, o sexo do animal, o estado do corpo do animal e os indícios de captura acidental em artes de pesca (Anexo I), houve uma avaliação preliminar das capturas acidentais de grupos familiares de golfinho comum em artes de pesca.

Na população de Portugal centro/norte, existem diversas situações de haplótipos com frequência superior a 1, logo compostos por vários indivíduos que possuem uma sequência idêntica entre si, sugerindo uma linhagem materna comum (Anexo II e III). No entanto, após análise pormenorizada dos haplótipos obtidos e conjugação destes resultados com as informações relativas às amostras, foi possível verificar que há dois casos que partilham a linhagem materna e permitem levantar a possibilidade de pertencerem ao mesmo grupo familiar, apresentando laços mais fortes.

Alguns estudos, através da análise de animais arrojados, utilizando metodologias padronizadas e optimizadas ao longo do tempo por diversas redes de arrojamento, pretendem estabelecer relações entre arrojamentos de cetáceos e indícios de capturas acidentais em artes de pesca (Kuiken *et al*., 1994; Tregenza & Collet, 1998; Ferreira, 2007). Todas as amostras utilizadas neste estudo foram já avaliadas em termos de possíveis indícios de captura acidental, no trabalho de Ferreira (2007).

Numa tentativa de obter os resultados mais conservativos possíveis, foram analisados animais detectados no mesmo mês ou em dois meses seguidos, uma vez que sendo as vistorias mensais, a detecção dos indivíduos poderia ocorrer até um mês depois do arrojamento. De igual modo, foi tido em conta o estado de decomposição do corpo, uma vez que um estado menos avançado de decomposição pode indiciar uma morte mais recente. Assim, na Tabela IX, encontram-se descritos os haplótipos A e V em relação às características relacionadas com o ano, mês e localização do arrojamento, sexo do animal, estado de decomposição do corpo, indício de captura acidental e arte de pesca envolvida (ver Anexos para outras informações). Verifica-se que estes haplótipos possuem animais do mesmo ano, recolhidos na mesma altura e num local próximo (a negrito), sendo colocada a hipótese de terem arrojado devido às mesmas causas, uma vez que todos apresentavam sinais de captura acidental, com excepção do indivíduo Dde31 que apresentava sinais de

captura provável. Pela conjugação de todos os factores genéticos e ambientais, pode colocar-se a hipótese destes animais apresentarem uma maior afinidade entre si, baseada não apenas na partilha de uma linhagem materna (que poderá ou não ser recente), mas em laços de parentesco mais fortes, se se tiver em conta que esta espécie apresenta grupos sociais de indivíduos relacionados entre si, como descrito por Evans (1994).

Essa situação é mais evidente nos dois indivíduos do haplótipo V. Estes animais foram acidentalmente capturados em arte de Xávega, no mesmo dia, juntamente com os indivíduos Dde02, Dde04 e Dde05, que ficaram agrupados noutros haplótipos (A, U e S, respectivamente) (Tabela IX). No entanto, Dde01 e Dde03 ficaram agrupados no mesmo haplótipo, o que pode sugerir forte relação de parentesco entre eles. Valsecchi & Zanelatto (2003) descreveram uma situação similar com quatro indivíduos de golfinho franciscana capturados simultaneamente em redes de pesca, que partilhavam o mesmo haplótipo. Uma análise posterior com microsatélites sugeriu que este grupo era constituído por uma mãe e duas crias, sendo o 4º elemento do grupo, um macho que possivelmente seria o pai de uma das crias.

Tabela IX – Características das amostras pertencentes aos haplótipos A, V, U e S.

Haplótipo	Amostra	Sexo	Ano	Mês	Local	Indícios captura	Arte de pesca envolvida
A	Dde02	Macho	2004	Agosto	Poço da Cruz	Sim	Xávega
	Dde26	Macho	2005	Abril	Costinha	Sim	Indeterminado
	Dde31	**Fêmea**	**2006**	**Janeiro**	**Vagueira**	**Provável**	Indeterminado
	Dde32	**Macho**	**2006**	**Janeiro**	**Gala**	**Sim**	**Redes de Emalhar**
	Dde40	Macho	2006	Março	Vagueira	Sim	Indeterminado
	Dde45	Indeterminado	2006	Maio	Tocha	Sim	Indeterminado
V	**Dde01**	**Macho**	**2004**	**Agosto**	**Poço da Cruz**	**Sim**	**Xávega**
	Dde03	**Fêmea**	**2004**	**Agosto**	**Poço da Cruz**	**Sim**	**Xávega**
U	Dde04	Fêmea	2004	Agosto	Poço da Cruz	Sim	Xávega
S	Dde05	Macho	2004	Agosto	Poço da Cruz	Sim	Xávega

A negrito encontram-se assinaladas as amostras que são consideradas nas hipóteses descritas no texto.

No entanto, ao realizar a comparação entre os haplótipos descritos na Tabela IX e sequências de populações de *Delphinus delphis* existentes em bases de dados (NCBI, 2007), nomeadamente dos Açores, Mar Negro, Canárias e Pacífico verificou-se que o haplótipo A é também partilhado por indivíduos das populações das Canárias e Mar Negro, o que diminui a probabilidade de que as hipóteses acima referidas sejam verdadeiras para as amostras pertencentes à população A, uma vez que se verifica que este haplótipo é mais frequente também noutras populações (ver figura 6 deste Capítulo). O mesmo não se verificou para os indivíduos do haplótipo V, aumentando a probabilidade que estes animais sejam realmente aparentados, uma vez que é um haplótipo mais raro nas populações analisadas.

Um estudo realizado por Reyes (1991), sugere que grande parte do esforço de pesca está concentrado nos locais onde esta espécie é mais abundante, sendo descrito que grande parte das capturas de "escolas" de golfinho comum ocorrem em águas costeiras, onde a estrutura dos *stocks* e os movimentos são pouco conhecidos. Silva (1996) num estudo de

biologia de reprodução de *Delphinus delphis* realizado com indivíduos arrojados entre 1991 e 1996 na costa Portuguesa, descreveu que para esta espécie, fêmeas e machos com comprimento total inferior a 190 cm e 200 cm, respectivamente, são considerados sexualmente imaturos. Estes valores sugerem que os indivíduos Dde01 e Dde03 são um macho imaturo e uma fêmea adulta, respectivamente, o que reforça a hipótese de formação de "escolas" compostas por fêmeas e crias, como uma das características da organização social desta espécie. Silva & Sequeira (1994) já tinham relatado uma situação similar à analisada neste estudo, através da análise de arrojamentos na costa Portuguesa entre 1975-1998.

