

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRÁFIA BIOLÓGICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTOQUES
POPULACIONAIS DE *PONTOPIA*
BLAINVILLEI (CETACEA: PONTOPORIIDAE)
ATRAVÉS DE MORFOLOGIA EXTERNA**

BEATRIZ HELENA ALMEIDA BARBATO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Oceanografia
Biológica da Fundação Universidade
Federal do Rio Grande, como requisito
parcial à obtenção do título de MESTRE.

**Paul Gerhard Kinas
Eduardo Resende Secchi**

**RIO GRANDE
Março/2008**

A minha mãe, a Anelisa e ao David.

"Forma dat esse rei"
Aristóteles

Agradecimentos

Foram tantas as pessoas que, nesses dois anos, não passaram somente pela minha vida, mas deixaram um pouco delas... Foram tantos os aprendizados que ultrapassam os limites dessa tese...

A vida é mesmo cheia de surpresas, que às vezes parecem simples coincidências, mas vejam só, minha tese foi uma dissertação sobre formas. Formas corporais. O quê? Que sugestivo isso, Edu, ainda bem que não encontrei toninhas gordas, mas nós decidimos excluir as medidas de circunferência.

Agora, nestas poucas linhas iniciais, tenho a tarefa de dissertar sobre formas de agradecer. Meu amigo Marcelo do LaBest disse uma vez que eu deveria ser menos prolixa. Eu concordo com ele, com ressalvas. Não costumo economizar em sentimentos e principalmente no carinho e na gratidão. Abaixo a indolência!

Foram muitas mãos, alguns ombros e joelhos e outras tantas palavras e olhares, tão preciosos, para que eu pudesse chegar até aqui.

O maravilhoso da vida, agora eu sei, Deus me presenteia a cada manhã. Pareciam horas solitárias, escuras e confusas. Daqueles que chegaram e daqueles que precisaram partir, foi preciso ir ao fundo e voltar, pra se lembrar Dele, que vive aqui dentro de mim e que está ao meu lado SEMPRE! Obrigada, meu PAI!

Ao meu pai, que me deu a possibilidade de escrever essas linhas hoje, eu não pude dizer o quanto eu o amava. Ele se foi depressa demais, antes mesmo que eu pudesse compreender o silêncio do seu coração. Mas com a saudade e a dor, nasce também a força pra continuar...

Eu não posso me esquecer de alguns joelhos que permaneceram muito tempo no chão para que meus pés permanecessem firmes, enquanto caminhava e caía, e por muitas vezes, pensava que levantar era um fardo pesado demais. A minha mãezinha, eu dedico este trabalho, por todo o carinho, toda a dedicação, todo o amor incondicional. Obrigada por nesses últimos meses ser meu pai e minha mãe. Obrigada pelas frutas frescas que buscava pra mim; pelo pão, queijo e café, pelo almoço quentinho que me esperava depois de braçadas exaustivas na piscina; pela roupa lavada e passada, pela paciência, pela incrível paciência...

Aos irmãos que reencontrei depois da perda. Obrigada pelas palavras de fé e pelas explicações de álgebra matricial, David e pela compreensão silenciosa e distante e seus fantásticos desenhos, Ane!

Gratidão e carinho especiais eu tenho por dois homens, que foram mais do que mestres. Vocês são apaixonantes e se em algumas vezes a dúvida, o desânimo e o medo persistiram em mim, tenham certeza, eu nunca desistiria por vocês. Obrigada pela compreensão, pela paciência e pela presença, esta, por mais distante, sempre constante.

Não dá pra esquecer os olhos da cor do mar que me ofereceram carona um dia, quando já pensava em fazer minhas malas. Ah *gauchín*, quando descobri que tu eras tu! Obrigada por abrir as portas que eu havia fechado. Eu havia jogado as chaves fora, mas você me disse ainda que acima das nuvens o sol sempre brilha...

E àquele distinto senhor que no começo eu achava incrivelmente sério. Como bem disse minha prima um dia: "Paulo Geraldo das Beiradas"; pois é, das beiradas. Você sempre foi o meu apoio, Kinas, em tudo o que fiz, no laboratório ou fora dele, como professor, mestre, amigo e quase um pai... Eu sei que se atrapalhava com minhas lágrimas, mas assim mesmo ofereceu-me seu ombro. A sua paciência, a sua solicitude em ajudar todos os que batiam a sua porta são admiráveis.

Certos amigos me diziam coisas o tempo todo e eu não conseguia ouvir. Obrigada Ju, Ana e Rodrigo pelas risadas e por tornar meus dias no Cassino menos cinzas; Ju pelo carinho, pela paciência, pela amizade que construímos aqui e pelos puxões de orelha; Ana, pela grandeza da sua alma, pela lealdade, pela paciência e compreensão; Rodrigo, por esse intelecto genial, por Caetanear para mim. Vocês são sensacionais!

A Cidinha e a Zuleima por me ajudarem a ver, a ouvir e a sentir. Obrigada!

Às montanhas de Minas, o meu refúgio.

O Voto disse uma vez que eu precisava de menos transpiração e mais inspiração. Ele estava certo na parte da inspiração, mas de onde ela vem? Eu digo que quando você se abandona na procura, você a encontra, se buscar a paixão. Obrigada pelas nossas conversas, amigo, pelos risos e pelos sorrisos.

Santiago, eu não poderia esquecer-me de você, meu primeiro amigo quando pisei nesta terra. Obrigada por tão boa acolhida. E Gabriel, que mesmo longe, cuidou para que tudo corresse bem quando eu chegasse aqui.

Obrigada Cristiano por musicar minha voz em nossos saraus e aos meus amigos da Educação Ambiental Igor, Grazi, Alice, Cris, Jaça, Verinha e Álvaro, pelas poesias de Mário Quintana, Pablo Neruda, Fernando Pessoa e Cora Coralina.

Thaisinha e Lili, minha primas queridas, pelas noites estreladas de Minas com fogueirinha e violão e pelos banhos de cachoeira. Renato (Laranjeira), Favinho (Massa) e Mauro (Xula), bebam menos, por favor! Eu me culpava por não conseguir trabalhar o tanto quanto achava que deveria nos dias depois que nos encontrávamos, mas o riso, o canto, a conversa e a cerveja foram essenciais. Vocês foram o melhor presente que encontrei no meio das montanhas.

Obrigada Mara, Rogério, Nazareno, Dito, Clécio, Valmir e Irmão Rino. Vocês não imaginam o quanto aquelas braçadas exaustivas e, por vezes solitárias, na piscina, foram importantes pra esse trabalho.

Marcelo meu amigo e companheiro do LaBest, pelas conversas, pela convivência, pela compreensão, pela sintonia que não se exprime em palavras; Raquel por sempre estar disponível em me ajudar, pelos cafés, pelas histórias; Flávia, então não percebeu que somos tão parecidas, embora diferentes? Pelo seu sorriso e sua gentileza, obrigada; Silvina e Neco, vocês são exemplares!

Algus colegas distantes, talvez anônimos (outros nem tanto, mas não menos brasileiros) merecem um reconhecimento especial aqui: Renata Ramos, Ana Paula Di Benedetto, Carol Bertozzi, Ju Marigo, Daniel Danilewicz e Pablo Bordino. Esse trabalho é nosso!

Martin, suas considerações deram a luz que eu precisava no final.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	13
I. INTRODUÇÃO	15
II. MATERIAIS E MÉTODOS	26
II.I. Obtenção dos dados	26
II.II. Triagem do dados	29
II.III. Análise Estatística.....	36
Distribuição Normal multidimensional e distribuição Normal condicional	36
Análise de Componentes Principais para grupos múltiplos	39
Análise Discriminante Canônica	41
Efeito-do-observador: simulação de Monte Carlo.....	42
III. RESULTADOS.....	44
III.I. Machos e Fêmeas das <i>FMA</i> s I,II e III	44
III.I.I. Análises Estatísticas Univariadas	44
III.I.II. Análises Estatísticas Multivariadas	52
III.II. Fêmeas das quatro áreas de manejo propostas	60
III.II.I. Análises Estatísticas Univariadas	60
III.II.II. Análises Estatísticas Multivariadas	64
III.III. Simulação de Monte Carlo.....	72
IV. DISCUSSÃO.....	74
V. CONCLUSÃO	89
LITERATURA CITADA.....	90
ANEXOS	99
ANEXO I.....	100
ANEXO II.....	101
ANEXO III.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
2.1. Lista das medidas morfométricas comuns as <i>FMA</i> s I, II e III.	35
2.2. Número de exemplares adultos de toninhas utilizados nas análises.....	35
3.1. Resumo das medidas morfológicas externas para os exemplares adultos do Rio de Janeiro.....	46
3.2. Resumo das medidas morfológicas externas para os exemplares adultos de São Paulo	46
3.3. Resumo das medidas morfológicas externas para os exemplares adultos do Rio Grande do Sul	47
3.4. Resultados da ANOVA com dois fatores e do teste de Shapiro-Wilks, para cada um dos 14 caracteres métricos externos analisados.....	47
3.5. Correlações entre caracteres e escores dos componentes principais obtidos de uma MGPCA realizada para 14 caracteres métricos externos de toninhas provenientes de amostras de três diferentes áreas ao longo da sua região de distribuição (<i>FMA</i> s I, II e III).....	55
3.6. Análise da variância dos escores da MGPCA para machos e fêmeas.	55
3.7 Coeficientes das três raízes discriminantes de uma CVA realizada a partir dos escores dos 14 componentes principais obtidos para machos e fêmeas de três diferentes áreas.	58
3.8. Resumo das medidas morfológicas externas para as fêmeas adultas da Argentina.	62
3.9. Resultados da ANOVA e do Teste Shapiro-Wilks, para cada um dos 12 caracteres métricos externos analisados.	62
3.10. Correlações entre caracteres e escores dos componentes principais de uma MGPCA realizada para 12 caracteres métricos externos de toninhas provenientes de amostras de quatro diferentes áreas ao longo da sua região de distribuição (<i>FMA</i> s I, II, III e IV).	69

3.11. Análise da variância dos escores da MGPCA realizado para fêmeas..	69
3.12. Coeficientes das três raízes discriminantes de uma CVA realizada a partir dos escores dos 12 componentes principais obtidos para fêmeas das quatro áreas de manejo de toninhas..	70

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
2.1. Mapa mostrando os limites norte e sul da distribuição da toninha e as quatro <i>FMA</i> s propostas por Secchi <i>et al.</i> (2003).	33
2.2. Desenho esquemático de uma toninha mostrando as medidas comuns as <i>FMA</i> s I, II e III, inicialmente selecionadas para as análises.	34
3.1. Quantis teóricos versus quantis empíricos para as medidas: rostró ao ângulo da boca (R-AnB), rostró ao centro do espiráculo (R-CE), rostró a inserção da nadadeira peitoral (R-InAnNP) e rostró ao centro do ânus (R-CAnus).	48
3.2. Gráfico das interações dos fatores sexo e área para a medida rostró ao ouvido (R-MA).	49
3.3. Gráfico das interações dos fatores sexo e área para a medida rostró ao ponto mais alto da dorsal (R-PND).	49
3.4. Gráfico das interações dos fatores sexo e área para a medida comprimento posterior da nadadeira peitoral (CPosNP).	50
3.5. Gráficos de contornos (95% confiança) obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV1 e CV2.	59
3.6. Gráficos de contornos (95% confiança) obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV2 e CV3.	59
3.7. Quantis teóricos versus quantis empíricos obtidos na análise das fêmeas, para as medidas: rostró ao ângulo da boca (R-AnB), rostró ao centro do espiráculo (R-CE), rostró a inserção da nadadeira peitoral (R-InAnNP), rostró ao centro do ânus (R-CAnus), comprimento posterior da nadadeira peitoral (CPosNP) e largura máxima da nadadeira peitoral (LNP).	63
3.8. Gráfico de contornos (95% confiança) das <i>FMA</i> s I, II, III e IV, obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV1 e CV2.	70
3.9. Gráfico de contornos (95% confiança) das <i>FMA</i> s I, II, III e IV, obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV1 e CV3.	71

3.10. Gráfico de contornos (95% confiança) das <i>F</i> MAs I, II, III e IV, obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV2 e CV3.....	71
3.11. Distribuição de frequências das distâncias médias de Mahalanobis entre os centróides, obtidas através de 300 simulações de Monte Carlo.	73

RESUMO

A captura acidental em redes de emalhe constitui a maior ameaça à sobrevivência das toninhas, espécie de cetáceo de distribuição costeira restrita ao Atlântico Sul Ocidental. Como esta atividade ocorre em diferentes níveis ao longo da distribuição geográfica da espécie, é essencial a identificação de unidades populacionais discretas a fim de que sejam conduzidos procedimentos de conservação e manejo em âmbito local, preservando dessa forma o potencial evolutivo da espécie. Diversos estudos (e.g. craniometria, genética, populacionais e parasitológicos) indicaram a existência de diferentes populações de toninhas ao longo da sua distribuição. Quatro distintas áreas de manejo para toninhas (Franciscana Management Areas) foram propostas utilizando-se informações combinadas provenientes desses estudos: *FMA I* inclui as águas do Espírito Santo e Rio de Janeiro; *FMA II* cobre os estados de São Paulo a Santa Catarina; *FMA III* compreende as águas do Rio Grande do Sul e Uruguai e *FMA IV* abrange a região costeira norte da Argentina. As populações das *FMA*s I, II e III representam entidades demográficas distintas com limitado fluxo gênico, mas poucas evidências suportam a separação das populações do sul em *FMA III* e *FMA IV*. Estudos de morfologia externa podem fornecer contribuições importantes para a identificação de eventuais unidades populacionais. Este estudo teve como objetivo verificar a existência de variação na morfologia externa entre unidades populacionais pré-definidas para fins de manejo. Amostras provenientes de capturas acidentais na costa do Rio de Janeiro (*FMA I*), São Paulo (*FMA II*), Rio Grande do Sul (*FMA III*) e Argentina (*FMA IV*), foram disponibilizadas por distintos projetos de pesquisa. Quatorze caracteres métricos externos de um total de 78 indivíduos adultos foram utilizados. Machos e fêmeas foram analisados separadamente. A amostra designada como *FMA IV* não foi incluída na análise geral por conter apenas um macho adulto. A análise de componentes principais para grupos múltiplos (MGPCA) realizada entre as *FMA*s I, II e III mostrou que 70.94% da variação total dentro dos grupos pode ser explicada pelos três primeiros componentes, o primeiro deles sendo interpretado como um índice de tamanho geral e os demais, explicando variação na forma. A análise discriminante canônica (CVA) realizada para maximizar a discriminação entre os grupos revelou que as três primeiras variáveis canônicas evidenciaram 98.97% das diferenças entre os grupos. A combinação que melhor permitiu a separação entre as três áreas foi a representação conjunta de CV2 e CV3. Diferenças relacionadas à posição da nadadeira dorsal e ao comprimento do rostro parecem contribuir para

separar, principalmente, as amostras *FMA I* e *FMA III*. Interpretações biológicas para as diferenças relacionadas à forma detectadas para a *FMA II* não foram possíveis até o momento. A representação gráfica de CV1 e CV2 permitiu separar claramente os sexos evidenciando que a característica fundamental que os separa, é a posição relativa do umbigo, fendas genitais e ânus. Observou-se ainda um marcado dimorfismo sexual relacionado ao tamanho, sendo as fêmeas maiores que os machos em todas as áreas analisadas. As fêmeas da *FMA IV*, incluídas em análises subsequentes que utilizaram 12 medidas morfológicas externas, também mostraram diferenças em relação às fêmeas das demais áreas. Os três primeiros componentes principais explicam juntos 77.98% de toda a variação observada dentro dos grupos, relacionada à forma. As variáveis canônicas CV2 e CV3 mostram claramente a separação entre as quatro áreas, com os exemplares da *FMA IV* apresentando um comprimento corporal intermediário aos exemplares das *FMA I* e *FMA III*, e os da *FMA II* sendo menores que os exemplares das demais áreas. No que se refere à extensão das medidas anteriores do corpo, a representação gráfica das regiões de confiança dos escores individuais médios para CV2 mostrou maior semelhança entre *FMA IV* e *FMA I*. A diferenciação morfológica encontrada neste estudo concorda com outras abordagens, especialmente genética, e fornece suporte adicional para a designação proposta das quatro distintas áreas de manejo para toninhas. É provável que as diferenças morfológicas encontradas entre as distintas áreas ao longo da distribuição da espécie sejam condicionadas por pressões seletivas diferenciais para a ocupação de nicho, já que as características do habitat e hábitos alimentares variam entre as regiões. Entretanto, análises morfológicas utilizando um número maior de exemplares por amostra são recomendadas em estudos futuros com objetivo de reduzir o efeito da estocasticidade. Adicionalmente, a área de manejo designada como *FMA I* poderia ser considerada uma subespécie distinta, dado os indícios de uma distribuição descontínua, os resultados genéticos e morfológicos concordantes e o tempo de divergência genético relativamente curto entre esta e as populações do sul. Análises morfológicas e moleculares utilizando as mesmas amostras fazem-se necessárias para assegurar definições mais precisas acerca do status taxonômico dessas unidades.

Palavras-chave: *Pontoporia blainvillei*, identificação de unidades populacionais, morfologia externa, análise de componentes principais para grupos múltiplos, análise canônica discriminante, Atlântico Sul Ocidental.

ABSTRACT

Incidental mortality in fisheries, mainly gillnets is one of the most important causes of decline of several species of cetaceans around the world. High numbers of franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) have been bycaught in gillnets for at least four decades. Both the level of the incidental catches and the species potential for response vary regionally along its distribution. Therefore, for conservation purposes, it is important to determine discrete management units (stocks) so impact can be assessed on a local basis. The identification of discrete units based on biological data contributes to preserve the evolutionary potential of species. Several studies have contributed to determine populational identity of franciscanas (e.g. osteological characters, molecular biology, populational and parasitological). Four Franciscana Management Areas (*FMA*s) were proposed, using the phylogeographic concept and a variety of proxies: *FMA* I includes coastal waters of Espírito Santo and Rio de Janeiro States; *FMA* II covers São Paulo to Santa Catarina States; *FMA* III comprises the coastal waters of Rio Grande do Sul and Uruguay and *FMA* IV represents the coastal waters of Northern Argentina. There is strong evidence that assert that the populations from *FMA*s I, II, III represent distinct demographic entities with limited gene flow. However, evidences for splitting *FMA* III from *FMA* IV are weak. Furthermore, the estimated levels of gene flow is high between neighbour populations (Rio Grande do Sul, Uruguay and Argentina) and tends to decrease as distance increases. External morphology could provide useful data for contributing to identification of discrete populational units. The aim of this study was to verify the existence of variation in external morphology among franciscanas from the four management areas predefined. The samples, coming from incidental catches off the coast of Rio de Janeiro (*FMA* I), São Paulo (*FMA* II), Rio Grande do Sul (*FMA* III) and Argentina (*FMA* IV), were made available by different research projects. Fourteen external metric characters of 78 adults specimens were used. Males and females were analysed separately. Only one adult male was present in the sample from *FMA* IV, which was excluded from the analysis. Principal component analysis between *FMA*s I, II and III showed that 70.94% of overall variation within groups can be explained by the first three components. The first component can be interpreted as an index of general size and the others explain shape variation. Canonical variate analysis showed similar results as those provided by plot of individual scores of principal components. The first three canonical variates showed

98.97% of differences between groups. The second and the third variates together showed the best discrimination between *FMA* I, II and III. Differences related to position of dorsal fin and anterior region of body seen to contribute for splitting, mainly, the samples *FMA* I and *FMA* III. It was not possible to do biological play related to shape for the differences from *FMA* II, but individuals from this area were smaller than individuals from all other areas. Specimens from *FMA* III showed dorsal fins further backwards. The anterior region of body seems to be longer in specimens from *FMA* I. Plot of CV1 and CV2 showed clear separation between sexes, showing that the fundamental character for separation is the relative position of umbilicus, genital slit and anus. Sexual dimorphism related to size was observed still, with females bigger than males for all areas analyzed. Females from *FMA* IV, included in subsequent analysis with 12 external morphological measurements, also showed clear differences. The first three principal components explain 77.98% of overall variation within groups, related to shape. Canonical variates CV2 and CV3 showed a separation between the four areas but with a little overlap. Specimens from *FMA* IV showed a total length intermediate between *FMA* I and *FMA* III and again, individuals from *FMA* II were smaller than individuals from all other areas. While females from *FMA* III seem to present larger appendices than females from other areas, females from *FMA* IV look similar to individuals from *FMA* I in the anterior portion of the body. Morphological differentiation found in this study agrees with some genetic approaches and gives additional support to the proposed *FMA*s. It is possible that morphological differences found among distinct areas along *franciscana*'s distribution are due differential selection (ecological divergence) for niche occupation, since characteristics of habitat and *franciscana* ecology vary among locations. However, using a larger sample is recommended for reducing the stochasticity. Furthermore, *franciscanas* inhabiting *FMA* I could be considered a distinct subspecies, since the indication of a discontinuous distribution, a short time of genetic divergence between this and the southern units and the genetic and morphological results consistent. However, none taxonomic revision has been done yet. Using the same data set for morphological and molecular analyses is recommended for elucidating this issue.

Key words: *Pontoporia blainvillei*, stock identity, external morphology, multiple group principal component analysis, canonical variate analysis, Western South Atlantic.

I. INTRODUÇÃO

A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Pontoporiidae), está restrita às águas do Atlântico Sul Ocidental, distribuindo-se de Itaúnas (18° 30'S), estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil (Siciliano, 1994), até Golfo San Matias (42° 10'S), Península Valdés, na Província de Chubut, Argentina (Crespo *et al.*, 1998).

Baseadas em diferenças osteológicas, Pinedo (1991) propôs duas diferentes formas geográficas de toninhas ao longo do Atlântico Sul Ocidental: uma forma menor, distribuída ao norte de Santa Catarina (ocorrendo entre as latitudes 22°S e 27°S) e outra maior, distribuída ao sul desta região (ocorrendo entre as latitudes 32°S e 38°S).

Diversos outros estudos confirmaram a divisão proposta por Pinedo (1991). Os comprimentos assintóticos obtidos por Ramos *et al.* (2000a; 2002) para os indivíduos do norte do Rio de Janeiro foram menores do que aqueles encontrados por Kasuya e Brownell (1979) para as toninhas do Uruguai, e por Walter (1997) e Barreto e Rosas (2006) para as toninhas do Rio Grande do Sul.

Adicionalmente, estudos morfológicos que incluíram outros exemplares da região sudeste do Brasil indicaram que os comprimentos assintóticos estimados por Rosas (2000) para as toninhas de São Paulo e norte do Paraná foram menores que os parâmetros de crescimento obtidos para toninhas do norte do Rio de Janeiro. Estes resultados apontaram que a variação existente na espécie não é clinal, como originalmente proposta por Pinedo (1991).

Os resultados das análises moleculares de DNA mitocondrial e nuclear (Secchi *et al.*, 1998; Ott, 2002; Lázaro *et al.*, 2004) concordaram com aqueles

obtidos com os estudos de osteologia e crescimento e forneceram evidências da ocorrência de distintas populações de toninhas ao longo da distribuição da espécie. Dos 11 haplótipos encontrados por Secchi *et al.* (1998), cinco foram exclusivos da amostra proveniente do Rio Grande do Sul e 6 foram encontrados apenas nos exemplares do Rio de Janeiro, com nenhum haplótipo sendo compartilhado entre as localidades. Ott (2002) e Lázaro *et al.* (2004) também não encontraram haplótipos comuns entre os exemplares do Rio de Janeiro e os exemplares amostrados na parte sul da distribuição da espécie. As análises de microssatélite de DNA nuclear revelaram a existência de diferenças significativas nas frequências alélicas dos *loci* nucleares, sugerindo, juntamente com os resultados das análises moleculares da variância do DNA mitocondrial, uma significativa estruturação populacional para a espécie. O modelo de isolamento por distância proposto por Lázaro *et al.* (2004) para explicar a diferenciação genética da espécie concorda com os resultados de Ott (2002) que revelaram a existência de três populações de toninhas geneticamente distintas: a) Rio de Janeiro; b) São Paulo, Paraná e Santa Catarina; c) Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina.

Rosas e Monteiro-Filho (2002) estimaram a idade e o comprimento de primeira maturação para as toninhas do sul do estado de São Paulo e norte do estado do Paraná e compararam estes resultados com aqueles estimados por Ramos *et al.* (2000b) para as toninhas do norte do Rio de Janeiro, por Danilewicz *et al.* (2000, 2004) para as toninhas do Rio Grande do Sul e por Kasuya e Brownell (1979) para os animais do Uruguai. A idade de primeira maturação (IPM) estimada para as toninhas do sul do estado de São Paulo e

norte do estado do Paraná foi maior do que a IPM estimada nas outras áreas, mas o comprimento na maturidade sexual estimado para esses animais foi o menor dentre todas as áreas estudadas. A IPM estimada para as fêmeas do Rio Grande do Sul foi significativamente maior do que a IPM estimada para as fêmeas do Uruguai (Danilewicz *et al.*, 2000), mas esse valor foi mais baixo do que aquele registrado por Corcuera (1996) para as fêmeas da Argentina. Contudo, segundo os autores, conclusões mais precisas necessitam de amostras mais recentes para a população do Uruguai e amostras mais representativas da Argentina. Os dados do Uruguai foram coletados cerca de 25-30 anos antes que os do Rio Grande do Sul e Argentina (o que corresponde a três ou quatro gerações de toninhas) e a biologia reprodutiva dos animais da região pode ter se modificado.

Uma estratégia reprodutiva distinta do padrão geral da espécie foi detectada para os animais do Rio de Janeiro. De acordo com Ramos *et al.* (2000a) os animais dessa região se reproduzem ao longo de todo o ano, enquanto nas demais regiões observa-se um padrão sazonal. As toninhas de São Paulo, norte do Paraná, Rio Grande do Sul e Uruguai têm picos de nascimento ocorrendo entre o final da primavera e final do verão austrais (Kasuya e Brownell, 1979; Harrison *et al.*, 1981; Rosas e Monteiro-Filho, 2002; Danilewicz, 2003).

Observam-se também diferenças consideráveis na composição da dieta alimentar entre os indivíduos do norte do Rio de Janeiro e Espírito Santo e as toninhas do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina (Pinedo, 1982; Ott, 1994; Perez *et al.*, 1996; Basso, 1997, 2005; Di Benedetto *et al.*, 2001; Rodriguez *et*

al., 2002). Estas últimas se alimentam essencialmente de espécies demersais, enquanto as toninhas do norte do Rio de Janeiro e Espírito Santo tendem a forragear espécies pelágicas. Entretanto, os hábitos alimentares dos indivíduos habitando as águas costeiras do Rio Grande do Sul e Uruguai, são mais similares entre si em comparação com aqueles dos indivíduos da Argentina (Perez *et al.*, 1996; Bassoi, 1997, 2005; Rodriguez *et al.*, 2002). Padrão similar foi observado na fauna endoparasitária (*e.g.* Andrade *et al.*, 2000).

Por ser uma espécie costeira, vivendo até, aproximadamente, 30 milhas náuticas da costa, a toninha é vulnerável às atividades pesqueiras, principalmente àquelas que operam com redes de emalhe (Praderi *et al.*, 1989; Ott *et al.*, 2002; Secchi *et al.*, 2003b). A intensa pressão de pesca sobre as espécies de peixes que compõem a dieta alimentar das toninhas (*e.g.* Haimovici *et al.*, 1997; Haimovici, 1998; Bassoi e Secchi, 2000) a contaminação por metais pesados e hidrocarbonetos (Lailson-Brito *et al.*, 2002; Dornelles *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2007), o descarte de resíduos plásticos que são muitas vezes ingeridos pelos indivíduos (Bassoi, 1997; Danilewicz *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2002), constituem outros tipos de ação antropogênicas com conseqüências negativas para a espécie. Mas, a maior ameaça à sobrevivência das toninhas é a captura acidental em redes de emalhe (*e.g.* Secchi *et al.*, 1997; UNEP/CMS, 2000; Bertozzi e Zerbini, 2002; Rosas *et al.*, 2002; Di Benedetto, 2003).

Há pelo menos quatro décadas, um elevado número de toninhas vem sendo capturado acidentalmente em redes de emalhe (*e.g.* Secchi *et al.*, 2003b). Avaliar o impacto dessas atividades constitui um enorme desafio, dado

que os níveis de captura variam regionalmente ao longo da distribuição da espécie. Também, o potencial de resposta das populações às capturas acidentais não é homogêneo, uma vez que elas exibem marcadas diferenças nos parâmetros vitais (e.g. Secchi, 2006; Secchi *et al.*, 2003a).

Algumas estimativas grosseiras de capturas acidentais de toninhas foram obtidas com base em informações combinadas de diferentes estudos. A captura acidental em redes de emalhe estimada para os estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro foi de cerca de 110 indivíduos/ano. De Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo, até Santa Catarina, estima-se que a mortalidade anual seja de aproximadamente 280 exemplares. Na costa do estado do Rio Grande do Sul e no Uruguai, estima-se que a mortalidade seja de aproximadamente 1000 indivíduos/ano. Na Argentina, cerca de 400 exemplares morrem anualmente (Di Benedetto, 2003; Secchi *et al.*, 2003b; Secchi *et al.*, 2004). Há evidências de que as populações nessas áreas poderão entrar em colapso se os níveis atuais de captura acidental continuarem ocorrendo (Kinas, 2002; Secchi, 2006).

As capturas acidentais em pesca têm sido apontadas como um importante fator no declínio de muitas populações da megafauna marinha (e.g. Reeves *et al.*, 2003; Lewison *et al.*, 2004; Read, 2005). Populações sujeitas às capturas acidentais podem declinar em curtos períodos de tempo, frequentemente sem detecção (Casey & Myers, 1998). O declínio excessivo das populações pode constituir um processo irreversível de alteração em todo o ecossistema. As populações não podem ser reduzidas além do ponto no qual elas deixam de ser elementos funcionais do ecossistema (Taylor, 1997). Como as diferenças

genéticas e as características adaptativas locais tendem a se acumular nas populações ao longo do tempo (Wang, 2002), a manutenção da variabilidade genética intraespecífica é necessária para permitir a continuidade do processo dinâmico da evolução, um dos principais objetivos da conservação (Waples, 1995).