Neste estudo foram analisadas 15 fêmeas, das quais 12 apresentaram indícios de captura acidental. Utilizando os resultados relativamente ao comprimento total de indivíduos sexualmente maturos, descritos por Silva (1996), verifica-se que, no presente estudo, um conjunto de 8 fêmeas sexualmente maturas apresentavam indícios de captura acidental. López (2003) determinou que, para as costas galegas, a proporção média anual de animais que chegam à rede de arrojamentos local (detectados ou entregues por pescadores) é de 14% da totalidade de animais capturados acidentalmente em pescas. Considerando que esta proporção de animais detectados é equivalente na área de estudo do presente trabalho, a mortalidade de fêmeas sexualmente maturas mortas devido a interacções com artes de pesca poderá ser de 57 fêmeas nos três anos analisados. Uma vez que raramente foram descritas situações de gravidez múltipla (López, 2003) e que o intervalo reprodutor apresentado na bibliografia para golfinho comum é de, aproximadamente, três anos (3,3 anos na Galiza: López, 2003; 2,6 anos no Pacífico: Danil & Chivers, 2007), a produtividade resultante das fêmeas capturadas acidentalmente, poderia equivaler ao nascimento de cerca de 19 crias anualmente. Apesar de não existirem dados relativamente a densidades desta espécie em Portugal com os quais se possa fazer uma comparação, o valor obtido é considerável, tendo em conta a pequena amostra e área de estudo. López (2003) alertou para o facto da situação desta espécie na Galiza parecer pouco sustentável, tendo em conta que a proporção de renovação populacional foi estimada em 8,4% e a proporção de animais afectados pelas capturas oscilavam entre 2,6% e 9,4%. Vários estudos descreveram taxas de reprodução anuais para esta espécie em diversos locais (27,2% na Galiza: López, 2003; 28,2% no Atlântico Nordeste: Murphy, 2004; 47% no Pacífico: Danil & Chivers, 2007; 25%-33% no Atlântico Noroeste: Westgate 2007). No entanto, em Portugal não existe ainda um estudo sobre as taxas reprodutivas de golfinho comum, o que juntamente com a falta de

conhecimentos sobre a densidade desta espécie em Portugal, impossibilita a determinação do impacto da interacção desta espécie com as pescas na sustentabilidade da população. No entanto, e segundo Ferreira (2007), existe um maior número de arrojamentos de indivíduos imaturos o que juntamente com os resultados obtidos em estudos acima referidos, torna evidente que a captura acidental de progenitoras-crias pode significar uma ameaça às populações de cetáceos, uma vez que afectam a produtividade e capacidade de resiliência das espécies podendo contribuir fortemente para a sua insustentabilidade.

Estes resultados reforçam as afirmações referidas em vários estudos de que para ser possível explorar todo o potencial informativo do ADN mitocondrial torna-se essencial um estudo adequado das populações referência, uma vez que o conhecimento das frequências a que cada haplótipo ocorre em determinada população facilitaria imenso a interpretação dos resultados da análise de ADN mitocondrial (Baasner *et al.*, 1998; Coble *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; Edson *et al.*, 2004). Para além disso, existe também a possibilidade de indivíduos não aparentados maternalmente exibirem o mesmo tipo de sequência devido a mutações homoplásmicas, resultando mais uma vez em interpretações incorrectas.

Pelas razões apresentadas é importante reforçar que as hipóteses levantadas relativamente às possíveis relações de parentesco entre as amostras analisadas são muito preliminares e severamente conservativas, uma vez que o ADN mitocondrial não pode ser o único método utilizado para identificação de indivíduos e definição das relações de parentesco, podendo, no entanto ter um papel fundamental como método complementar e apoiar decisões de exclusão ou inclusão.

Capítulo 4 Discussão Geral e Considerações Finais

4.1. Discussão geral

Tal como referido por Reeves *et al*. (2003), um elemento essencial para a conservação dos cetáceos é o conhecimento da ocorrência de estruturação populacional intraespecífica, o que significa, por outras palavras que os esforços de conservação têm que ser orientados não só para a manutenção da viabilidade de uma espécie, mas também para a conservação da diversidade comportamental, ecológica e genética dentro de uma espécie (Dizon & Perrin, 1997**;** Coyle, 1998). A distribuição geográfica das espécies é muitas vezes superior à capacidade de dispersão dos indivíduos e a maior parte das populações naturais encontra-se estruturada em populações locais que funcionam como unidades isoladas com pouca ou nenhuma troca genética entre si (*stock* genético), ou como unidades que apesar de não apresentarem diferenciação genética entre si, adaptaram-se separadamente aos respectivos habitats (*stock* fenotípico ou ambiental) (Coyle, 1998). A definição de *stocks*, em muitos casos, tem como objectivo e serve de base à criação de unidades de gestão e conservação (Rozel *et al*., 1999; Escorza-Trevino & Dizon, 2000; Chivers *et al*., 2003; Segura *et al.,* 2006; Mendez *et al*., 2007). No entanto, existe ainda alguma controvérsia na definição destes *stocks*. Alguns estudos fazem menção à necessidade da análise de características genéticas, ecológicas, morfológicas e fenotípicas na determinação de um *stock* (Coyle, 1998; Waples, 1998). No entanto, existem também referências de que estes não devem ser baseados apenas em informações genéticas, nem em análises científicas padronizadas, mas devem ter também em conta objectivos de gestão específicos e os riscos antropogénicos enfrentados pelas populações selvagens (Rosel *et al*, 1999; Taylor & Dizon, 1999).

No presente estudo, a análise genética da população de golfinho comum de Portugal centro/norte sugere a inexistência de estruturação populacional nesta espécie, a nível local, uma vez que não ocorreu diferenciação genética entre indivíduos na área de estudo. De igual modo, após análise global, verifica-se que existe grande similaridade genética entre as populações Atlânticas analisadas (Portugal centro/norte, Açores e Canárias). A acrescer a este facto, os resultados deste estudo demonstraram também a ocorrência de diferenciação genética entre indivíduos do Atlântico e indivíduos que habitam outros Oceanos (Pacífico), sendo também a população do Mar Negro distante geneticamente das populações Atlânticas, apesar dos valores não significativos. Todos estes resultados são concordantes com outros estudos populacionais de *Delphinus delphis* (Natoli *et al*., 2003, 2006; Amaral *et*

al., 2007). Os resultados deste estudo reflectem um elevado nível de fluxo genético entre os indivíduos das diferentes regiões Atlânticas, revelado pelos valores de F_{ST} e Φ_{ST}, a partilha de haplótipos e o número absoluto de migrantes. Este fenómeno pode ser resultante da elevada capacidade de dispersão destes animais, bem como da existência de uma estrutura social fluida entre populações, tal como já havia sido referido por Natoli *et al.* (2006)

Segundo Waples (1998), após análise estatística, se não são encontradas diferenças genéticas significativas entre populações, então essas populações deverão representar uma unidade de gestão (*stock*), o que reforça a possibilidade de que Portugal centro/norte, na realidade, se enquadre num único *stock* a nível do Oceano Atlântico, constituído também pelas populações dos Açores e Canárias. De referir que, o resultado não significativo na separação genética da população do Mar Negro relativamente a estas populações poderia significar a sua incorporação nesta unidade de gestão. No entanto, tal como referido anteriormente, esta população foi já descrita por outros estudos como distinta das populações Atlânticas (Tomilin, 1957; Amaha, 1994; Natoli *et al.*, 2003), o que implica que antes da tomada de alguma decisão de gestão ou conservação referente ao *stock* Atlântico analisado neste estudo, seria necessária a análise destas populações com outros marcadores mitocondriais ou com marcadores nucleares de forma a obter resultados mais consistentes. Além disso, tal como referido por Waples (1998), amostras de pequeno tamanho podem conduzir a que as diferenças populacionais não sejam significativas estatisticamente.

A definição de unidades de gestão em espécies de peixes e mamíferos marinhos é diferente da realizada em animais terrestres, uma vez que, tal como já referido, a gestão de espécies marinhas exploradas pelo Homem tem que ser capaz de prever e incorporar os efeitos da pesca/captura acidental na sustentabilidade de determinado *stock* (Rosel *et al.*, 1999). Os resultados deste estudo sugerem que, por comparação com os níveis de capturas acidentais nos últimos anos, ao longo da costa atlântica da Europa, descritos por diversos estudos (Tregenza *et al.*, 1997; Morizur *et al.*, 1999; Silvani *et al.*, 1999; López *et al.*, 2002, 2003, 2004; Silva *et al.*, 2002; Tudela *et al.*, 2005; Zollett & Rosenberg, 2005; Ferreira, 2007; Wise *et al.*, 2007), poderá estar em causa a sustentabilidade desta espécie, a longo prazo, se não forem tomadas medidas de mitigação de capturas em artes de pesca. Apesar do elevado nível de fluxo genético que ocorre entre as regiões Atlânticas analisadas, este poderá não ser suficiente para compensar as perdas de golfinho comum causadas

actualmente por esta actividade económica. No entanto, só após a realização de estudos de densidade e reprodução desta espécie em conjunto com a análise das taxas de mortalidade consequentes de capturas acidentais, poluição e causas naturais poderão ser obtidas conclusões mais robustas relacionadas com este tema.

Existem diversos estudos que referem o impacto demográfico e genético que as capturas acidentais em artes de pesca podem causar nas populações mundiais de cetáceos (Morizur *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2000; Zollett & Rosenberg, 2005; Ferreira, 2007; Mendez *et al.*, 2007). Ferreira (2007) através de um estudo realizado sobre a ocorrência e captura acidental de cetáceos no centro/norte de Portugal, verificou que um elevado número de cetáceos é capturado acidentalmente em artes de pesca, sendo o golfinho comum a espécie que apresenta maiores níveis de capturas principalmente por redes de emalhar e arrastão, sendo verificados também alguns casos de captura em Xávega, uma arte de pesca artesanal não selectiva, típica da área de estudo. A utilização de amostras provenientes de arrojamentos apresenta uma desvantagem, que consiste no total desconhecimento de informações relativamente aos grupos familiares destes indivíduos. Com o objectivo de obter conhecimentos relativos a este ponto e, ao mesmo tempo, determinar o impacto da pesca em grupos familiares de golfinho comum, foram analisadas as possíveis relações de parentesco entre estes animais. De igual modo, as capturas acidentais por artes de pesca foram relacionadas com a morte de indivíduos pertencentes ao mesmo grupo familiar, verificando-se que a utilização de animais arrojados tornou-se muito útil para determinar o impacto causado pelas capturas acidentais em artes de pesca nas populações selvagens de cetáceos na zona centro/norte de Portugal. Contudo, e tal como descrito por Ferreira (2007), numa grande percentagem dos animais arrojados não é possível identificar a causa de morte devido ao seu estado avançado de decomposição, além de muitos dos indícios de capturas acidentais não serem específicos para uma determinada arte de pesca, tornando-se impossível determinar qual a arte que provocou a mortalidade.

Neste estudo, encontramos provas empíricas que comprovam o estudo realizado por Ferreira (2007) e fornecem alguma informação relativamente à organização social apresentada por esta espécie, uma vez que a ocorrência de animais com indícios de captura acidental por arte de Xávega e redes de emalhar, juntamente com os dados genéticos obtidos, sugerem a ocorrência de impacto das capturas acidentais em grupos sociais e linhagens maternas de *Delphinus delphis*. Especificamente, uma situação particular de uma captura múltipla de 5 indivíduos em arte Xávega (Dde01, Dde02, Dde03, Dde04 e Dde05),

permitiu comprovar comportamentos sociais descritos para esta espécie. Deste grupo, uma fêmea adulta e um macho imaturo partilhavam o mesmo haplótipo, o que comprova a formação de "escolas" nesta espécie como sistema de organização social, sendo também forte a probabilidade de que estes apresentem laços familiares mais fortes entre si. A esta situação acresce o facto de o haplótipo a que pertence Dde04 estar muito próximo, filogeneticamente, do haplótipo V, sugerindo também forte relação entre estes indivíduos No entanto, essa informação só poderá ser testada através de marcadores biparentais, uma vez que o ADN mitocondrial só fornece informação relativa à linhagem materna. Os restantes indivíduos exibiram diferentes haplótipos entre si, comprovando a existência de "escolas" formadas por vários grupos matriarcais que se movimentam juntos, sendo por isso afectados por fenómenos similares. Resultados similares foram já obtidos noutras espécies (Baker *et al.*, 1994; Valsecchi & Zanelatto, 2003; Mendez *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, demonstrou-se de que modo as capturas acidentais podem afectar a produtividade de uma espécie, ao atingirem fêmeas e crias, apesar de não existirem dados sobre as densidades e taxas de reprodução de golfinho comum nesta região que possam servir para perceber a taxa a que esse efeito ocorre.

Apesar da análise genética deste estudo ter sido limitada a um marcador mitocondrial, estes resultados fornecem informações importantes sobre a aplicação de dados genéticos a estratégias de gestão em pequena ou grande escala da espécie *Delphinus delphis*, tendo as sequências da região de controlo mitocondrial sido bastante informativas para a genética de conservação do golfinho comum. Os dados relativos às capturas acidentais desta espécie em artes de pesca demonstram a necessidade de uma rápida intervenção através da implementação de medidas de mitigação, tais como: 1) assegurar a sustentabilidade das capturas ou outros usos de cetáceos, através do desenvolvimento e sensibilização para a utilização de técnicas de pesca alternativas e através da modificação dos equipamentos de pesca e utilização de dispositivos acústicos nas redes de pesca e/ou redes acusticamente detectáveis pelos cetáceos, para diminuir as taxas de capturas acidentais; 2) apoiar a protecção e recuperação do habitat, através da definição de áreas de protecção e imposição de restrições relativamente ao tempo e área de pesca nessas zonas, bem como redução da poluição aquática e sonora e redução do efeito do desenvolvimento das zonas costeiras; 3) avaliar com rigor científico o impacte de todo um novo conjunto de estruturas a implementar nas zonas costeiras (emissários de aquaculturas e sistemas de esgotos, parques eólicos e sistemas de energia da marés); 4) promover o estabelecimento

de uma relação entre a ciência e a política, bem como com a sociedade, com fins de conservação de cetáceos (Reeves *et al.*, 2003). No caso específico da área de estudo, outra medida urgente seria o apoio a estudos de cetáceos, nomeadamente para a determinação de densidades, distribuição e taxas de mortalidade e reprodução de cetáceos na costa continental portuguesa de modo a determinar o real impacto das pescas e perceber se estas populações são sustentáveis, tendo em conta a pressão humana a que estão sujeitas.

Apresentando uma atitude conservadora em relação aos resultados, é sugerido que estes deveriam ser analisados em pormenor, recorrendo também a outro tipo de marcadores moleculares, de modo a tentar obter mais informações relativamente às amostras, como por exemplo, perceber mais aprofundadamente qual a possível origem destes animais arrojados, tanto em termos de localização geográfica, como em termos de variabilidade genética e composição das populações ou tentar perceber qual o papel das características oceânicas, climáticas e topográficas na movimentação destes indivíduos. Estes são objectivos que vão de encontro às necessidades de diversos estudos que utilizam amostras resultantes de animais arrojados com diferentes propósitos, como genética (Parsons *et al.*, 2002), toxicologia (Zhou *et al.*, 2001), reprodução (Murphy *et al.*, 2005) e parasitologia (Cabezón *et al.*, 2004), sendo fundamental o conhecimento da possível relação genética entre indivíduos de populações vizinhas de modo a tentar perceber a origem dos animais para obter conclusões mais fundamentadas e também permitir estudos de migração, por exemplo, um comportamento ainda pouco conhecido em *Delphinus delphis*.