Para avaliar o grau de impacto das atividades humanas e o estado de conservação das populações, é essencial definir e identificar unidades discretas de manejo para que planos de conservação específicos a cada local possam ser elaborados (e.g. Perrin *et al.*, 2003; D'Anatro & Loureiro, 2005).

Uma grande variedade de definições foi proposta para designar unidades populacionais que deveriam ser priorizadas em planos de conservação e manejadas de forma independente. O termo 'estoque', introduzido pela comunidade científica envolvida na exploração e no manejo de recursos pesqueiros, como sinônimo de população (Gauldie, 1991), vem sendo amplamente usado no manejo de mamíferos marinhos para designar grupos demograficamente independentes, que são, às vezes, chamados de unidades de manejo (Taylor, 2005). Contudo, tal conceito foi, no passado, empregado muitas vezes de maneira inconsistente. As primeiras definições de estoque forneciam poucas qualificações sobre as implicações genéticas, evolutivas e ecológicas das populações estudadas. A determinação de estoques de manejo era feita com base em interesses políticos e econômicos, carecendo de qualquer consistência biológica (Wang, 2002).

Atualmente, os tipos de informação que vêm sendo utilizadas para identificar estoques são diversos. Estudos sobre caracteres fenotípicos (*i.e.*

osteologia, morfologia e padrões de pigmentação) utilizando técnicas multivariadas foram e continuam sendo bastante empregados na identificação de estoques populacionais em diversos grupos taxonômicos (e.g. crustáceos, Saila e Flowers, 1969; Cadrin, 1995; peixes, Lee, 1971; Winans, 1987; D'Anatro & Loureiro, 2005; roedores, Lessa *et al.*, 2005 e cetáceos; Christensen *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1999; 2000b; Perrin *et al.*, 2003; Jefferson e Van Waerebeek, 2004). A grande maioria dos estudos morfométricos realizados com cetáceos utiliza, contudo, medidas de crânio e do esqueleto pós-cranial (Beasley *et al.*, 2002; Higa *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2002; Perrin *et al.*, 2003; Jefferson e Van Waerebeek, 2004). Poucos são os estudos realizados utilizando medidas de morfologia externa (Christensen *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2000b) devido à dificuldade de se obter amostras representativas para análise, bem como a de armazenar e/ou conservar tais amostras. Alguns caracteres são bastante afetados pelas modificações *postmortem* e espécimens em estágios avançados de decomposição tornam-se inutilizáveis.

Informações sobre cargas parasitárias, contaminantes, ecologia alimentar, reprodução e genética também podem prover importantes contribuições. A evidência de diferenças morfológicas ou genéticas em co-específicos indica que estas populações estão reprodutivamente isoladas. O isolamento reprodutivo é prova de isolamento demográfico (Wade e Angliss, 1997). A determinação de estoques caracterizados por baixos níveis de troca genética ou mesmo ausência de fluxo gênico, os chamados estoques biológicos assegura o primeiro passo no alcance efetivo dos objetivos da conservação.

Para Moritz (1994) dois tipos principais de unidades de manejo importantes para propósitos de conservação deveriam ser reconhecidos: Unidades Evolutivamente Significantes (*Evolutionarily Significant Unit - ESU*) e Unidades de Manejo (*Management Unit - MU*). *ESUs* estão relacionadas à estrutura histórica de uma população, à filogenia do DNA mitocondrial e, portanto, a necessidades de conservação a longo prazo. *MUs* se relacionam à estrutura atual de uma população, às frequências alélicas e a questões de manejo a curto prazo.

Waples (1991, 1995) define *ESU* como uma população ou grupo de populações com isolamento reprodutivo substancial de outras unidades co-específicas e que representa um componente importante no legado evolutivo da espécie. O autor destaca ainda a importância da adaptação das populações às condições locais, mas reconhece que definir estoques com base nos princípios da unicidade genética adaptativa não constitui tarefa fácil.

Dizon *et al.* (1992) propôs um conceito filogeográfico para definir estoques baseado num esquema de classificação hierárquico que agrega diversas outras informações pertinentes, como dados de distribuição geográfica, demografia, caracteres fenotípicos e genotípicos. Este esquema classifica as populações em quatro categorias: (I) aquelas com elevada probabilidade de serem *ESUs*, caracterizadas por separação geográfica e distâncias genéticas significantes; (II) populações que são caracterizadas por diversidade genética significativa mas com fraca separação geográfica; (III) populações com pequena diferenciação genética entre assembléias, mas separadas geograficamente e com provável isolamento reprodutivo; e (IV) populações tendo baixa

probabilidade de serem *ESUs*, caracterizadas por extensivo fluxo gênico e nenhuma separação por barreiras extrínsecas (para detalhes adicionais ver Dizon *et al.*, 1992).

Moritz (1994) reconhece que a abordagem de Dizon *et al.* é clara, mas afirmou que “...ela permanece difícil de ser empregada na prática e não reconhece os diferentes objetivos da conservação”. Ele sugere adicionalmente, que o termo estoque seja utilizado de forma restrita às questões de manejo de curto-prazo e, em relação à genética, seja tratado como sinônimo de *MUs*. Taylor (2005), apesar de não utilizar *ESU* e estoque como sinônimos, e considerar que este último constitui um nível de unidade discreta inferior a *ESU*, admite que os limites entre estoques e *ESU* são, muitas vezes, obscuros.

As informações provenientes de diversos estudos foram combinadas por Secchi *et al.* (2003a), com o objetivo de identificar unidades sobre as quais, ações de manejo de curto prazo (e.g. monitoramento das capturas acidentais, fixação de limites de captura, monitoramento de tendências demográficas) pudessem ser aplicadas prontamente. Utilizando a abordagem filogeográfica de Dizon *et al.* (1992), os autores propuseram a divisão das populações de toninhas em quatro unidades de manejo, ao longo de sua área de distribuição. Estas unidades foram denominadas *FMA*s (termo em inglês para “Áreas de Manejo da Toninha”). A *FMA* I inclui as águas costeiras dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro; a *FMA* II cobre os estados de São Paulo a Santa Catarina; a *FMA* III compreende as águas costeiras do Rio Grande do Sul e Uruguai e a *FMA* IV abrange as águas costeiras do norte da Argentina.

Embora quatro distintas áreas de manejo tenham sido propostas pelos autores, poucas são as evidências que fornecem suporte à separação entre a *FMA* III e a *FMA* IV. De fato, os próprios autores reconhecem que a divisão entre essas duas áreas é fraca, razão pela qual foram classificadas segundo o critério de Dizon *et al.* (1992) na categoria IV.

Os resultados obtidos por Ott (2002) e Lázaro *et al.* (2004) coincidem, de modo geral, com esse padrão e apontam para a ocorrência de três populações geneticamente distintas: Rio de Janeiro e Espírito Santo; São Paulo, Paraná e Santa Catarina; Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina. Segundo os autores, os níveis estimados de fluxo gênico são elevados entre populações vizinhas e tendem a decrescer à medida que as distâncias geográficas aumentam, sendo quase nulo entre a população do Rio de Janeiro e Espírito Santo e as demais.

Contudo, algumas pequenas diferenças foram observadas entre as populações da Argentina, provenientes de San Clemente e Claromecó, e aquelas do Uruguai e Rio Grande do Sul (Ott, 2002), embora os maiores níveis de diferenciação genética observados dentro desta região tenham sido cerca de dez vezes menores do que as diferenças destas populações como um todo, em relação às populações de São Paulo e Paraná. Além disso, Lázaro *et al.* (2004) encontraram heterogeneidade geográfica substancial na população amostrada em Claromecó, região localizada no sul da Província de Buenos Aires, Argentina.

Mendez *et al.* (2007), utilizando amostras de DNA mitocondrial de distintas localidades da Argentina e comparando estas com os estudos de Lázaro *et al.* (2004), encontraram evidências que suportam a presença de pelo menos duas

populações geneticamente distintas dentro da *FMA* IV: San Clemente e Claromecó.

Estes resultados sugerem que unidades menores possam ocorrer dentro da *FMA* IV e fornecem suporte para a separação da *FMA* III e IV. Contudo, estudos mais detalhados sobre as diferenças genéticas encontradas, tanto entre as populações do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina, como entre as distintas localidades dentro da *FMA* IV, fazem-se necessários. A utilização de outras abordagens, como por exemplo, estudos de morfologia externa, podem fornecer importantes contribuições para a identificação dos estoques populacionais de toninhas. Até o momento, estudos utilizando tais métodos a fim de verificar a existência de prováveis diferenças entre estes, não foram realizados. Sendo assim, este estudo pretende:

- 1) verificar a existência de variação na morfologia externa da toninha entre as áreas *FMA* I, *FMA* II, *FMA* III e *FMA* IV;

- 2) verificar se o grau de diferenciação entre os estoques putativos coincide com outras abordagens, especialmente genética.

II MATERIAIS E MÉTODOS

II. I Obtenção dos dados

Os dados utilizados neste trabalho foram obtidos através de projetos de pesquisa realizados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, Brasil, e na província de Buenos Aires, Argentina. As amostras provenientes de cada uma das quatro localidades foram classificadas como pertencendo respectivamente aos estoques *FMA I*, *FMA II*, *FMA III* e *FMA IV* propostos por Secchi *et al.* (2003a) (Figura 2.1).

Ao todo, 47 caracteres métricos externos, tomados seguindo o protocolo de (ou adaptados de) Norris (1961) (ver Anexo I), foram registrados entre as amostras para um total de 259 indivíduos. Uma lista dos exemplares disponibilizados é fornecida no Anexo II.

Para a *FMA I*, no Estado do Rio de Janeiro, 79 indivíduos provenientes de capturas acidentais em pescarias, entre outubro de 1989 e janeiro de 2001, foram disponibilizados. Trinta caracteres métricos externos foram obtidos utilizando-se uma fita métrica comercial (trena), com precisão de 0.1cm. Sete caracteres foram tomados de ambos os lados do corpo do animal. Três diferentes pesquisadores treinados realizaram a tomada das medidas. As medidas “comprimento corporal (extremidade do rostro ao entalhe da nadadeira caudal)”, “extremidade do rostro até o centro do umbigo”, “extremidade do rostro ao centro da fenda genital”, “extremidade do rostro ao centro do ânus”, “entalhe da nadadeira caudal até o centro do ânus”, “entalhe

da nadadeira caudal até o centro da fenda genital”, “entalhe da nadadeira caudal até o centro do umbigo” e “profundidade da nadadeira caudal (entalhe da caudal até a inserção desta)”, foram tomadas paralelamente ao eixo principal do corpo (projeções axiais) (ver Anexo I). As demais foram registradas de ponto-a-ponto.

Para a *FMA II*, no Estado de São Paulo, 37 exemplares coletados entre agosto de 1998 e agosto de 2006, foram disponibilizados. Trinta e um indivíduos foram originários da porção central (Praia Grande, Guarujá e Mongaguá) e 6 de Ubatuba, no litoral norte. Com exceção do exemplar BP95, que encalhou na Praia das Toninhas em Ubatuba, todos os demais indivíduos foram provenientes de captura accidental. Trinta e nove medidas morfométricas foram tomadas por dois pesquisadores treinados do Projeto Biopesca, utilizando uma fita métrica com precisão de 0.1 cm, sendo 28 medidas dorsais ou ventrais e 11 laterais, registradas apenas do lado esquerdo do corpo.

Para a *FMA III*, foram obtidas 33 medidas de 58 indivíduos provenientes do litoral sul do Estado do Rio Grande do Sul, capturados accidentalmente em atividades de pesca durante o período de setembro de 1993 a maio de 1997. As medidas foram tomadas por vários pesquisadores treinados no Laboratório de Mamíferos Marinhos do Museu Oceanográfico, utilizando fita métrica comercial, com precisão de 0.1 a 0.2 cm, sendo 22 medidas dorsais ou ventrais e 11, registradas apenas do lado esquerdo do corpo. Uma amostra adicional de 30 indivíduos proveniente do litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, obtida entre fevereiro de 2000 e dezembro de 2004 foi disponibilizada. Desta, 15 medidas morfométricas foram tomadas por vários pesquisadores treinados

no Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul, sendo que oito dessas medidas foram tomadas de ambos os lados do corpo. Para a amostra do litoral sul, além daquelas medidas já citadas para a *FMA I*, as medidas “extremidade do rostro ao centro do olho”, “extremidade do rostro ao ouvido”, “extremidade do rostro até o centro do respiradouro (ou espiráculo)”, “extremidade do rostro ao ângulo da boca”, “extremidade do rostro à inserção anterior da nadadeira peitoral”, “extremidade do rostro à inserção da nadadeira dorsal”, “rostro à extensão posterior da dorsal”, “extremidade do rostro ao ponto mais elevado da dorsal”, “altura da dorsal” e “comprimento da base da dorsal” (ver Anexo I) foram registradas paralelamente ao eixo principal do corpo (projeções axiais). As demais foram tomadas de ponto-a-ponto. Para a amostra do litoral norte, apenas as medidas “comprimento anterior da nadadeira peitoral”, “comprimento posterior da nadadeira peitoral”, “largura máxima da nadadeira peitoral” e “largura da nadadeira caudal” foram tomadas de ponto-a-ponto; as 11 medidas restantes foram registradas como projeções axiais.

Para a *FMA IV* foram disponibilizados 16 caracteres métricos externos de 55 indivíduos capturados acidentalmente em redes de pesca em San Clemente e Canal 15 e em Cabo San Antonio entre 2000 e 2005. Os caracteres métricos cedidos foram obtidos com fita métrica comercial com precisão de 0.1 cm por pesquisadores treinados do *Centro de Estudios en Ciencias Marinas*, Buenos Aires, Argentina.

II.II Triagem dos Dados

A variação intraespecífica é composta das variações espacial, sexual e ontogenética e, para que a verdadeira natureza da diferenciação espacial possa ser revelada, os efeitos dos dois últimos fatores deverão ser excluídos (Malhotra & Thorpe, 1997).

Segundo Pinedo (1991; 1995) e Ramos *et al.* (2000a; 2000b; 2002), a toninha é considerada uma espécie altamente dimórfica, com fêmeas apresentando tamanhos corporais e características morfológicas e cranianas maiores que os machos. Os prováveis efeitos da variação sexual neste estudo foram excluídos tratando-se os sexos separadamente nas análises.

Visando eliminar os efeitos da variação ontogenética dos caracteres morfológicos nas comparações inter-populacionais, apenas indivíduos adultos foram utilizados nas análises. Para as amostras do litoral do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Argentina, a informação sobre o estado reprodutivo dos exemplares disponibilizados permitiu discriminar os indivíduos adultos. Para as amostras provenientes do estado de São Paulo os adultos foram selecionados com base no comprimento corporal que atingem na maturidade sexual (Rosas & Monteiro-Filho, 2002).