4.2. Considerações finais

O presente estudo mostrou que não existe estruturação populacional de golfinho comum na região de Portugal centro/norte, que por sua vez, após análise global, parece integrar uma única população que consiste nas regiões Atlânticas analisadas, já que não existe diferenciação genética entre Portugal centro/norte, Açores e Canárias. Existe a possibilidade de também estar incorporada neste *stock* a população do Mar Negro, apesar da ocorrência de um valor do índice de diferenciação relativamente elevado entre o Mar Negro e as populações do Atlântico (ainda que não significativo) e de diversos estudos terem já referido a separação desta região relativamente ao Atlântico, sendo por isso necessária a aplicação de outros marcadores genéticos para a obtenção de resultados mais consistentes.

A análise das linhagens maternas e relação com as capturas acidentais nas pescas sugeriram a existência de capturas de “escolas” formadas por fêmeas e crias e evidenciaram a hipótese de que as agregações formadas por esta espécie possuam vários grupos matriarcais diferentes, que são afectados pelos mesmos fenómenos. Ao mesmo tempo, a análise do efeito das capturas acidentais nas taxas de produtividade das fêmeas na área de estudo evidencia um impacto negativo no número de nascimentos, o que demonstra o problema de capturas de fêmeas e inclusivamente de crias para a sustentabilidade de uma população.

A conjugação de todos os resultados e comparação com dados existentes sobre os níveis de capturas acidentais de cetáceos nas costas europeias, reflectem a importância da definição de medidas de mitigação para garantir a sustentabilidade das populações e manutenção da sua diversidade a nível genético, comportamental e ecológico destas. No entanto, e tal como referido por Ferreira (2007), tanto na área de estudo, quanto a nível mais global devido à elevada importância quer social quer económica da pesca, a implementação de medidas de mitigação só terá alguma probabilidade de sucesso com o apoio das comunidades piscatórias.

Este estudo evidencia a importância da utilização da ecologia molecular como ferramenta de conservação e da integração de dados moleculares em tomadas de decisão relativamente a estratégias de gestão e conservação de espécies selvagens, nomeadamente do golfinho comum.

Referências bibliográficas

Amaha, A. (1994) Geographic variation of the common dolphin, *Delphinus delphis* (Odontoceti: Delphinidae). Ph.D. Thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan.

Amaral, A.R., Sequeira, M., Martínez-Cedeira, J. & Coelho, M.M. (2007) 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*.

Âmbar, I. (2002) The importance of GLOBEC within the Portuguese scientific community. *Global Change NewsLetter*, 54, 13-14.

Árnason, Ú., Gullberg, A. & Widegren, B. (1993) Cetacean Mitochondrial DNA Control Region: Sequences of All Extant Baleen Whales and Two Sperm Whale Species. *Molecular Biology of Evolution*, 10(5), 960-70.

Avise, J.C. (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on Mitochondrial DNA. *Annual Review Genet.*, 25, 45-69.

Baasner, A., Schafer, C., Junge, A. & Madea, B. (1998) Polymorphic sites in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance. *Forensic Science International*, 98, 169–78.

Baird, R.W. & Whitehead, H. (2000) Social organization of mammal-eating killer whales: group stability and dispersal patterns. *Canadian Journal of Zoology*, 78, 2096–105.

Baker, C.S., Lukoschek, V., Lavery, S., Dalebout, M.L., Yong-Un, M., Endo, T. & Funahashi, N. (2006) Incomplete reporting of whale, dolphin and porpoise 'bycatch' revealed by molecular monitoring of Korean markets. *Animal Conservation*, 9(4), 474-82.

Baker, C.S., Palumbi, S.R., Lambertsen, R.H., Weinrich, M.T., Calambokidis, J. & Obrien, S.J. (1990) Influence of Seasonal Migration on Geographic-Distribution of Mitochondrial-DNA Haplotypes in Humpback Whales. *Nature*, 344(6263), 238-40.

Baker, C.S., Weinrich, M.T., Early, G. & Palumbi, S.R. (1994) Genetic impact of an unusual group mortality among Humpback Whales. *Journal of Heredity*, 85, 52–54.

Ballard, J.W.O. & Rand, D.M. (2005) The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 36, 621-42.

Bandelt, H.-J., Forster, P. & Rohl, A. (1999) Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.

Bandelt, H.-J., Lahermo, P., Richards, M. & Macaulay, V. (2001) Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 115, 64–69.

Bearzi, G., Reeves, R.R., Notarbartolo-Di-Sciara, G., Politi, E., Cañadas, A., Frantzis, A. & Mussi, B. (2003) Ecology, status and conservation of short-beaked common dolphins *Delphinus delphis* in the Mediterranean Sea. *Mammal Review*, 33, 224-52.

Bérubé, M., Aguilar, A., Dendanto, D., Larsen, F., Sciara, G.N.D., Sears, R., Sigurjónsson, J., Urban, J. & Palsboll, P.J. (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. *Molecular Ecology*, 7, 585-99.

Bohonak, A.J. & Roderick, G.K. (2001) Dispersal of invertebrates among temporary ponds: are genetic estimates accurate? *Israel Journal of Zoology*, 47, 367–86.

Brown, W.M., George, M. & Wilson, A.C. (1979) Rapid Evolution of Animal Mitochondrial-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1967-71.

Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., Haeringen, W. V., Fain, S. & Broad, T. (2005) Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine*, 119, 295–302.

Cabezón, O., Resendes, A.R., Domingo, M., Raga, J.A., Agustí, C., Alegre, F., Mons, J.L., Dubey, J.P. & Almería, S. (2004) Seroprevalence of Toxoplasma gondii Antibodies in Wild Dolphins From the Spanish Mediterranean Coast. *J. Parasitol.*, 90(3), 643–44.

Cabral, M.J., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Almeida, N.F.d., Oliveira, M.E., Palmeirim, M.J., Queiroz, A.I., Rogado, L. & Santos-Reis, M. (2006) *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. 2a Ed.* Instituto da Conservação da Natureza/Assírio & Alvim, Lisboa.

Cañadas, A., Sagarminaga, R., Stephanis, R.D., Urquiola, E. & Hammond, P.S. (2005) Habitat preference modelling as a conservation tool: proposals for marine protected areas for cetaceans in southern Spanish waters. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 495–521

Carracedo, A., Bar, W., Lincoln, P., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P., Budowle, B., Brinkmann, B., Gill, P., Holland, M., Tully, G. & Wilson, M. (2000) DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International*, 110(2), 79-85.

Carta Batimétrica Internacional do Atlantico Central e Oriental. 2002. Instituto Hidrográfico, Lisboa. Portugal.

Cerchio, S., Jacobsen, J.K., Cholewiak, D.M., Falcone, E.A. & Merriwether, D.A. (2005) Paternity in humpback whales, *Megaptera novaeangliae*: assessing polygyny and skew in male reproductive success. *Animal Behaviour*, 70, 267-77.

Chivers, S.J., Duc, R.G.L. & Robertson, K.M. (2003) A feasibility study to evaluate using molecular genetic data to study population structure of Eastern North Pacific *Delphinus delphis*. In, p. 15. Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA, California.

Christal, J. & Whitehead, H. (2001) Social Affiliations within Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) Groups. *Ethology*, 107, 323-40.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657-59.

Coble, M.D., Just, R.S., O'Callaghan, J.E., Letmanyi, I.H., Peterson, C.T., Irwin, J.A. & Parsons, T.J. (2004) Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *International Journal of Legal Medicine*, 118(3), 137-46.