Após a exclusão dos indivíduos imaturos, a amostra da Argentina contou apenas com um macho e dez fêmeas, o que não permitiu a inclusão desta em todas as análises. Portanto, a amostra proveniente da Argentina foi utilizada apenas em análises subseqüentes, para verificar a existência de variação na morfologia externa entre as populações de fêmeas das 4 regiões.

A tomada de medidas por diferentes observadores pode diminuir a acurácia das análises devido aos erros sistemáticos decorrentes do “efeito-do-observador” entre regiões (W.F. Perrin, comun. pess.). Quando se emprega amostras de diversas localidades, com as medidas obtidas por diferentes pesquisadores, o ideal é conduzir experimentos prévios de calibração entre os observadores (Beasley *et al.*, 2002; Perrin *et al.*, 2003; Jefferson & Waerebeek, 2004). Neste estudo, contudo, esta possibilidade não existe. Para minimizar as possibilidades do “efeito-do-observador”, dois procedimentos foram realizados:

1) exclusão das medidas consideradas subjetivas, *i.e.* aquelas que possibilitam diferentes interpretações entre os pesquisadores sobre a posição exata dos pontos de início e/ou fim das medidas, podendo causar importantes erros de medição;

2) emprego de um experimento de simulação, utilizando apenas os exemplares fêmeas das 4 áreas para quantificar eventuais impactos que o “efeito-do-observador” poderia estar exercendo sobre as conclusões das análises (ver secção “Análise Estatística”).

Os caracteres métricos inicialmente selecionados para as análises foram aqueles comuns a três dos quatro estoques propostos, *FMA I*, *FMA II* e *FMA III*. Foram encontrados vinte e três caracteres métricos externos comuns as três *FMAs*: (1) extremidade do rostro ao entalhe da caudal (ou comprimento corporal) (CT), (2) extremidade do rostro ao ápice do melão (R-ApM), (3) extremidade do rostro ao centro do olho (R-CO), (4) extremidade do rostro ao ouvido (R-MA), (5) extremidade do rostro ao ângulo da boca (R-AnB), (6) extremidade do rostro ao centro do respiradouro (ou espiráculo) (R-CE), (7)

extremidade do rostro até inserção da nadadeira dorsal (R-InND), (8) extremidade do rostro ao ponto mais elevado da nadadeira dorsal (R-PND), (9) extremidade do rostro até inserção da nadadeira peitoral (R-InAnNP), (10) extremidade do rostro ao centro do umbigo (R-CUmb), (11) extremidade do rostro ao centro da fenda genital (R-CFG), (12) extremidade do rostro ao centro do ânus (R-CAnus), (13) centro do olho ao ouvido (CO-MA), (14) comprimento anterior da nadadeira peitoral (CAnNP), (15) comprimento posterior da nadadeira peitoral (CPosNP), (16) largura máxima da nadadeira peitoral (LNP), (17) altura da nadadeira dorsal (AltND), (18) comprimento da base da nadadeira dorsal (CBND), (19) largura da nadadeira caudal (LNC), (20) comprimento do entalhe da nadadeira caudal (CEntNC), (21) entalhe da caudal ao centro do ânus (EntNC-CAnus), (22) entalhe da caudal ao centro da fenda genital (EntNC-CFG) e (23) entalhe da caudal ao centro do umbigo (EntNC-CUmb) (Figura 2.2 e Tabela 2.1).

As medidas EntNC-CAnus (21), EntNC-CFG (22) e EntNC-CUmb (23) foram excluídas das análises por constituírem simples diferença entre o comprimento corporal (CT) e as medidas R-CAnus (12), R-CFG (11) e R-CUmb (10), respectivamente. A medida CEntNC (20) também foi excluída devido ao grande número de exemplares registrados sem essas medidas, a maioria provenientes da amostra do estado de São Paulo.

Os exemplares CB24 (proveniente da amostra de São Paulo), CA0010, CA0017 e CA0037 (provenientes da amostra do Rio Grande do Sul) apresentaram grande quantidade de registros ausentes para as 19 medidas restantes e, portanto, foram excluídos das análises. Ao final, 68 exemplares

adultos foram utilizados, sendo 19 provenientes da *FMA I*, 19 provenientes da *FMA II* e 30 provenientes da *FMA III* (Tabela 2.2).

Após a retirada de variáveis e exemplares, restaram ainda, em cada uma das amostras, indivíduos sem valores para algumas das 19 medidas comuns. Estes foram mantidos. Também, algumas medidas apresentaram valores que foram caracterizados como '*outliers*'. Estes foram desconsiderados, e classificados como valores ausentes. Por último, para minimizar o efeito da tomada de medidas realizada por diferentes observadores, as medidas consideradas excessivamente subjetivas, R-ApM (2), R-InND (7), CO-MA (13), CAnNP (14) e CBND (18), foram excluídas.

Ao final, 14 medidas (em destaque na Figura 2.2) foram utilizadas nas análises para verificar a existência de variação entre três dos quatro estoques propostos. Os valores ausentes restantes (VAs) na matriz de dados com 14 variáveis e 68 indivíduos foram preenchidos utilizando-se conceitos de distribuição Normal multidimensional e distribuição Normal condicional (ver secção "Análise Estatística").

A fim de incluir a amostra de dez fêmeas provenientes da Argentina (*FMA IV*), análises similares àquelas realizadas para ambos os sexos das *FMA*s I, II e III, foram realizadas utilizando apenas as 43 fêmeas das 4 áreas (Tabela 2.2). Duas das medidas utilizadas nas análises anteriores foram excluídas por não terem sido registradas para os exemplares da Argentina: rosto ao meato auditivo (R-MA) e rosto ao centro do umbigo (R-CUmb) (ver Tabela 2.1).

Figura 2.1: Mapa mostrando os limites norte e sul da distribuição da toninha e as quatro *FMA*s propostas por Secchi *et al.* (2003b). RS - Rio Grande do Sul; SC – Santa Catarina; PR – Paraná; SP – São Paulo; RJ – Rio de Janeiro; ES – Espírito Santo. Extraído de Secchi *et al.* (2003b).

Figura 2.2: Desenho esquemático de uma toninha mostrando as medidas comuns as *FMA*s I, II e III, inicialmente selecionadas para as análises. As medidas em destaque foram aquelas efetivamente utilizadas. As medidas R-MA e RCUmb foram excluídas da análise que incluíram fêmeas da Argentina (ver tabela 1 e/ou texto para descrição das medidas).

Tabela 2.1: Lista das medidas morfométricas comuns as *FMA*s I, II e III.

*medidas usadas nas análises realizadas com as fêmeas

Tabela 2.2: Número de exemplares adultos de toninhas utilizados nas análises.

II. III Análise Estatística

Distribuição Normal multidimensional e distribuição Normal condicional

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o sistema estatístico *R* versão 2.2.1. Inicialmente, os caracteres escolhidos para as análises foram examinados, um a um, para verificar se seguiam uma distribuição aproximadamente Normal. Isto foi efetuado com o teste de Shapiro-Wilks acompanhado de gráficos dos quantis teóricos versus quantis empíricos (qqplot) dos resíduos (Maindonald e Braun, 2003). Se todas as variáveis individuais parecem estar Normalmente distribuídas, assume-se que a distribuição conjunta é, muito provavelmente, multivariada Normal (Manly, 1994).

Para cada um dos 14 caracteres, foram calculados a média, o desvio-padrão e os valores mínimo e máximo, por sexo, em cada uma das áreas. Uma análise da variância (ANOVA) foi realizada separadamente para cada caráter para testar a hipótese de diferenças de médias entre regiões, sexos e suas interações. O nível de significância adotado foi $p=0.05$.

A matriz de dados formada pelas 14 variáveis (caracteres) e os 68 animais apresentou 99 valores ausentes (VAs). Antes de realizar a análise de componentes principais para múltiplos grupos (MGPCA) e a análise discriminante canônica (CVA), optou-se por preencher esses VAs com estimativas. Um cálculo simples permite justificar nossa decisão. Uma matriz de dados com 68 animais e 14 variáveis consiste de 952 elementos. Os 99 elementos ausentes correspondem a 10.39% de elementos da matriz de dados. Optando-se em excluir os animais com ao menos uma medida ausente, a matriz de dados seria reduzida para 55.88% do seu tamanho original, devido à exclusão de 30 exemplares, o que representaria perda de

44.12% de informação. Desta, um percentual significativo de informação existente seria excluído (33.72%), o que poderia diminuir a acurácia das análises.

O método utilizado para o preenchimento dos VAs se fundamenta nas propriedades da distribuição Normal multivariada condicional (Chattfield & Collins, 1980). Se X é um vetor de p medidas das quais existem $q < p$ valores ausentes, então, pode-se reescrever X com dois vetores concatenados: X_1 , o sub-vetor com as q variáveis para as quais as medições estão ausentes; e X_2 o vetor com as demais $p-q$ medições que estão disponíveis. A seguinte decomposição do vetor X , e correspondente vetor de médias e matriz de covariância, pode ser utilizada:

$$X = \begin{matrix} X_1 \\ X_2 \end{matrix} \quad \text{onde } X_1 \text{ é } (q \times 1), q < p \quad \mu = \begin{matrix} \mu_1 \\ \mu_2 \end{matrix} \quad \Sigma = \begin{matrix} \Sigma_{11} & \Sigma_{12} \\ \Sigma_{21} & \Sigma_{22} \end{matrix}$$

Σ_{11} e Σ_{22} são matrizes simétricas de ordem q e $p-q$ respectivamente e $\Sigma_{12} = \Sigma_{21}^T$ é $(q \times p)$. A distribuição condicional de X_1 dado $X_2 = x_2$ é multivariada Normal com:

$$E(X_1|X_2=x_2) = \mu_1 + \Sigma_{12} \Sigma_{22}^{-1} (x_2 - \mu_2) \quad \text{Var}(X_1|X_2=x_2) = \Sigma_{11} - \Sigma_{12} \Sigma_{22}^{-1} \Sigma_{21}$$

Primeiramente, a matriz original contendo 68 exemplares e 14 variáveis foi decomposta em seis matrizes menores correspondendo aos seis grupos (tratamentos) estabelecidos: machos e fêmeas, das três diferentes áreas: *FMA*s I, II e III. Matrizes de covariância foram obtidas de cada um dos

tratamentos. A matriz de covariância residual “dentro” dos tratamentos foi obtida pela média das matrizes de covariância “dentro” de cada tratamento, ponderada pelos respectivos graus de liberdade dos tratamentos.

Os vetores das médias, calculados para cada grupo região-sexo e a matriz de covariância média “dentro” foram utilizados no passo seguinte para substituir os VAs pelas respectivas médias condicionais $E(X_1 | X_2)$. A função *subs.na.norm* (Anexo III) foi criada e implementada especificamente para fazer os cálculos e efetuar as substituições.

Para as análises realizadas apenas com exemplares fêmeas, as quais incluíram a amostra proveniente da *FMA* IV, procedimentos similares foram empregados para preencher os valores ausentes da matriz contendo 43 exemplares e 12 variáveis. Quatro grupos (tratamentos: fêmeas das *FMA*s I, II, III e IV) foram obtidos da decomposição desta matriz para a obtenção das matrizes de covariância residuais “dentro”. A matriz de covariância média “dentro” e os vetores das médias calculados para cada grupo, foram utilizados como descrito anteriormente para substituir os VAs pelas respectivas médias condicionais.

Análise de Componentes Principais para Múltiplos Grupos (MGPCA)

Nas novas matrizes com todos os valores completos, as variáveis foram padronizadas para apresentarem média igual a zero e desvio padrão igual a um. Este passo, realizado com a utilização da função *f.padron* (Anexo III) é

recomendado para se proceder numa análise de componentes principais, uma vez que a técnica é sensível a diferenças nas escalas dos caracteres (Reyment *et al.*, 1984; Manly, 1994).

Uma análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* – PCA) consiste em tomar p variáveis X_1, X_2, \dots, X_p e encontrar combinações lineares destas, denominadas “componentes principais” Z_1, Z_2, \dots, Z_p que não se correlacionam e que estão ordenadas em ordem decrescente de variâncias. Os componentes, obtidos a partir da matriz de covariância total, descrevem as variações dentro dos grupos (Manly, 1994).

Uma análise de componentes principais para grupos múltiplos (*Multiple-group Principal Component Analysis* - MGPCA) procede de maneira análoga, mas utiliza a matriz de covariância “dentro” dos grupos (Thorpe, 1988).

Uma das vantagens de uma MGPCA sobre uma PCA é sua relação direta com a análise discriminante canônica (*Canonical Variate/Discriminant Function Analysis*-CVA), a qual é frequentemente empregada em estudos evolutivos (Thorpe, 1983a). Se uma MGPCA é aplicada a um determinado conjunto de dados e uma CVA é aplicada aos escores obtidos desta MGPCA, essa fornece um resultado igual a uma CVA aplicada ao conjunto de dados originais (no nosso caso, aos dados brutos padronizados). No entanto, a vantagem do procedimento via MGPCA é que ele possibilita avaliar a contribuição relativa de cada componente para a discriminação entre grupos. Se for constatado que um grande percentual da variação total para discriminar entre grupos é dado por PC1, este componente é retirado e uma nova CVA a partir de PC2 pode ser realizada. Assim, o efeito do componente crescimento/tamanho pode ser

removido sem, no entanto, remover qualquer uma das variáveis originais (Thorpe, 1988; Malhotra & Thorpe, 1997).

Neste estudo, uma MGPCA foi realizada para descrever, primeiramente, as relações de crescimento/tamanho entre machos e fêmeas das *FMA*s I, II e III e posteriormente, as relações entre as fêmeas dentro de cada uma das quatro áreas de manejo. A função *f.mgpca* (Anexo III) permitiu desmembrar a matriz de covariância nos componentes “dentro” e “entre”, fazer o PCA pertinente e calcular os escores de cada animal em cada um dos componentes. Para isso foi necessário fornecer a matriz com todas as medidas padronizadas, agregando-se a ela as informações referentes ao sexo e às regiões para cada um dos animais.

Em seguida, para verificar se os componentes individuais diferenciam entre os sexos e as áreas, uma análise da variância (ANOVA) foi realizada, para cada um dos escores correspondentes, adotando-se como nível de significância $p= 0.05$. Após a obtenção dos escores de todos os componentes, os dados para machos e fêmeas foram separados para se proceder a uma ANOVA com um fator (região) para cada um desses componentes. Assumindo o somatório de todos os valores da estatística F como 100%, a contribuição relativa de cada um dos componentes para a discriminação entre grupos foi obtida por simples regra de três (Malhotra e Thorpe, 1997). Na análise que incluiu a amostra definida como *FMA* IV, aplicou-se o mesmo procedimento geral de análise.

Análise Discriminante Canônica (CVA)

A análise discriminante canônica é uma técnica comumente usada para examinar simultaneamente as interrelações entre grupos de populações. A primeira variável canônica é aquela combinação linear de caracteres que maximiza a razão da soma dos quadrados entre populações pela soma dos quadrados dentro das populações para uma ANOVA dos escores das variáveis canônicas resultantes. Variáveis canônicas subseqüentes satisfazem o mesmo critério, e não se correlacionam com as variáveis canônicas anteriormente criadas. Segundo Manly (1994), o número máximo de variáveis canônicas que podem ser obtidas é igual ao menor entre os números $p =$ o número de variáveis, e $(m-1)$, sendo $m =$ número de grupos. Os diferentes aspectos das relações entre as populações podem ser visualizados utilizando-se duas ou três dimensões apenas (Reyment *et al.*, 1984; Manly, 1994; Cadrin, 2000).