Coble, M.D., Vallone, P.M., Just, R.S., Diegoli, T.M., Smith, B.C. & Parsons, T.J. (2006) Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *International Journal of Legal Medicine*, 120(1), 27-32.

Coyle, T. (1998). Stock identification and fisheries management: the importance of using several methods in a stock identification study. In *Taking Stock: defining and managing shared resources.* (ed D.A. Hancock), pp. 173-82. Australian Society for Fishery Biology, Sydney.

Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (1993) Empirical Tests of Some Predictions from Coalescent Theory with Applications to Intraspecific Phylogeny Reconstruction. *Genetics*, 134(3), 959-69.

Danil, K. & Chivers, S.J. (2007) Growth and reproduction of female short-beaked common dolphins, *Delphinus delphis*, in the eastern tropical Pacific. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 85(1), 108-21.

Dizon, A., Baker, C.S., Cipriano, F., Lento, G., Palsboll, P. & Reeves, R. (2000). Molecular Genetic Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises: Proceedings of a Workshop on the Forensic Use of Molecular Techniques to Identify Wildlife Products in the Marketplace. In, p 52. Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA., California.

Dizon, A.E. & Perrin, W.F. (1997). Report of the workshop. In *Molecular Genetics of Marine Mammals* (eds A.E. Dizon, S.J. Chivers & W.F. Perrin), Vol. Special Publication No. 3, pp. 3–48. Allen Press, Lawrence, Kansas.

Eck, R.V. & Dayhoff, M.O. (1966) *Atlas of protein sequence and structure.* National Biomedical Research Foundation, Silver Spring.

Edson, S., Ross, J., Coble, M., Parson, T. & Barritt, S. (2004) Naming the dead — Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Science Review*, 16(1), 63 - 90.

Escorza-Trevino, S. & Dizon, A.E. (2000) Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology*, 9, 1049–60.

Escorza-Trevino, S., Lang, A. & Dizon, A.E. (2002). Genetic differentiation and intraespecific structure of Eastern Tropical Pacific spotted dolphins, *Stenella atenuata*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analysis. In, p 20. Sowthwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA., California.

Evans, W.E. (1994). Common dolphin, white-bellied porpoise, *Delphinus delphis* Linaeus, 1758. In *Handbook of marine mammals* (eds S.H. Ridgway & R. Harrison), Vol. 5- The first book of dolphins pp. 191-224. Academic Press, London.

Evans, W.E. (1971) Orientation Behavior of Delphinids - Radio Telemetric Studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 188(1), 142-160.

Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131, 479-91.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-91.

Ferreira, M. (2007) Ocorrência e captura acidental de cetáceos no Centro/Norte de Portugal. Master Thesis, Universidade do Minho, Braga.

Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-25.

Gagneux, P., Gonder, M.K., Goldberg, T.L. & Morin, P.A. (2001) Gene flow in wild chimpanzee populations: what genetic data tell us about chimpanzee movement over space and time. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 356(1410), 889-97.

García-Martínez, J., Moya, A., Raga, J.A. & Latorre, A. (1999) Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. *Molecular Ecology*, 8, 1069–73.

Geraci, J.R. & Lounsbury, V.J. (1993) *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings.* College Station: Texas A&M University Sea Grant College.

Goold, J.C. (1998) Acoustic assessment of population of common dolphin off the West Wales Coast, with perspectives from satellite infra-red imagery. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 78, 1353-64.

Goujon, M., Antoine, L. & Collet, A. (1993). Incidental catches of cetaceans by the French albacore tuna driftnet fishery. Preliminary results In. ICES, Copenhagen, Denmark.

Gowans, S., Whitehead, H. & Hooker, S.K. (2001) Social organization in northern bottlenose whales, *Hyperoodon ampullatus*: not driven by deep-water foraging? *Animal Behaviour*, 62(2), 369–77.

Greenwood, P.J. (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28, 1140–62.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.

Handley, L.J.L. & Perrin, N. (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology*, 16, 1559-78.

Hartl, D.L. & Clark, A.G. (1997) *Principles of Population Genetics*, Third Edition edn. Sinauer Associates, Massachusetts.

Hastie, G.D., Barton, T.R., Grellier, K., Hammond, P.S., Swift, R.J., Thompson, P.M. & Wilson, B. (2003) Distribution of small cetaceans within a candidate Special Area of Conservation; implications for management. *J. Cetacean Res. Manage.*, 5(3), 261-66.

Heyning, J.E. & Perrin, W.F. (1994) Evidence for two species of Common Dolphins (genus *Delphinus*) from the eastern North Pacific. *Natural History Museum of Los Angeles Contributions in Science*, 442, 1-35.

Hildebrandt, S., Brown, R.P., Zamorano Serrano, M.J., Lopez Jurado, L.F. & Afonso Lopez, J.M. (2006) Genetic characterization of *Delphinus delphis* from the Canary Islands

based on the mitochondrial DNA control region. *Division de Acuicultura y Genetica Marina, Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), Trasmontana s/n, Arucas, Las Palmas 35416, Spain*.

Hoarau, G., Holla, S., Lescasse, R., Stam, W.T. & Olsen, J.L. (2002) Heteroplasmy and Evidence for Recombination in the Mitochondrial Control Region of the Flatfish *Platichthys flesus*. *Molecular Biology Evolution*, 19(12), 2261–64.

Hoelzel, A.R., Hancock, J.M. & Dover, G.A. (1991) Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region. *Molecular Biology and Evolution*, 8(4), 475-93.

IM. 2004. Características do clima da Costa de Portugal Continental. Instituto de Meteorologia. (http://www.meteo.pt/resources/im/pdfs/mari_rc_00_00_II.pdf)

IUCN. (2006) 2006 IUCN Red List of threatened species. *available online : www.iucnredlist.org*.

Just, R.S., Irwin, J.A., O'Callaghan, J.E., Saunier, J.L., Coble, M.D., Vallone, P.M., Butler, J.M., Barritt, S.M. & Parsons, T.J. (2004) Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Science International 146S (2004) S147–S149*, 146S, 147-49.

Kaschner, K. (2003). Review of small cetacean bycatch in the ASCOBANS area and adjacent waters –current status and suggested future actions. In *4th Meeting of the Parties (MOP 4). Doc. 21* (ed ASCOBANS), p 123

Kingston, S.E. & Rosel, P.E. (2004) Genetic Differentiation among Recently Diverged Delphinid Taxa Determined Using AFLP Markers. *Journal of Heredity*, 95(1), 1-10.

Klatsky, L.J., Wells, R.S. & Sweeney, J.C. (2007) Offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): Movement and dive behavior near the Bermuda Pedestal. *Journal of Mammalogy*, 88(1), 59-66.

Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T., Ishiwa, H., Takahatat, N. & Chigusa, S.I. (1990) Incomplete Maternal Transmission of Mitochondrial DNA in Drosophila. *Genetics*, 126, 657-63.

Kuiken, T. & Hartmann, M.G. (1991) Cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. *European Cetacean Society Newsletter*, Nº 17(Special Issue), 43.

Kuiken, T., Simpson, V.R., Allchin, C.R., Bennett, P.M., Codd, G.A., Harris, E.A., Howes, G.J., Kennedy, S., Kirkwood, J.K., Law, R.J., Merrett, N.R. & Phillips, S. (1994) Mass Mortality of Common Dolphins (*Delphinus delphis*) in South-West England Due to Incidental Capture in Fishing Gear. *Veterinary Record*, 134(4), 81-89.

Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A.A. & Orell, M. (2003) Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Molecular Biology and Evolution*, 20(2), 243-47.