Para verificar a existência de variação na morfologia externa da toninha entre machos e fêmeas das *FMA I*, *FMA II* e *FMA III*, e entre as fêmeas das quatro áreas de manejo, foram realizadas CVAs, utilizando-se as mesmas matrizes de dados utilizadas para se fazer MGPCA e aplicou-se a função *lda* (*linear discriminant analysis*) da biblioteca MASS do R.

Os coeficientes dos vetores canônicos padronizados são usados freqüentemente para indicar os caracteres que mais contribuem para a separação entre populações ao longo de cada eixo. A representação dos escores individuais em gráficos bi-dimensionais, combinando-se as raízes canônicas duas a duas, fornece alguma idéia visual do grau de separação

alcançado com a análise. Alternativamente, podem-se estabelecer contornos de confiança de 95% para o valor médio dos escores de cada população (Reyment *et al.*, 1984).

Gráficos de contornos foram criados, combinando-se aos pares as três primeiras variáveis canônicas. Para isto foi necessário a criação e a implementação de funções específicas *f.plotlda* e *f.plotlda.femeas* (Anexos III). A representação gráfica das médias das populações para as três primeiras variáveis canônicas mostra as principais diferenças e similaridades entre as populações.

Efeito-do-observador: simulação de Monte Carlo

Com o objetivo de verificar se as diferenças observadas entre os centróides das variáveis discriminantes canônicas (CV1, CV2 e CV3) poderiam ser confundidas com erros sistemáticos decorrentes do “efeito-do-observador” entre regiões, um estudo simulado foi efetuado utilizando-se apenas fêmeas e as quatro regiões. Simularam-se dados com o mesmo número de animais por região como nos dados originais (N= 43).

A matriz de covariância ‘dentro’, que havia sido gerada por MGPCA foi utilizada como sendo a verdadeira matriz de covariância. Em seguida, foi calculada a média global, acrescida exclusivamente de erros sistemáticos causado por protocolos hipoteticamente diferenciados.

Para tentar representar erros sistemáticos por região, os vetores de médias para os 12 caracteres utilizados ficaram definidos como segue:

- *FMA I*: todas as medidas foram sobre-estimadas com médias 10% acima das médias correspondentes na região *FMA III*.

- *FMA II*: todas as medidas foram sub-estimadas com médias 10% abaixo das médias correspondentes na *FMA III*.

- *FMA III*: usada como referência (sem erros)

- *FMA IV*: metade das medidas sobre-estimadas em 10% e outra metade sub-estimadas em 10%.

Um total de 300 simulações de Monte Carlo foram realizadas. Em cada novo conjunto de dados simulados foi efetuada uma CVA conforme descrito anteriormente. Em seguida foram calculadas as distâncias de Mahalanobis entre os quatro centróides (distâncias I-II, I-III, I-IV, II-III, II-IV e III-IV). Finalmente, calculou-se a distância média para servir como “estatística” para descrever a distância entre os centróides. A distância média entre os centróides da análise dos dados reais foi então comparada à distribuição simulada para avaliar se a diferença efetivamente encontrada entre regiões se confundia com a distribuição das distâncias médias simuladas. Somente em caso afirmativo o “efeito-do-observador” poderia estar causando as diferenças entre regiões.

III RESULTADOS

III.I Machos e Fêmeas das *FMA*s I, II e III

III.1.1 Análises Estatísticas Univariadas

Os valores médios, o desvio-padrão, os valores mínimo e máximo obtidos para cada um dos caracteres métricos externos analisados para machos e fêmeas de três das quatro áreas de manejo propostas (*FMA*s I, II e III), bem como o número de exemplares utilizados, são fornecidos nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3. As fêmeas da *FMA* II apresentaram os menores valores médios para todos os 14 caracteres, mas nos machos a medida R-PND foi maior na *FMA* II que na *FMA* I tanto absolutamente como em relação ao comprimento corporal. Os maiores valores médios absolutos para quatro dos caracteres analisados, R-CO, R-MA, R-AnB e R-CE, foram registrados para as fêmeas da *FMA* I. Para as demais medidas analisadas, os maiores valores médios foram observados na *FMA* III. Para todas as medidas, os alcances de valores se sobrepuseram entre as *FMA*s I, II e III.

Com exceção das medidas: R-AnB, R-CE, R-InAnNP e R-CAnus (Shapiro-Wilks, $p < 0.05$), os demais caracteres, examinados individualmente, assumiram distribuições aproximadamente Normais para os resíduos (Tabela 3.4). Entretanto, uma inspeção visual da representação gráfica dos quantis teóricos versus quantis empíricos (qqplot) (Figuras 3.1) indica que o afastamento da Normalidade é leve. Ainda, a transformação para logaritmos não melhorou a distribuição. Optou-se, portanto, por manter essas variáveis nas análises subseqüentes, utilizando-as na forma não log-transformada.

As análises da variância com dois fatores para cada um dos 14 caracteres métricos externos analisados mostraram diferenças significativas entre as áreas e entre os sexos para todos os caracteres. A interação ente área e

região mostrou diferença significativa para as medidas R-MA, R-PND e CPosNP indicando que as diferenças observadas entre os sexos para estas medidas variam geograficamente (Tabela 3.4, Figuras 3.2, 3.3 e 3.4).

Tabela 3.1 Resumo das medidas morfológicas externas para os exemplares adultos do Rio de Janeiro.

Tabela 3.2 Resumo das medidas morfológicas externas para os exemplares adultos de São Paulo.

Tabela 3.3 Resumo das medidas morfológicas externas para os exemplares adultos do Rio Grande do Sul.

Tabela 3.4 Resultados da ANOVA com dois fatores e do Teste de Shapiro-Wilks, para cada um dos 14 caracteres métricos externos analisados (graus de liberdade para área: 2 e sexo: 1).

Valores de referência para o teste F: * = $P < 0.05$

Figura 3.1: Quantis teóricos versus quantis empíricos para as medidas: rostro ao ângulo da boca (R-AnB), rostro ao centro do espiráculo (R-CE), rostro a inserção da nadadeira peitoral (R-InAnNP) e rostro ao centro do ânus (R-CAnus).

Figura 3.2: Gráfico das interações dos fatores sexo e área para a medida rostro ao ouvido (R-MA),

Figura 3.3: Gráfico das interações dos fatores sexo e área para a medida rostro ao ponto mais alto da dorsal (R-PND).

Figura 3.4: Gráfico das interações dos fatores sexo e área para a medida comprimento posterior da nadadeira peitoral (CPosNP).

III.I.II Análises Estatísticas Multivariadas

Uma análise de componentes principais para grupos múltiplos (MGPCA) foi realizada em 14 caracteres métricos externos para machos e fêmeas de toninhas das *FMA*s I, II e III. As correlações estabelecidas entre os

componentes obtidos e os caracteres são apresentadas na Tabela 3.5. Os três primeiros componentes, PC1, PC2 e PC3, explicam juntos, 70.94% da variação total observada dentro dos grupos. O primeiro componente (PC1) assume correlações positivas com todos os caracteres analisados, bem como constantes de magnitude elevada, podendo ser interpretado como um índice de tamanho geral. O segundo e o terceiro componentes (PC2 e PC3) estabelecem correlações positivas com algumas variáveis e negativas com outras, bem como constantes de magnitude variada, podendo ser interpretados em termos de contrastes de alguns caracteres (*i.e.* aqueles com constantes de maior magnitude), explicando variação na forma. Ambos descrevem as características relacionadas à forma mais importantes depois de PC1, para explicar a variabilidade entre animais dentro de qualquer um dos grupos.

PC2 assume constantes de magnitude elevada para AltND, R-InAnNP e R-CE. Este componente pode ser interpretado em termos de contraste entre AltND e as outras duas medidas, uma vez que estas assumem correlações positivas e AltND, correlação negativa. O mesmo ocorre em PC3 para os caracteres R-CAnus, R-CUmb e R-AnB. Os dois primeiros caracteres assumem correlações positivas, enquanto que R-AnB apresenta correlação negativa.

O cálculo dos escores individuais obtidos para os três primeiros componentes mostra que PC1 e PC2 permitem discriminar ambos os sexos dentro das áreas e que PC1, PC2 e PC3 permitem certo grau de discriminação entre as áreas. Uma ANOVA realizada a partir desses escores aponta que a razão F obtida para PC1 é maior para a discriminação entre os sexos do que

entre as áreas, mas ambos produzem resultados significativos. O mesmo ocorre para PC2. Os escores de PC3, contudo, permitem apenas leve discriminação entre áreas (Tabela 3.6).

As fêmeas da *FMA I* e *FMA III* estabelecem escores positivos para PC1, enquanto os machos de todas as áreas assumem escores negativos. Como PC1 é o componente que representa tamanho, as diferenças observadas entre machos e fêmeas estão relacionadas a diferenças no tamanho geral do corpo, com fêmeas maiores que machos para todas as áreas. Ainda, os escores individuais das fêmeas da *FMA II* são maiores que os escores dos machos dessa mesma área, mas assumem valores negativos em sua maioria, sobrepondo-se aos valores encontrados para os machos de outras áreas. Isto sugere que fêmeas da *FMA II* apresentam tamanhos corporais menores do que as fêmeas das outras duas áreas.

Os escores de PC2 permitem evidenciar diferenças principalmente entre machos e fêmeas da *FMA III*. Fêmeas apresentam rostros mais longos, como indicado pelos escores positivos relacionados às medidas fortemente afetadas pelo comprimento côndilo-basal: R-CE e R-InAnNP. Machos apresentam nadadeiras dorsais maiores, como indicado pelos escores negativos associados à medida AltND.

PC2 e PC3 permitem determinar algumas diferenças entre as áreas, principalmente entre *FMA I* e a *FMA III*. Os resultados apontam que os animais da *FMA I* assumem escores positivos para PC2, relacionados principalmente às medidas R-InAnNP e R-CE. Isto sugere rostros mais longos nos exemplares da *FMA I* em relação aos exemplares da *FMA III*. Já as medidas relacionadas

à posição do umbigo e ânus (R-CUmb e R-CAnus), os caracteres que explicam PC3, são maiores para os indivíduos da *FMA* III do que para os exemplares das demais áreas. Os escores dos indivíduos da *FMA* II para PC3 mostram que os animais dessa área apresentam nadadeiras dorsais maiores do que os da *FMA* I, mas, de maneira geral, diferenças marcantes na morfologia que permitiriam distinguir *FMA* II de *FMA* III não foram detectadas.

As contribuições relativas de PC1, PC2 e PC3 para a discriminação entre grupos são menores do que as contribuições de outros componentes. Os três primeiros componentes contribuem mais para explicar a variação dentro dos grupos (Tabela 3.6). Enquanto, PC1 é o componente que fornece o maior percentual de contribuição para a variação total dentro dos grupos (43.01%), entre os grupos, este componente explica apenas 8.88% da variação em machos e 9.67% da variação em fêmeas. Os componentes que melhor explicam a variação entre grupos para machos são PC8, PC9 e PC12, e para as fêmeas PC4, PC10 e PC12. Estes componentes contribuem respectivamente, com 50.38% e 52.37% da variação entre grupos para machos e fêmeas. PC12 é o componente que melhor explica a variação entre grupos para machos (22.98%) e para fêmeas ele também assume um percentual elevado de contribuição (13.76%). Para a variação dentro dos grupos, contudo, sua contribuição é de 0.34%.

PC12 expressa, principalmente, relações entre as medidas R-CUmb e R-CAnus. PC9, por estabelecer correlação elevada com a medida R-AnB e R-InAnNP pode ser interpretado como um componente associado à forma/tamanho anterior do corpo, principalmente ao rosto. PC8, por sua vez,

pode ser interpretado em termos de contraste entre duas medidas relacionadas à nadadeira peitoral, CPosNP e LNP, o que permite descrevê-lo como um componente associado à forma deste apêndice.

Nas fêmeas, o componente que explica a maior parte da variação entre grupos, PC10 (22.25%), também contribui pouco para a variação dentro dos grupos (1.42%). Este componente estabelece as maiores correlações com as medidas R-CO, R-MA e R-AnB, o que permite interpretá-lo como um componente associado ao tamanho do rosto. PC4, por sua vez, pode ser explicado pelo contraste entre as medidas LNP e AltND, podendo ser definido como um componente associado à forma dos apêndices.

Tabela 3.5: Correlações entre caracteres e escores dos 14 componentes principais obtidos de uma MGPCA realizada para 14 caracteres métricos externos de toninhas provenientes de amostras de três diferentes áreas ao longo da sua região de distribuição (*FMA*s I, II e III).

Tabela 3.6: Análise da variância dos escores da MGPCA. A variância dentro dos grupos é a contribuição percentual de cada PC para a variação total dentro do grupo. A variância entre os grupos, obtida para machos e fêmeas separadamente, é a contribuição percentual de cada PC para a variação total entre grupos. Teste F obtido de uma ANOVA dos escores da MGPCA mostra como os componentes individuais discriminam entre os sexos, localidades e os efeitos da interação.

Valores de referência para o teste F: * = $P < 0.05$

Combinações lineares dos componentes que maximizam a capacidade de discriminação entre os grupos foram definidas por meio da CVA. A técnica permitiu verificar 98.97% da diferença existente entre os grupos, através da obtenção de três variáveis canônicas (CV1, CV2 e CV3) (Tabela 3.7).

As características que melhor definem a primeira variável canônica (CV1) são R-CUmb, R-CAnus e R-CFG, cujos coeficientes apresentam cargas elevadas. Porém, as cargas das duas primeiras são negativas e a restante, positiva. A segunda variável canônica (CV2) estabelece coeficientes de peso elevado e positivo com a medida R-PND e carga elevada e negativa com as medidas R-CO e R-CFG. As características que melhor definem a terceira variável (CV3) são: R-MA E R-CUmb, com coeficientes de carga elevada e positivos, e R-CFG, com carga negativa (Tabela 3.7).

Regiões de confiança de 95% estabelecidas para os escores individuais das variáveis canônicas, para cada um dos grupos, permitem dar uma idéia visual do grau de separação obtido com as três variáveis. Enquanto a combinação de CV1 e CV2 evidencia as diferenças entre os sexos, CV2 e CV3 permitem separar claramente as áreas (Figuras 3.5 e 3.6).

Na Figura 3.5, no eixo designado para CV1 (eixo x), todas as fêmeas assumem escores positivos e todos os machos escores negativos, sugerindo a ocorrência de dimorfismo sexual na forma, relacionada à distância relativa do umbigo, fendas genitais e ânus.

CV2 discrimina marcadamente a *FMA* III das demais áreas (Figuras 3.5 e 3.6). Como os indivíduos amostrados em *FMA* III apresentam escores positivos para esta variável e os exemplares amostrados nas outras duas áreas

assumem valores negativos, é provável que a nadadeira dorsal esteja deslocada posteriormente nos indivíduos da *FMA* III ou que estes apresentem a porção dorsal do corpo mais alongada em relação aos indivíduos das outras duas áreas. Em contrapartida, os animais da *FMA* I apresentam rostros mais longos que os indivíduos da *FMA* III.