Ladoukakis, E. & Eyre-Walker, A. (2004) Direct evidence of recombination in human mitochondrial DNA. *Heredity*, 93, 321.

Ladoukakis, E.D. & Zouros, E. (2001) Direct Evidence for Homologous Recombination in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 18(7), 1168–75.

Lang, A.R., Weller, D.W., LeDuc, R.G., Burdin, A.M. & Brownell, R.L.J. (2005). Paternity assessment in the western gray whale population using microsatellites. In *16th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*, San Diego, California.

Lansman, R.A., Avise, J.C. & Huettel, M.D. (1983) Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 80, 1969-71.

LeDuc, R.G., Perrin, W.F. & Dizon, A.E. (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome B sequences. *Marine Mammal Science*, 15(3), 619-48.

López, A. (2003) Estatus dos Pequenos Cetáceos da Plataforma de Galicia. PhD Thesis, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

López, A., Pierce, G.J., Santos, M.B., Gracia, J. & Guerra, A. (2003) Fishery by-catches of marine mammals in Galician waters: results from on-board observations and an interview survey of fishermen. *Biological Conservation*, 111(1), 25-40.

López, A., Pierce, G.J., X.Valeiras, Santos, M.B. & Guerra, A. (2004) Distribution patterns of small cetaceans in Galician waters. *Journal of the Marine Biological association of the United Kingdom*, 84, 4216/1-13.

López, A., Santos, M.B., Pierce, G.J., González, A.F., Valeiras, X. & Guerra, A. (2002) Trends in strandings and by-catch of marine mammals in northwest Spain during the 1990. *Journal of the Marine Biological association of the United Kingdom*, 82(3916.1-3916.9).

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, 347-54.

Mason, E., Coombs, S. & Oliveira, P.B. (2005). An overview of the literature concerning the oceanography of the eastern North Atlantic region. In *Relatório Científico Técnico IPIMAR* (ed S.d. (http://ipimar-iniap.ipimar.pt)), p 58. IPIMAR, Lisboa.

Martin, A.R. & Silva, V.M.F.d. (2004) River dolphins and flooded forest: seasonal habitat use and sexual segregation of botos (*Inia geoffrensis*) in an extreme cetacean environment. *J. Zool. Lond.*, 263, 295-305.

Matzen Silva, J., Norberto, R., Matos, J., Mendonca, D., Simões, F. & Azevedo, J. (2002) Mitochondrial DNA analysis of common dolphins (*Delphinus delphis*) from the Azores Islands. *Biotechnology, INETI, Estrada do Paco do Lumiar, 22, Lisbon 1649-038 Lisboa, Portugal*.

Mendez, M., Rosenbaum, H.C. & Bordino, P. (2007) Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts and management implications. *Conservation Genetics*, 17pp.

Meyer, S., Weiss, G. & Haeseler, A.V. (1999) Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics*, 152, 1103–10.

Moller, L.M. & Beheregaray, L.B. (2004) Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Molecular Ecology*, 13, 1607–12.

Moller, L.M., Beheregaray, L.B., Allen, S.J. & Harcourt, R.G. (2006) Association patterns and kinship in female Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(1), 109-17.

Moller, L.M., Beheregaray, L.B., Harcourt, R.G. & Krutzen, M. (2001) Alliance membership and kinship in wild male bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268(1479), 1941-47.

Morizur, Y., Berrow, S.D., Tregenza, N.J.C., Couperus, A.S. & Pouvreau, S. (1999) Incidental catches of marine-mammals in pelagic trawl fisheries of the northeast Atlantic. *Fisheries Research*, 41, 297-307.

Murphy, S. (2004) The biology and ecology of the short-beaked common dolphin *Delphinus delphis* in the North-east Atlantic. PhD thesis, National University of Ireland, Cork.

Murphy, S., Collet, A. & Rogan, E. (2005) Mating Strategy in the Male Common Dolphin (*Delphinus delphis*): What Gonadal Analysis Tells Us. *Journal of Mammalogy*, 86(6), 1247–58.

Murphy, S., Herman, J.S., Pierce, G.J., Rogan, E. & Kitchener, A.C. (2006) Taxonomic Status and Geographical Cranial Variation of Common Dolphins (*Delphinus*) in the Eastern North Atlantic. *Marine Mammal Science*, 22(3), 573–99.

Neumann, D.R. (2001) Seasonal movements of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) in the north-western Bay of Plenty, New Zealand: influence of sea surface temperature and El Nino/La Nina. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35(2), 371-74.

Natoli, A., Birkun, A., Aguilar, A., Lopez, A. & Hoelzel, A.R. (2005) Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society of London series B - Biological Sciences,* 272, 1217–26.

Natoli, A., Cañadas, A. & Hoelzel, A.R. (2003). Patterns of population sub-division and genetic variability of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and common dolphins (*Delphinus delphis*) in the Black Sea, Mediterranean Sea and eastern North Atlantic. In *Report of the International Whaling Commission*, pp. 1-12.

Natoli, A., Cañadas, A., Peddemors, V.M., Aguilar, A., Vaquero, C., Fernández-Piqueras, P. & Hoelzel, A.R. (2006) Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus sp.*). *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 943–54.

Natoli, A., Peddemors, V.m. & Hoelzel, A.R. (2004) Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 363 - 75.

Natoli, A., Peddemors, V.M. & Hoelzel, A.R. (2007) Population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) impacted by bycatch along the east coast of South Africa. *Conservation Genetics*.

NCBI. (2007). National Center for Biotechnology Information Website. available online at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. In. U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, Bethesda.

Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York.

Nei, M. & Li, W.-H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Genetics*, 76(10), 5269-73.

Nei, M. & Tajima, F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97, 145-63.

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 Neartic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 6(955-970).

Pakendorf, B. & Stoneking, M. (2005) Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6, 165-83.

Parsons, K.M., Noble, L.R., Reid, R.J. & Thompson, P.M. (2002) Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? *Biological Conservation*, 108, 175–82.

Parsons, T.J. & Coble, M.D. (2001) Increasing the Forensic Discrimination of Mitochondrial DNA Testing through Analysis of the Entire Mitochondrial DNA Genome. *Forensic Sciences*, 42(3), 304-09.

Perrin, W.F. (2002). Common Dolphins. In *Encyclopedia of marine mammals* (eds W.F. Perrin, B. Wursig & J. Thewissen). Academic Press, San Diego.

Perryman, W.L. & Lynn, M.S. (1994) Examination of stock and school structure of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in the eastern Pacific from aerial photogrammetry. *Fishery Bulletin*, 92, 122-31.

Pichler, F.B. (2002). Genetic assessment of population boundaries and genetic exchange in Hector's dolphin. In *DOC Science Internal Series 44*, p 37 Department of Conservation, Wellington.

Pichler, F.B. & Baker, C.S. (2000) Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society London Series B-Biological Sciences*, 267, 97-102.

Piganeau, G., Gardner, M. & Eyre-Walker, A. (2004) A Broad Survey of Recombination in Animal Mitochondria. *Molecular Biology and Evolution*, 21(12), 2319–25.

Posada, D. & Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(1), 37-45.

Quérouil, S., Silva, M.A., Freitas, L., Prieto, R., Magalhães, S., Dinis, A., Alves, F., Matos, J.A., Mendonça, D., Hammond, P.S. & Santos, R.S. (2007) High gene flow in oceanic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of the North Atlantic. *Conservation Genetics*, 15pp.

Read, A.J., Drinker, P. & Northridge, S. (2006) Bycatch of Marine Mammals in U.S. and Global Fisheries. *Conservation Biology*, 20(1), 163-69.