CV3 permite discriminar principalmente *FMA* I de *FMA* II, mas quando combinada com CV2, diferenças entre as três áreas podem ser observadas (Figura 3.6). Os indivíduos da *FMA* I assumem escores positivos para CV3 e os da *FMA* II, escores negativos. Fica evidente que as características que distinguem as toninhas da *FMA* I das demais estão relacionadas à porção anterior do corpo e ao tamanho do rosto.

Tabela 3.7: Coeficientes das três raízes discriminantes de uma CVA. As raízes representam, respectivamente, 79.31%, 15.65% e 4.01% da variação total para machos e fêmeas analisados em conjunto.

Figura 3.5: Gráficos de contornos (95% confiança) obtidos a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV1 e CV2.

Figura 3.6: Gráficos de contornos (95% confiança) obtidos a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV2 e CV3.

III.II Fêmeas das quatro áreas de manejo propostas

III.II.I Análises Estatísticas Univariadas

Os valores médios, o desvio-padrão e os valores mínimo e máximo obtidos para cada um dos caracteres métricos externos registrados para as fêmeas da *FMA IV*, bem como o número de exemplares utilizados são fornecidos na Tabela 3.8. As fêmeas da *FMA IV* apresentaram valores médios menores que os das fêmeas da *FMA III* (Tabela 3.3), exceto para o caráter R-CE. Os valores médios registrados para as fêmeas da *FMA IV* foram próximos aos valores médios das fêmeas da *FMA I*, mas inferiores para quase todos os caracteres analisados. Apenas CT e LNC demonstraram valores médios superiores nas fêmeas da *FMA IV*. Quando comparadas com as fêmeas da *FMA II*, cinco caracteres registraram valores médios inferiores para as fêmeas da *FMA IV*: R-PND, R-CFG, R-CAnus, LNP e AltND.

Além das medidas já citadas na análise anterior, na análise realizada apenas com as fêmeas, outras duas medidas não assumiram distribuições aproximadamente Normais para os resíduos: CPosNP e LNP (Tabela 3.9). Como na análise anterior, foi observado um afastamento da Normalidade aceitável para estas medidas (qqplot) (Figura 3.7) o que permitiu manter essas variáveis nas análises subsequentes.

A análise da variância para os doze caracteres utilizados mostrou diferenças significativas entre as áreas para todos os caracteres. A distância da R-CFG, AltND e R-PND foram os caracteres analisados independentemente

que mais contribuíram para discriminar as fêmeas das quatro áreas de manejo (Tabela 3.9) .

Tabela 3.8. Resumo das medidas morfológicas externas para as fêmeas adultas da Argentina.

Tabela 3.9. Resultados da ANOVA (graus de liberdade: 3) e do Teste Shapiro-wilks, para cada um dos 12 caracteres métricos externos analisados.

Valores de referência para o teste F: * = $P < 0.05$

Figura 3.7: Quantis teóricos versus quantis empíricos obtidos na análise das fêmeas, para as medidas R-AnM: rostro ao ângulo da boca, R-BH: rostro ao centro do espiráculo, R-AnInFL: rostro à inserção da nadadeira peitoral, R-CAnus: rostro ao centro do ânus, PosFL: comprimento posterior da nadadeira peitoral e FLWd: largura máxima da nadadeira peitoral.

III.I.II Análises Estatísticas Multivariadas

As correlações dos 12 componentes obtidos a partir de uma análise de componentes principais para grupos múltiplos (MGPCA) realizada para os caracteres métricos externos utilizados na análise das fêmeas demonstram que os três primeiros componentes, PC1, PC2, e PC3, explicam juntos, 77.98% da variação total observada dentro dos grupos (Tabela 3.10). Todos os componentes explicam variação na forma.

PC1 assume correlações de elevada magnitude com a maioria dos caracteres, mas as cargas apresentam sinais diferentes. As menores correlações são estabelecidas com as medidas R-PND, CPosNP, LNP e

AltND, refletindo a pequena importância das medidas relacionadas à forma dos apêndices em definir este componente.

PC2 pode ser interpretado como um componente relacionado à forma dos apêndices, uma vez que, as maiores correlações são estabelecidas com as medidas: CPosNP, LNP, LNC e AltND, todas com sinal positivo.

As medidas CT e CPosNP estabelecem correlações de magnitude elevada com PC3, porém com cargas opostas.

A contribuição relativa de todos os PCs para a variação dentro dos grupos e entre os grupos demonstra que PC1 é o componente que fornece o maior percentual de contribuição para a variação total dentro dos grupos (46.64%), seguido por PC2 (20.09%) e PC3 (11.25%) (Tabela 3.11). Entretanto, a importância desses componentes para explicar a variação entre os grupos é reduzida quando comparada à importância de PC8, PC10 e PC12. O terceiro componente não permite discriminar entre as áreas ($F = 0.74$ $p = 0.53$) e PC1 e PC2 explicam apenas 1.70% e 4.06% da variação entre grupos, respectivamente.

Por outro lado, PC8, PC10 e PC12 contribuem juntos para explicar 66.21% da variação entre grupos. PC8 pode ser interpretado como um componente relacionado a medida AltND; PC10 relaciona-se a medida R-CE e PC12 pode ser definido em termos de contraste entre as medidas R-CFG e R-CAnus.

Os escores individuais calculados para o PC8 permitem discriminar *FMA IV* das demais áreas. Todas as fêmeas da *FMA I* estabelecem escores positivos para este componente, assim como a grande maioria das fêmeas das *FMA*s II e III, ao contrário das fêmeas da *FMA IV* que assumem escores negativos.

Estes resultados sugerem que as dorsais das fêmeas da *FMA IV* são menores do que as dorsais das fêmeas das demais áreas e que as diferenças entre *FMA I* e *FMA IV* são mais marcantes.

PC10 estabelece um padrão semelhante ao PC8 na discriminação entre as áreas. Os escores individuais das fêmeas das *FMA*s I, II e III são todos negativos para este componente, mas *FMA IV* registra valores positivos, o que mostra que a medida rostro ao centro do espiráculo é maior nos exemplares da *FMA IV*.

Os escores individuais obtidos para PC12 permitem separar as fêmeas da *FMA II* e *IV*, a primeira assumindo valores negativos e a segunda, positivos. A posição das fendas genitais em relação ao ânus deve apresentar variações significantes entre as áreas que permite diferenciá-las. Nas fêmeas da *FMA IV* a fenda genital encontra-se deslocada mais posteriormente e mais próxima ao ânus do que nas fêmeas das demais áreas.

Para maximizar a capacidade de discriminação entre as áreas foi realizada ainda uma CVA, a qual, por meio de três raízes canônicas permitiu verificar toda a variação existente entre os grupos. A contribuição percentual de CV1, CV2 e CV3 para a discriminação entre as áreas foram 67.20%, 22.19% e 10.61%, respectivamente (Tabela 3.12).

Através da representação gráfica das regiões de confiança de 95% das médias dos escores individuais é possível verificar que as diferenças entre as áreas são melhor evidenciadas quando combinamos CV2 e CV3 (Figura 3.10), mas os outros cenários também fornecem contribuições (Figuras 3.8 e 3.9).

CV1 e CV2 estabelecem coeficientes de carga elevada e positiva com o caráter R-CFG e carga elevada e negativa com o caráter R-CAnus. Contudo, estes dois caracteres apenas não bastam para definir as duas variáveis canônicas. CV1 e CV2 constituem distintas combinações lineares dos caracteres originais, ou seja, o peso de cada um dos caracteres originais para definir as variáveis é diferente e, portanto, cada uma delas explica um percentual de diferença existente entre os grupos que não é explicado pela outra.

A primeira variável canônica discrimina claramente as fêmeas da *FMA IV* das demais, mas a segunda não o faz. Os escores individuais da *FMA IV* para CV1 são todos positivos, enquanto que os indivíduos das demais áreas assumem escores negativos ou próximos de zero. Resultados similares são obtidos com PC12, o componente da MGPCA que mais contribui para discriminar entre áreas.

A segunda variável canônica permite separar as fêmeas da *FMA II* das fêmeas das demais áreas. Os exemplares desta região assumem os escores negativos mais elevados, indicando que a medida R-CFG nas fêmeas da *FMA I* e III e também da *FMA IV*, é maior do que nas fêmeas da *FMA II*. Como comentado anteriormente, outros caracteres além das medidas R-CFG e R-CAnus podem estar contribuindo para definir esta variável e tornar visível algumas diferenças entre as áreas que CV1 não evidencia. Os caracteres R-CO e R-PND contribuem com cargas positivas e valores de maior magnitude para esta variável canônica do que para CV1. Enquanto os escores individuais de *FMA I* e III para CV1 assumem valores negativos, em CV2 eles passam a

ser positivos. De fato, os valores médios de R-CO e R-PND para *FMA I* e *FMA III* são maiores do que aqueles observados em *FMA II*. Estas diferenças detectadas por CV2 sugerem que o rosto das fêmeas da *FMA II* é menor que o rosto das fêmeas das demais áreas.

A terceira variável canônica estabelece coeficientes de carga positiva e elevada com a medida R-CO e carga negativa e elevada com a medida CT. Esta variável permite evidenciar as mesmas diferenças morfológicas encontradas nas análises iniciais, com ambos os sexos e três das quatro áreas de manejo propostas. As fêmeas da *FMA I* assumem escores positivos para CV3 e as da *FMA III* escores negativos, indicando que as primeiras atingem comprimentos maiores para a medida R-CO, e conseqüentemente o rosto nesta população é mais alongado. As fêmeas da *FMA III* por sua vez, atingem os maiores comprimentos corporais. Com relação a este caráter as fêmeas da *FMA IV* assumem uma posição intermediária entre *FMA I* e *III*, o que também pode ser verificado nos valores médios absolutos do comprimento corporal para as três regiões (Tabela 3.1, 3.3 e 3.8). As fêmeas da *FMA II* são menores que as fêmeas das outras áreas.

Tabela 3.10: Correlações entre caracteres e escores para todos os 12 componentes principais obtidos de uma MGPCA realizada para 12 caracteres métricos externos de toninhas provenientes de amostras de quatro diferentes áreas ao longo da sua região de distribuição (FMA I, II, III e IV). Apenas fêmeas foram utilizadas.

Tabela 3.11. Análise da variância dos escores da MGPCA. A variância dentro dos grupos é a contribuição percentual de cada PC para a variação total dentro do grupo. A variância entre os grupos é a contribuição percentual de cada PC para a variação total entre grupos. Teste F obtido de uma ANOVA dos escores da MGPCA mostra como os componentes individuais discriminam entre as localidades.

Tabela 3.12 Coeficientes das três raízes discriminantes de uma CVA. As raízes representam, respectivamente, 67.21%, 22.19% e 10.61% da variação total, apenas para fêmeas.

Figura 3.8: Gráfico de contornos (95% confiança) obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV1 e CV2.

Figura 3.9: Gráfico de contornos (95% confiança) obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV1 e CV3.

Figura 3.10: Gráfico de contornos (95% confiança) obtido a partir das médias dos escores individuais para as variáveis canônicas CV2 e CV3.

III.1.II Simulação de Monte Carlo

A distribuição das distâncias médias de Mahalanobis entre os centróides definidos pelas três variáveis discriminantes canônicas e que foi obtida por meio de simulações de Monte Carlo, está apresentada na Figura 3.11. Os resultados mostram que a média dessa distribuição foi 3.11 com valores mínimo e máximo de 2.23 e 4.38, respectivamente. Para os dados reais de fêmeas a distância média entre os centróides observados foi igual a 7.71. Este valor é muito superior ao valor máximo encontrado na simulação, sugerindo que as diferenças efetivamente observadas entre as médias dos grupos dificilmente poderiam ser explicadas por diferenças sistemáticas causadas exclusivamente pelo fato de que as medições nas diferentes regiões tenham sido efetuadas por diferentes pesquisadores.

Figura 3.11: Distribuição de frequências das distâncias médias de Mahalanobis entre os centróides, obtidas através de 300 simulações de Monte Carlo (Sumário estatístico: Min: 2.23; 1º Q: 2.9; Mediana: 3.07; Média: 3.11; 3º Q: 3.29; Máx: 4.29).

IV DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a existência de diferenças significativas na morfologia externa de toninhas entre as populações analisadas, bem como diferenças entre os sexos.

Os escores individuais calculados para o primeiro componente indicaram valores maiores para as fêmeas do que para os machos nas três áreas que permitiram comparações entre os sexos, indicando fêmeas com tamanhos corporais maiores. A existência de fêmeas maiores que machos foi observada em estudos anteriores, para animais do Uruguai (Kasuya & Brownell, 1979), Rio Grande do Sul (Pinedo, 1995; Walter, 1997; Barreto & Rosas, 2006), Rio de Janeiro (Ramos *et al.*, 2000a; 2002) e São Paulo/Paraná (Barreto & Rosas,

2006), os quais demonstraram a ocorrência de dimorfismo sexual no tamanho para esta espécie.

As diferenças entre os sexos observadas neste estudo, com as fêmeas assumindo valores maiores do que machos para todas as medidas nas *FMA*s I, II e III corroboram outros estudos que consideram a espécie altamente dimórfica (Pinedo, 1991, 1995; Ramos *et al.*, 2000a, 2000b; 2002). Fêmeas maiores que machos são observadas também em outras espécies de pequenos cetáceos, tais como o golfinho do porto (*Phocoena phocoena*), a vaquita (*Phocoena sinus*) e os golfinhos do gênero *Cephalorhynchus* (Hohn *et al.*, 1996; Ready & Tolley, 1997; Dawson, 2002). Pinedo (1995) sugere que a pressão de seleção para fêmeas maiores do que machos em toninhas poderia contribuir para aumentar o sucesso reprodutivo da espécie, através do nascimento de filhotes maiores e, conseqüentemente, com maiores chances de sobrevivência.

O dimorfismo sexual pode ser manifestado de diversas maneiras, incluindo diferenças no tamanho e a presença de caracteres sexuais secundários (Ralls, 1977). No presente estudo, além das diferenças no tamanho geral, outras diferenças entre machos e fêmeas, relacionadas à forma corporal, puderam ser demonstradas, especialmente entre os exemplares da *FMA* III. As fêmeas dessa área apresentaram a porção anterior do corpo mais alongada, como indicado pelos escores positivos relacionados às medidas R-CE e RInAnNP. Este resultado pode estar refletindo, simplesmente, o maior tamanho do rosto. De fato, Pinedo (1995) observou que as fêmeas do Rio Grande do Sul registraram valores maiores para as medidas: comprimento corporal,

tamanho do rosto e distância entre o espiráculo até a base da nadadeira dorsal.

Por outro lado, os machos da *FMA* III apresentaram nadadeiras dorsais maiores, como indicado pelos escores negativos associados à medida AltND. Machos de diversas outras espécies de odontocetos apresentam dorsais maiores (i.e. mais altas) do que fêmeas: *Orcinus orca* (Ford *et al.*, 2000), *Phocoena dioptrica* (Goodall & Schiavini, 1995), golfinhos-rotadores do Pacífico Tropical Leste (Perrin, 1991). Entretanto, as diferenças entre as dorsais de machos e fêmeas de toninhas observadas neste estudo não são tão marcadas como as diferenças observadas nessas espécies, o que pode estar relacionado aos distintos sistemas de acasalamento empregado por ela (Danilewicz *et al.*, 2004).