Reeves, R.R., Smith, B.D., Crespo, E.A. & Sciara, G.N.d. (2003) *Dolphins, Whales and Porpoises: 2002–2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans.* IUCN Gland, Switzerland and Cambridge.

Reid, J.B., Evans, P.G.H. & Northridge, S.P. (2003) *Atlas of cetacean distribution in north-west European Waters* Joint Nature Conservation Committee, Peterborough.

Reyes, J.C. (1991). The conservation of small cetaceans: a review. In *Secretariat of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals*. UNEP/CMS Secretariat, Bonn.

Rokas, A., Ladoukakis, E. & Zouros, E. (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(8), 411-17.

Rosel, P.E., Dizon, A.E. & Heyning, J.E. (1994) Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Marine Biology*, 119, 159-67.

Rosel, P.E., France, S.C., Wang, J.Y. & Kocher, T.D. (1999) Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, 8, 41-54.

Rosel, P.E. & Rojas-Bracho, L. (1999) Mitochondrial DNA variation in the critically endangered Vaquita *Phocoena sinus* Norris and Macfarland, 1958. *Marine Mammal Science*, 15(4), 990-1003.

Rowles, T.K., Dolah, F.M.v. & Hohn, A.A. (2001). Gross Necropsy and Specimen Collection Protocols. In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine.* (ed L.A.D.a.F.M.D. Gulland), pp. 449-69. CRC Press, Boca Raton, FL

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics Applications Note*, 19(18), 2496-97.

Saitou, N. & Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology Evolution*, 4(4), 406-25.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition* Cold Spring Habour Laboratory Press, New York.

Schaffar-Delaney, A. (2004) Female reproductive strategies and mother- calf relationships of common dolphins (*Delphinus delphis*) in the hauraki Gulf, New Zealand. Master Thesis, Massey University, Albany, New Zealand.

Schwartz, M. & Vissing, J. (2002) Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine*, 347(8), 576-80.

Segura, I., Rocha-Olivaresa, A., Flores-Ramírez, S. & Rojas-Bracho, L. (2006) Conservation implications of the genetic and ecological distinction of *Tursiops truncatus* ecotypes in the Gulf of California. *Biological Conservation*, 133, 3 3 6 –3 4 6.

Sequeira, M. & Ferreira, C. (1994) Coastal fisheries and cetacean mortality in Portugal. *Report of the International Whaling Commission* (Special Issue 15), 165-81.

Sherengul, W., Kondo, R. & Matsuura, E. (2006) Analysis of paternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genes Genet. Syst.*, 81, 399-404.

Silva, M.A. (1999) Diet of common dolphins, *Delphinus delphis*, off the Portuguese continental coast. *Journal of the Marine Biological association of the United Kingdom*, 79, 531-40.

Silva, M.A., Feio, R., Prieto, R., Gonçalves, J.M. & Santos, R.S. (2002) Interactions between cetaceans and the tuna fishery in the Azores *Marine Mammal Science*, 18(4), 893-901.

Silva, M.A. & Sequeira, M. (2003) Patterns in the mortality of common dolphins (*Delphinus delphis*) on the Portuguese coast, using stranding records, 1975-1998. *Aquatic mammals*, 29(1), 88-98.

Silvani, L., Gazo, M. & Aguilar, A. (1999) Spanish driftnet fishing and incidental catches in the western Mediterranean. *Biological Conservation*, 90(1), 79-85.

Slatkin, M. (1985) Gene Flow in Natural-Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 393-430.

Spencer, N., Santos Vázquez, M.B. & Pierce, G.J. (2000). Evaluation of the state of knowledge concerning by-catches of cetaceans. Final Report to the European Comission (Tender No XIV/1999/01 Lot 7). In.

Stoneking, M. (2000) Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *American Journal of Human Genetics*, 67(4), 1029-32.

Swofford, D.L. (2003). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. In. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tajima, F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437-60.

Tajima, F. (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123, 585-95.

Tamura, K. & Nei, M. (1993) Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology of Evolution*, 10(3), 5 12-526.

Taylor, B.L. & Dizon, A.E. (1999) First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*, 8, S11-S16.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-82.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-80.

Tomilin, A.G. (1957). Mammals of the U.S.S.R. and adjacent countries. In *Cetaceans* (ed V.G. Geptner), Vol. IV. Academic Science Publishing House, Moscow, Russia

Tregenza, N.J.C., Berrow, S.D., Hammond, P.S. & Leaper, R. (1997) Common dolphin, *Delphinus delphis* L., Bycatch in the Bottom Gillnets in the Celtic Sea. *Report of International Whaling Comission*, 47, 835-39.

Tregenza, N.J.C. & Collet, A. (1998) Common dolphin *Delphinus delphis* bycatch in pelagic trawl and other fisheries in the North East Atlantic. *Report of International Whaling Commission*, 48, 453 – 59.

Tudela, S., Kai, A.K., Maynou, F., Andalossi, M.E. & Guglielmi, P. (2005) Driftnet fishing and biodiversity conservation: the case study of the large-scale Moroccan driftnet fleet operating in the Alboran Sea (SW Mediterranean). *Biological Conservation*, 121, 65-78.

Valsecchi, E. & Zanelatto, R.C. (2003) Molecular analysis of the social and population structure of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*): conservation implications. *J Cetacean Res Manage*, 5, 69–75.

Vrijenhoek, R.C. (1997) Gene flow and genetic diversity in naturally fragmented metapopulations of deep-sea hydrothermal vent animals. *Journal of Heredity*, 88(4), 285-93.

Wall, D., O'Brien, J., Meade, J. & Allen, B.M. (2006) Summer distribution and relative abundance of cetaceans off the west coast of Ireland. *Biology and Environment: proceedings of the Royal Irish Academy*, 106B(2), 135-42.

Walsh, P., Metzger, D. & Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-13.

Waples, R.S. (1998) Separating the Wheat From the Chaff: Patterns of Genetic Differentiation in High Gene Flow Species. *Journal of Heredity*, 89(5), 438-50.

Waples, R.S. & Gaggiotti, O. (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15, 1419-39.

Waring, G.T., Josephson, E., Fairfield, C.P. & Maze-Foley, K. (2007). U.S. Atlantic and Gulf of Mexico Marine Mammal Stock Assessments - 2006. In, p 388. National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Science Center, National Oceanic and Atmospheric Administration, Massachusetts.

Wells, R.S., Rhinehart, H.L., Cunningham, P., Whaley, J., Baran, M., Koberna, C. & Costa, D.P. (1999) Long distance offshore movements of bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science*, 15(4), 1098-114.

Westgate, A.J. (2005) Population structure and life history of Short-beak common dolphins (*Delphinus delphis*) in the north Atlantic. PhD thesis, Duke University.

Westgate, A.J. (2007) Geographic variation in cranial morphology of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) from the North Atlantic. *Journal of Mammalogy*, 88(3), 678-88.

Westgate, A.J. & Read, A.J. (2007) Reproduction in short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) from the western North Atlantic. *Marine Biology*, 150(5), 1011-24.

Whitlock, M.C. & McCauley, D.E. (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F-ST not equal 1/(4Nm+1). *Heredity*, 82, 117-25.

Wise, L., Silva, A., Ferreira, M., Silva, M.A. & Sequeira, M. (2007) Interactions between small cetaceans and the purse-seine fishery in western Portuguese waters. *Scientia Marina*, 71(2), 405-12.

Wright, S. (1951) The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-54.