Os exemplares da *FMA* I apresentaram um padrão similar aquele observado na *FMA* III, mas as diferenças entre machos e fêmeas não foram tão evidentes, principalmente no que se refere à altura da nadadeira dorsal. As diferenças morfológicas detectadas entre machos e fêmeas da *FMA* II foram mínimas, como demonstrado pela grande sobreposição das regiões de confiança das médias dos escores individuais dos exemplares machos e fêmeas dessa região, utilizando-se a segunda e a terceira variáveis canônicas (Figura 3.6).

Contudo, o dimorfismo sexual na forma ficou evidenciado para todas as áreas com a representação gráfica das regiões de confiança das médias dos escores individuais, utilizando-se a primeira e a segunda variáveis canônicas (Figura 3.5). A posição relativa do umbigo, fendas genitais e ânus foram as

características que permitiram distinguir marcadamente os sexos. Contudo, o dimorfismo sexual observado no posicionamento da fenda genital, mais próxima ao ânus em fêmeas, é uma característica comum dos cetáceos (Perrin,1975).

Diferenças no tamanho geral dos indivíduos entre as áreas também puderam ser verificadas através da variação descrita pelo primeiro componente. Enquanto as fêmeas das *FMA*s I e III apresentaram escores positivos, as fêmeas da *FMA* II assumiram escores negativos, sugerindo que estas são menores que os exemplares das *FMA*s I e III. O mesmo foi observado para os machos das três áreas de manejo, onde os indivíduos da *FMA* II apresentaram escores menores que os exemplares das outras áreas. Estes resultados concordam com Rosas (2000), que após observar os menores tamanhos corporais para os exemplares da *FMA* II comparada às demais áreas, afirmou que a variação existente na espécie não é clinal.

A variação descrita pelo segundo e terceiro componentes principais permitiu evidenciar diferenças morfológicas associadas à forma entre as áreas geográficas.

Os resultados apontaram que os indivíduos da *FMA* III tendem a apresentar nadadeiras dorsais mais altas do que *FMA* I e porção médio-posterior do corpo mais alongada que os indivíduos das demais áreas. Os indivíduos da *FMA* I por sua vez, tendem a apresentar rostros mais longos que os indivíduos das demais áreas.

Resultados similares aqueles observados com os escores da MGPCA, foram encontrados com CVA, combinando-se a segunda e terceira variáveis

canônicas. A representação gráfica das regiões de confiança dos escores individuais para cada um dos grupos permitiu distinguir claramente *FMA I* e *FMA III*. Apesar de diferenças morfológicas terem sido detectadas para a *FMA II*, nenhuma interpretação biológica das diferenças encontradas pôde ser estabelecida até o momento (Figura 3.6). Os resultados indicaram diferenças morfológicas relacionadas à posição das nadadeiras dorsais, mais deslocadas para a região posterior nos indivíduos da *FMA III* comparado aos indivíduos da *FMA I*, e rostros mais longos nos animais da *FMA I*.

Variações nas dimensões anteriores do corpo fortemente afetadas pelo comprimento côndilo-basal (Perrin, 1975a), podem estar relacionadas a modificações ligadas ao aparato bucal/hábitos alimentares. De fato, as medidas R-CO e R-MA contribuem para explicar a segunda e terceira variáveis canônicas. Além disso, PC9 e PC10, alguns dos componentes principais que melhor discriminam as áreas para machos e fêmeas, respectivamente, são definidos pelas medidas R-AnB, R-InAnNP, R-CO e R-MA. Estas diferenças poderiam indicar que as toninhas das diferentes áreas exibem diferenças morfológicas relacionadas aos distintos hábitos alimentares. Esta afirmação é corroborada por estudos de dieta alimentar. Segundo tais estudos, a composição da dieta alimentar dos indivíduos que compõem o estoque do Rio de Janeiro/ Espírito Santo (*FMA I*) é consideravelmente diferente daquela dos animais do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina. As toninhas na parte sul da distribuição da espécie se alimentam essencialmente de espécies demersais (Fitch & Brownell, 1971; Bassoi, 1997, 2005; Rodriguez *et al.*, 2002), enquanto as toninhas do Rio de Janeiro tendem a forragear sobre espécies

pelágicas (Di Benedetto & Ramos, 2001). As diferenças morfológicas relacionadas às dimensões anteriores do corpo detectadas neste estudo discriminaram, principalmente, *FMA I* e *FMA III*.

Diferenças morfológicas entre as fêmeas da *FMA IV* e as fêmeas das demais áreas também foram encontradas neste estudo (Figuras 3.8, 3.9, 3.10), fornecendo evidências para considerar a população da Argentina um estoque distinto das populações do Rio Grande do Sul e Uruguai, conforme proposto anteriormente por Secchi *et al.* (2003a).

No que se refere à extensão das medidas anteriores do corpo associadas ao comprimento côndilo-basal, e ao comprimento corporal, as fêmeas da *FMA IV* parecem apresentar valores intermediários entre *FMA I* e *FMA III*. Embora os valores médios absolutos para as medidas associadas ao comprimento côndilo-basal (com exceção da medida R-CE) nas fêmeas da *FMA IV* sejam próximas às da *FMA III* e inferiores às da *FMA I*, a representação gráfica das regiões de confiança das médias dos escores individuais para CV2 mostra maior semelhança entre *FMA IV* e *FMA I* (Figura 3.10). Esta diferença pode ser explicada pelo caráter R-PND, o qual também influencia CV2. Esta medida por sua vez, aponta diferenças na posição da nadadeira dorsal entre as quatro áreas de manejo, com as fêmeas da *FMA III* apresentando dorsais deslocadas mais posteriormente, seguidas pelas fêmeas das *FMA*s I, IV e II.

A utilização conjunta de distintas abordagens na identificação de unidades discretas abre caminho para discussões acerca do *status* taxonômico das mesmas. Os participantes do Workshop realizado em La Jolla, Califórnia

(2004) para discutir as limitações na Taxonomia de Cetáceos em relação ‘as necessidades de conservação e manejo, afirmaram que ambos dados morfológicos e genéticos poderiam servir de evidência para o isolamento reprodutivo e a divergência irreversível. Quando distintas linhas de evidência asseguram divergência congruente, estes fornecem grande suporte para a designação de espécies. A larga aceitação de espécies separadas dentro do gênero *Delphinus* (*D. delphis* & *D. capensis*) foi baseada em separação morfológica e molecular congruente (Heyning & Perrin, 1994; Rosel *et al.*, 1994).

Wang *et al.* (2000a, 2000b) encontraram diferenças osteológicas e morfológicas entre duas formas simpátricas de golfinhos nariz-de-garrafa das águas da China, sugerindo que estas são reprodutivamente isoladas. Essas diferenças concordaram com as diferenças genéticas encontradas através de análises de DNA mitocondrial (Wang *et al.*, 1999). Segundo os autores, os resultados congruentes desses estudos e a ocorrência simpátrica são evidências mais do que suficientes para definir as duas formas como duas espécies distintas: *Tursiops truncatus* e *Tursiops aduncus*.

As duas espécies distintas de *Orcaella* (*O. brevirostris* & *O. heinsohni*), de ocorrência alopátrica, na Ásia e norte da Austrália (Beasley *et al.*, 2005) também foram definidas com base em diferenças encontradas entre as populações das duas localidades, utilizando diferentes abordagens: craniometria, morfologia externa, análises de DNA mitocondrial e citocromo B.

Sob esse aspecto a área de manejo designada como *FMA I* poderia ser considerada uma espécie distinta, dado que as diferenças morfológicas aqui

encontradas, as diferenças craniométricas (Pinedo, 1991; Ramos *et al.*, 2002) e as diferenças genéticas (Secchi, 1998; Ott, 2002; Lázaro *et al.*, 2004) suportam esta afirmação. Contudo, é necessário cautela. Embora o isolamento reprodutivo seja considerado um importante critério na definição de espécies segundo o conceito biológico (Mayr, 2000), alguns autores discutem a relevância do processo para a especiação em populações alopátricas (Martin, 1996), pela dificuldade em se detectar o isolamento reprodutivo em populações separadas geograficamente (Milinkovitch *et al.*, 2001). Helbig *et al.* (2002) afirmaram que a avaliação do status específico para populações alopátricas deveria ser baseada em hipóteses, as quais poderiam ser difíceis, se não impossíveis de serem testadas.

Awise *et al.*, (1998) e Awise (2000) consideram, além do isolamento reprodutivo, o tempo de divergência genético necessário para as unidades estabelecerem trajetórias evolutivas independentes, fundamental para se definir espécies distintas (conceito filogenético). Segundo os autores, estudos utilizando DNA mitocondrial de diversos grupos de espécies irmãs de mamíferos mostraram que o tempo evolutivo médio associado às sequências de divergência necessárias para o processo de especiação é de cerca de 2.2 milhões de anos.

Assim, para evitar equívocos quanto à definição de novas espécies, o ideal é que o grau de divergência genética necessário para poder defini-la como uma nova espécie seja conhecido, e que as diferenças morfológicas e genéticas congruentes sejam obtidas a partir das mesmas amostras.

Baker *et al.* (2002), estudando as populações de golfinhos de Hector da Nova Zelândia, encontraram diferenças craniométricas e genéticas congruentes entre a população da Ilha Norte e as populações da Ilha Sul, além de ausência de fluxo gênico. Entretanto, eles sugerem que a população da Ilha Norte seja reconhecida como uma subespécie distinta das demais e não como uma espécie, uma vez que elas se separaram recentemente em suas trajetórias evolutivas, o que foi confirmado pelo pequeno tempo de divergência estimado entre elas, 15000-16000 anos, baseado na última abertura do Estreito de Cook (Pichler *et al.*, 2001). Segundo Baker *et al.* (2002), a população da Ilha Norte se encontra em vias de especiação.

O termo subespécie é difícil de ser definido, porque a opinião na comunidade científica quanto à sua utilidade varia enormemente. O termo não tem validade biológica mas, independente das controvérsias, seu emprego pode ser relevante na política de gestão e, portanto, para a biologia e conservação das espécies. A utilização da nomenclatura trinomial pode contribuir para uma distribuição mais eficiente de recursos àquelas áreas que merecem atenção prioritária.

Segundo Perrin (2002), variantes geográficas dentro de uma mesma espécie são muitas vezes reconhecidas como subespécies. Algumas definições de subespécie, especificamente aquelas que citam como critério a necessidade de uma população estar numa trajetória evolutiva independente, são pouco diferentes de alguns conceitos de Unidades Evolutivamente Significantes (*ESUs*). Na realidade, os limites para se estabelecer uma distinção entre subespécies e *ESUs* não são claros. A diferença mais provável

entre estes termos está relacionada ao nível de troca genética. Waples (1991) aponta que linhagens de *ESUs* separadas são largamente independentes embora algum nível de troca genética possa ocorrer. Sob esse contexto, subespécie seria algo entre espécie e *ESU*.

Das quatro áreas de manejo para toninhas propostas por Secchi *et al.* (2003a), *FMA I*, *FMA II* e *FMA III*, foram classificadas como populações do Tipo II-/abcd, conforme os critérios de Dizon *et al.* (1992), e por isso, teriam uma grande probabilidade de representarem *ESUs* distintas. A *FMA IV* contudo, definida para designar a população da Argentina, teria baixa probabilidade de representar uma *ESU* distinta, em decorrência das fracas evidências encontradas para separar esta população das populações do Uruguai e Rio Grande do Sul.

Segundo os critérios propostos por Moritz (1994) para a determinação de *ESUs*, nenhuma das áreas de manejo propostas poderia ser considerada uma *ESU* distinta. Apesar de diferenças significativas terem sido encontradas nas frequências alélicas dos loci nucleares entre toninhas do Rio de Janeiro, São Paulo/Paraná e Rio Grande do Sul/Uruguai/Argentina, a reconstrução filogenética dos haplótipos não revelou a existência de uma monofilia recíproca entre as populações (Ott, 2002; Lázaro *et al.*, 2004).

Contudo, é importante destacar que o critério da monofilia recíproca do DNA mitocondrial para se definir distintas *ESUs* é considerado por muitos autores como um critério restritivo demais para fins de manejo. Possivelmente, poucas populações de cetáceos apresentariam esta característica. Baker & Palumbi (1997) destacaram, por exemplo, que mesmo as populações de

baleias jubartes (*Megaptera novaeangliae*) distribuídas em distintas bacias oceânicas não seriam classificadas como distintas *ESUs* segundo os critérios de Moritz (1994).

Segundo os aspectos ecológicos e genéticos destacados por Waples (1991), a ocorrência de haplótipos únicos na população do Rio de Janeiro não compartilhados com as demais populações e o fluxo gênico quase inexistente, os distintos hábitos alimentares, a existência de um padrão reprodutivo distinto para a espécie nessa região, as diferenças nos parâmetros demográficos e de crescimento e as indicações de um isolamento geográfico (Secchi *et al.*, 1998; Di Benedetto & Ramos, 2001; Siciliano, 2002; Ott, 2002), constituem evidências que asseguram à *FMA I* o *status* de uma *ESU* distinta.

As toninhas da *FMA I* poderiam ainda ser consideradas uma subespécie distinta das toninhas das demais áreas, considerando os mesmos critérios utilizados por Baker *et al.* (2002), isto é, linhas de evidência morfológica e genética congruentes e tempo de divergência relativamente curto para a ocorrência de um evento de especiação. A análise filogenética dos haplótipos realizada por Lázaro *et al.* (2004) indicou que um dos haplótipos encontrados para a população do Rio de Janeiro encontra-se mais proximamente relacionado aos haplótipos encontrados para as populações do sul do que com aqueles das populações do Rio de Janeiro, sugerindo que essas populações se divergiram recentemente em suas trajetórias evolutivas.

Com relação às populações do sul, Ott (2002) observou uma grande similaridade genética entre as populações da Argentina, Uruguai, Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina, sugerindo a existência de uma grande e

provavelmente única população para esta área. Algumas pequenas diferenças foram observadas entre as populações da Argentina e aquelas do Uruguai e Rio Grande do Sul, mas os maiores níveis de diferenciação genética observados dentro desta região foram cerca de dez vezes menores do que as diferenças destas populações como um todo, em relação às populações de São Paulo e Paraná.

Lázaro *et al.* (2004) não encontraram haplótipos comuns entre os exemplares do Rio de Janeiro e os exemplares amostrados ao longo da parte sul de distribuição da espécie, mas entre as populações do sul (Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina), encontraram níveis substanciais de fluxo gênico. Os autores propuseram um modelo de isolamento por distância para explicar a diferenciação genética da espécie. Os níveis estimados de fluxo gênico, elevados entre populações vizinhas, tendem a decrescer à medida que as distâncias geográficas aumentam.