Yao, Y.- G., Bravi, C.M. & Bandel, H.-J. (2004). A call for mtDNA data quality control in forensic science. *Forensic Science International*, 141, 1-6.

Zhao, X., Li, N., Guo, W., Hu, X., Liu, Z., Gong, G., Wang, A., Feng, J. & Wu, C. (2004) Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity*, 93, 399–403.

Zhou, J.L., Salvador, S.M., Liu, Y.P. & Sequeira, M. (2001) Heavy metals in the tissues of common dolphins *Delphinus delphis* stranded on the Portuguese coast. *The Science of the Total Environment*, 273, 61-76.

Zollett, E.A. & Rosenberg, A.A. (2005). A Review of Cetacean Bycatch in Trawl Fisheries. Literature Review prepared for the Northeast Fisheries Science Center. NFSC, 35 pp., U.S.A.

Anexos

Anexo I – Tabela com informações relativas às amostras analisadas da população de Portugal centro/norte (sexo do animal, ano de colheita, localização do arrojamento, estado do corpo, indício de captura acidental e arte de pesca envolvida)

Amostra	Sexo	Ano	Localização	Estado do corpo	Indícios de captura acidental	Arte de Pesca envolvida
Dde01	Macho	2004	Poço da Cruz	2	Sim	XAV
Dde02	Macho	2004	Poço da Cruz	2	Sim	XAV
Dde03	Fêmea	2004	Poço da Cruz	2	Sim	XAV
Dde04	Fêmea	2004	Poço da Cruz	2	Sim	XAV
Dde05	Macho	2004	Poço da Cruz	2	Sim	XAV
Dde06	Macho	2004	Gala	3	Sim	IDT
Dde07	Fêmea	2004	Costa Nova	4	Sim	IDT
Dde08	Macho	2004	Tocha	3	Indeterminado	-
Dde09	Fêmea	2005	Mira	3	Sim	REM
Dde10	Macho	2005	Mira	3	Sim	IDT
Dde12	Fêmea	2005	Quiaios	3	Sim	REM
Dde13	Macho	2005	Leirosa	3	Sim	NDT
Dde14	Fêmea	2005	Gala	3	Sim	REM
Dde15	Macho	2005	Gala	3	Provável	IDT
Dde16	Macho	2005	Quiaios	3	Sim	REM
Dde17	Fêmea	2005	Aveiro	2	Sim	REM
Dde18	Macho	2005	Buarcos	4	Indeterminado	-
Dde19	Macho	2005	Leirosa	3	Sim	REM
Dde20	Macho	2005	Aveiro	3	Não	-
Dde22	Fêmea	2005	Palheirão	3	Indeterminado	-
Dde23	Fêmea	2005	Tocha	3	Não	-
Dde25	Macho	2005	F. da Foz	3	Sim	IDT
Dde26	Macho	2005	Costinha	3	Sim	IDT
Dde27	Macho	2005	Mira	3	Não	-
Dde28	Macho	2005	Torreira	2	Não	-
Dde29	Macho	2005	Buarcos	3	Não	-
Dde30	Fêmea	2005	Mira	3	Provável	IDT
Dde31	Fêmea	2006	Vagueira	3+	Provável	IDT
Dde32	Macho	2006	Gala	3	Sim	REM
Dde33	Macho	2006	Mira	2	Sim	NDT
Dde34	Fêmea	2006	Leirosa	1	Não	-
Dde36	Macho	2006	Tocha	3	Sim	IDT
Dde37	IDT	2006	Tocha	4	Sim	IDT
Dde38	Fêmea	2006	Murtinheira	2	Sim	REM
Dde39	Fêmea	2006	Tamargueira	3	Sim	REM
Dde40	Macho	2006	Vagueira	4	Sim	IDT
Dde41	Fêmea	2006	Leirosa	3	Sim	IDT
Dde43	Macho	2006	Quiaios	3+	Provável	IDT
Dde45	IDT	2006	Tocha	3+	Sim	IDT
Dde46	Macho	2006	Palheirão	3	Sim	IDT
Dde47	Macho	2006	Mira	3	Indeterminado	-

1- Vivo; 2- Fresco; 3 – Decomposição moderada; 4 – Decomposição avançada; 5 – Restos;
XAV – Xávega; REM – Redes de emalhar; IDT - Indeterminada.

Anexo II – Distribuição dos *loci* polimórficos ao longo dos 27 haplótipos de *Delphinus delphis*, em Portugal centro/norte.

		***Loci* polimórficos**																																									
Ha	**Fa**	64	77	86	94	98	143	158	161	162	171	204	206	259	272	299	302	305	329	332	333	335	336	337	346	347	356	361	377	410	444	445	461	465	505	532	555	556	558	559	579
A	6	**c**	**t**	**a**	**a**	**c**	**c**	**c**	**a**	**t**	**t**	**a**	**t**	**t**	**c**	**c**	**c**	**c**	**a**	**t**	**c**	**t**	**c**	**c**	**c**	**c**	**g**	**a**	**a**	**t**	**c**	**c**	**g**	**a**	**t**	**t**	**a**	**c**	**t**	**a**	**t**
B	1	t	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	t	.	t	t	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
D	1	.	.	.	g	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	t	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	t	.	a	.	c	c	g	.	c	.	.	.	.
E	2	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	t	.	t	t	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	t	t	.	.	.	.	.	t	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G	2	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	t	.	.	.	.	t	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H	1	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.
I	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	c	.	.	g	.	.	.	.	.	t	t	.	.	.	.	g	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.
J	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	t	.	t	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
K	2	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	t	.	.	.	.	t	.	a	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.
L	1	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	t	a	.	.	c	.	t	a	.	.	.	.	.	t	c	.	.	.
M	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	t	.	.	t	.	.	.	.	.	.	a	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.
N	3	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	g	.	.	.	t	.	t	t	t	.	.	.	g	c	.	.	a	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.
O	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	g	.	.	c	.	.	t	.	t	t	t	.	g	.	t	.	a	.	c	c	.	.	c	.	.	.	.
P	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Q	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R	1	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
S	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	c	.	.	g	.	.	.	.	.	t	t	.	.	.	.	g	c	t	.	a	.	.	.	.	.	.	c	.	c
T	3	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
U	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	g	.	.	.	.	.	a	t	.	.	.	.	.	c	.	.	a	.	c	c	.	.	c	.	.	.	.
V	2	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	g	t	.	.	.	.	.	.	.	t	a	.	.	c	.	t	a	.	.	.	.	.	t	c	.	.	.
W	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
X	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.
Y	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	t	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Z	1	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	c	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.
AB	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	c	.	.	g	.	.	.	.	.	t	t	.	.	.	.	g	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	c	.	c

Ha = haplótipos; Fa = Frequência absoluta desses haplótipos na população.

Anexo III – Distribuição das amostras ao longo dos 27 haplótipos de *Delphinus delphis* da população do centro/norte de Portugal.

Haplótipos	Amostras
A	Dde02, Dde 26, Dde31, Dde32, Dde40, Dde45
B	Dde46
C	Dde43
D	Dde22
E	Dde38, Dde23
F	Dde39
G	Dde37, Dde27
H	Dde33
I	Dde30
J	Dde20
K	Dde18, Dde06
L	Dde16
M	Dde15
N	Dde14, Dde29, Dde34
O	Dde13
P	Dde12, Dde41
Q	Dde09
R	Dde08
S	Dde05
T	Dde07, Dde36, Dde19
U	Dde04
V	Dde03, Dde01
W	Dde10
X	Dde28
Y	Dde47
Z	Dde17
AB	Dde25