É importante ressaltar aqui que no estudo de Lázaro *et al.* (2004), os autores encontraram heterogeneidade geográfica substancial na população amostrada na Argentina. Contudo, a amostra utilizada em tal estudo foi proveniente de Claromecó, região localizada no sul da Província de Buenos Aires. Os autores não utilizaram amostras do norte, mas de acordo com o modelo de isolamento por distância proposto por eles, estas populações seriam menos distintas das populações do Uruguai e sul do Rio Grande do Sul, devido ao fluxo gênico significativo entre elas. Contudo, Perrin (2002) afirma que as populações podem divergir marcadamente na forma mesmo na presença de substancial fluxo gênico, se a seleção diferencial do habitat é forte o suficiente.

Os resultados encontrados por Ott (2002) e Lázaro *et al.* (2004) não suportam a separação das populações da Argentina, Uruguai e Rio Grande do Sul em duas distintas áreas de manejo, daí a classificação na categoria IV adotada por Secchi *et al.* (2003a) para separar ambas as populações. Contudo, os resultados aqui encontrados constituem uma evidência morfológica que suporta em parte a separação das *FMA*s IV e III como distintas áreas de manejo. Os exemplares amostrados em San Clemente e Cabo San Antonio, norte de Buenos Aires, são morfológicamente diferentes daqueles da *FMA* III e mais similares aos indivíduos da *FMA* I em termos de comprimento corporal e das medidas associadas à porção anterior do corpo (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8).

Mendez *et al.* (2007), utilizando amostras de DNA mitocondrial de distintas localidades da Argentina e comparando estas com os estudos de Lázaro *et al.* (2004), encontraram evidências que suportam a presença de pelo menos duas populações geneticamente distintas dentro da *FMA* IV: San Clemente e Claromecó. De fato, Ott (2002) observou pequenas diferenças genéticas em comparações de populações da Argentina, provenientes de San Clemente e Claromecó, com populações do Uruguai e do Rio Grande do Sul.

A população do norte de Buenos Aires constitui a população mais isolada da Argentina e esta afirmação suporta as diferenças morfológicas aqui encontradas. Adicionalmente, os resultados do estudo de Mendez *et al.* (2007) contrariam o modelo de isolamento por distância proposto por Lázaro *et al.* (2004), considerando comparações entre locais contíguos de amostragem.

Cabe ressaltar aqui que tanto os exemplares da Argentina utilizados neste estudo como a maior parte das amostras utilizadas nas análises de

Mendez *et al.* (2007) foram de indivíduos capturados acidentalmente em águas estuarinas do Rio da Prata (Baía Sanboronbom). Se as amostras utilizadas pelos autores tivessem sido oriundas de águas mais afastadas do estuário, os resultados genéticos possivelmente seriam semelhantes àqueles encontrados por Ott (2002) e Lázaro *et al.* (2004).

A diferenciação morfológica encontrada neste estudo e as diferenças genéticas encontradas por Mendez *et al.*, (2007), entre as populações da Argentina e as demais populações, poderiam estar refletindo uma possível separação ecológica da espécie, como sugerida por alguns pesquisadores (Aznar *et al.*, 1994;1995). Tal segregação poderia estar relacionada à utilização de diferentes recursos alimentares. Semelhanças foram encontradas na dieta alimentar das populações habitando as áreas do Rio Grande do Sul e Uruguai, mas não entre estas e aqueles indivíduos habitando as águas da Argentina (Fitch & Brownell, 1971; Pinedo, 1982; Ott, 1994; Basso, 1997, 2005; Rodriguez *et al.*, 2002). Adicionalmente, Aznar *et al.* (1995) e Andrade *et al.* (2000) demonstraram que os níveis de infecção parasitária das toninhas amostradas no Rio Grande do Sul e no Uruguai são significativamente distintos daqueles da Argentina.

Como as características do habitat e os hábitos alimentares variam entre as regiões é provável que a variação morfológica observada entre as distintas áreas da distribuição das toninhas tenha sido condicionada por pressões seletivas diferenciais para a ocupação de nicho. Evidências ecológicas e comportamentais suportam essa afirmação.

As diferenças morfológicas aqui observadas dificilmente podem ser explicadas por diferenças sistemáticas causadas exclusivamente pelo efeito-do-observador. As simulações de Monte Carlo mostraram que a distância euclidiana média entre os centróides das quatro áreas quando erros sistemáticos superdimensionados (10%) são acrescentados, foi menor que a distância média para os dados reais das fêmeas. Contudo, o efeito-do-observador não deve ser inteiramente descartado. Um pequeno percentual das diferenças observadas deve ser atribuído ao fato de que as medições nas diferentes regiões foram efetuadas por diferentes pesquisadores. Estas diferenças, entretanto, não alteram significativamente as conclusões por serem pequenas quando comparadas com as variações entre unidades. Contudo, para aumentar a acurácia dos resultados em futuros trabalhos de campo de forma a excluir o efeito-do-observador, é recomendável realizar experimentos prévios de calibração.

Ainda, para que os efeitos da estocasticidade sejam reduzidos é recomendável, que maiores tamanhos de amostra, por sexo e região, sejam utilizados em estudos futuros.

Enfim, o grau de diferenciação morfológica observado entre as populações amostradas neste estudo, concorda com alguns dos resultados dos estudos genéticos e fornece suporte adicional para a separação das *FMA I*, *FMA II*, *FMA III* e pelo menos parte da *FMA IV*. As populações dessas áreas, por representarem entidades demográficas distintas, devem ser manejadas de forma independente, a fim de garantir a manutenção da variabilidade genética dentro da espécie.

V. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a existência de variação na morfologia externa de toninhas entre as diferentes áreas amostradas e entre os sexos.

A CVA permite discriminar claramente os grupos quando são analisados machos e fêmeas das *FMA*s I, II e III e apenas fêmeas das quatro *FMA*s.

As fêmeas apresentaram tamanhos corporais maiores que os machos e a característica que melhor permitiu distinguir machos e fêmeas, além do tamanho corporal, foi a posição relativa do umbigo, fenda genital e ânus.

A variação morfológica entre machos e fêmeas foi menor na *FMA* II.

Os exemplares da *FMA* II apresentaram tamanhos corporais menores que os exemplares das demais áreas.

Diferenças relacionadas à posição da nadadeira dorsal e ao comprimento do rostro contribuem para separar, principalmente, *FMA I* e *FMA III*. Nos exemplares da *FMA III* as dorsais estão deslocadas posteriormente. Os indivíduos da *FMA I* têm rostros mais longos.

As fêmeas da *FMA IV* são mais semelhantes morfológicamente às fêmeas da *FMA I*, no que se refere à extensão das medidas anteriores do corpo associadas ao comprimento cômulo-basal, e ao comprimento corporal.

As diferenças morfológicas aqui observadas entre as fêmeas da Argentina e as demais áreas concordam com os resultados obtidos por Mendez *et al.* (2007) e apontam para a separação das populações de toninhas da *FMA III* e parte da *FMA IV* em dois distintos estoques para fins de manejo tal como proposto por Secchi *et al.*, (2003a).

As diferenças observadas constituem, portanto suporte adicional à designação proposta de distintas áreas de manejo para toninhas (*FMA I*, *FMA II*, *FMA III* e *FMA IV*).

LITERATURA CITADA

- ANDRADE ALV, MC PINEDO & JJ PEREIRA. 2000. As franciscanas do Sul do Brasil, Uruguai e Argentina constituem distintos estoques? *J. Cet. Res. Manage.*
- AVISE, JC, D WALKER, GC JOHNS. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265: 1707-1712.
- AVISE, JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. London, Harvard University Press. 447p.
- AZNAR, FJ, JA BALBUENA & JA RAGA. 1994. Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian waters. *Can. J. Zool.*, 72(4):702-706.
- AZNAR, FJ, JA RAGA, J CORCUERA & F MONZON. 1995. Helminths as biological tags for franciscanas *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mamm.*, 59(3):427- 435.
- BAKER, SC & SR PALUMBI. 1997. The genetic structure of whales populations: implications for management. *In: Dizon, A.E., Chivers, S.J., Perrin, W.F. (Eds). Mol. Gen. Mar. Mamm., Special Publication*, 3:117-146.
- BAKER, AL, ANH SMITH & FB PICHLER. 2002. Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. *Journal of The Royal Society of New Zealand*, 32(4):713-727.
- BARRETO, AS & FCW ROSAS, 2006. Comparative growth analysis of two populations of *Pontoporia blainvillei* on the Brazilian coast. *Mar. Mamm. Sci.* 22(3): 644-653.

- BASSOI, M. 1997. Avaliação da dieta das toninhas, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844), capturadas acidentalmente na pesca costeira de emalhe no sul do Rio Grande do Sul. *Monografia de Bacharelado*. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil. 68 p.
- BASSOI, M. 2005. Feeding ecology of franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae), and oceanographic processes on the Southern Brazilian coast. *Tese de Doutorado*, Universidade de Southampton, UK.
- BASSOI, M & ER SECCHI. 2000. Temporal variation in the diet of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, as a consequence of fish stocks depletion off southern Brazil. *In: 4º Workshop sobre Pesquisa e Conservação da Franciscana, Pontoporia blainvillei*, no Atlântico Sul Ocidental, Porto Alegre.
- BERTOZZI, C & AN ZERBINI. 2002. Incidental mortality of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, Brazil. *The Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, special issue, 1:153-160.
- BEASLEY, I, P ARNOLD & G HEINSOHN. 2002. Geographic variation in skull morphology of the Irawaday dolphin, *Orcaella brevirostris* (Owen in Gray, 1866). *Raff. Bull. Zool.*, 10:3-14.
- BEASLEY, I, KM, ROBERTSON & P ARNOLD. 2005. Description of a new dolphin, the Australian snubfin dolphin *Orcaella heinsohni* sp n (Cetacea, Delphinidae). *Mar. Mamm. Sci.*, 21(3):365-400.
- CADRIN, SX. 1995. Discrimination of American lobster (*Homarus americanus*) stocks off southern New England on the basis of secondary sex character allometry. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 52, 2712-2723.
- CADRIN, S. 2000. Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 91-112.
- CASEY, JM & MA MYERS. 1998. Near extinction of a large, widely distributed fish. *Science*, 281: 690-692.
- CASTELLO, HP, M JUNIN, F ROTMAN & GC SARTÍ. 2000. Análisis de Contaminantes Organoclorados y metales Pesados en Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, de Argentina y Brasil. *In UNEP/ CMS (Eds) Registro do Terceiro Workshop sobre Pesquisa e Conservação da Franciscana no Atlântico Sul*. 46-50.
- CHATTFIELD, C. & AJ COLLINS. 1980. Introduction to Multivariate Analysis. Chapman & Hall, 246p.
- CHRISTENSEN, I, T HAUG & O WIIG. 1990. Morphometric comparison of minke whales *Balaenoptera acutorostrata* from different areas of the North Atlantic. *Mar. Mamm. Sci.*, 6(4): 327-338.
- CORCUERA, J. 1996. Edad de madurez sexual de delfin franciscana en el sur de la provincia de Buenos Aires – Argentina. Resumos da VII Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América de Sur, 22-25 October, Viña del Mar, Chile, p39.
- CRESPO, EA, G HARRIS & R GONZALES. 1998. Group size and distributional range of franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Mar. Mam. Sci.*, 14(4):845-849.
- D'ANATRO, A & M LOUREIRO. 2005. Geographic variation in *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz-Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *J. Fish Biol.*, 67, 849-865.
- DANILEWICZ, DS, ER SECCHI, PH OTT, IB MORENO & M BASSOI. 2000. Habitat use patterns in Rio Grande do Sul, southern Brazil, indicated by incidental catch

- and beach survey data. Registro técnico WP07 apresentado no IV Workshop para a Coordenação da Pesquisa e Conservação da Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, no Atlântico Sul Ocidental, 05-09 Novembro 2000, Porto Alegre.
- DANILEWICZ, D, FCW ROSAS, R BASTIDA, J MARIGO, M MUELBERT, D RODRIGUEZ, J LAILSON-BRITO JR, V RUOPPOLO R MA RAMOS M BASSOI, PH OTT, G CAON, AM ROCHA, JL CATÃO-DIAS & ER SECCHI. 2002. Report of the Working Group on Biology and Ecology. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, special Issue, 1:25-42.
- DANILEWICZ, D. 2003. Reproduction of female franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, 2 (2):67-78.
- DANILEWICZ, D; JA CLAVER; ALP CARRERA; ER SECCHI & NF FONTOURA. 2004. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia:Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Fish. Bull.* 102:581–592
- DAWSON, S. M. 2002. Cephalorhynchus dolphins *Cephalorhynchus heavisidii*, *C. eutropia*, *C. hectori* and *C. commersonii*. In: Perrin, WF, B Wursig and JGM Thewissen (Eds). Encyclopedia of marine mammals. Academic Press. 200-203.
- DI BENEDITTO, APM & RMA RAMOS, 2001. Biology and conservation of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the north of Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Cetacean Res. Manage.*, 3(2):185–192.
- DI BENEDITTO, APM. 2003. Interactions between gillnet fisheries and small cetaceans in northern Rio de Janeiro, Brazil: 2001-2002. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, 2(2): 79-86.
- DIZON, AE, C LOCKYER, WF PERRIN, DP DEMASTER & J SEISSON. 1992. Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. *Conserv. Biol.*, 6: 24-36.
- DORNELES, PR, JL BRITO JR, ER SECCHI, M BASSOI, CPC LOZINSKY, JPM TORRES & O MALM. 2007. Cadmium concentrations in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from south brazilian coast. *Braz. J. Ocean.*, 53:179-186.
- FITCH, JE & RL BROWNELL JR. 1971. Food habits of the franciscana *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Platanistidae) from South America. *Bull. Mar. Sci.*, 21 (2): 626-636.
- FORD, JKB, GM ELLIS, & KC BALCOMB. 2000. Killer whales, 2^a Edição. Vancouver: UBC Press.
- GAULDIE, RW. 1991. Taking stock of genetic concepts in fisheries management. *Can. J. Fish. Aqua Sci.*, 48:722-731.
- GOODALL, NRP & ACM SCHIAVINI. 1995. On the biology of the spectacled porpoise, *Australophocaena dioptrica*. *Int. Whal. Commn.*, Volume Especial (16):411- 453.
- HAIMOVICI, M, JP CASTELLO & CM VOOREN. 1997. Fisheries. In: Seeliger, U, C Odebrecht & JP Castello (Eds). Subtropical Convergence Environments – the coasts and sea in the southwestern Atlantic. Springer-Verlag, Berlin. 184-196.
- HAIMOVICI, M. 1998. Present state and perspectives for the southern Brazil shelf demersal fisheries. *Fish. Manage. Ecol.*, 5: 227-289.
- HARRISON, RJ, MM BRYDEN, DA Mc BREARLY & RL BROWNELL JR. 1981. The ovaries and reproduction in *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Platanistidae). *J. Zool.* 193:563–580.

- HELBIG, J, AG KNOX, DT PARKIN, G SANGSTER & M COLLINSON. 2002. Guidelines for assigning species rank. *Ibis*, 144(5):18-525.
- HEYNING, JE and WF PERRIN. 1994. Evidence for two species of common dolphins (genus *Delphinus*) from the eastern North Pacific. Natural History Museum of Los Angeles County, *Contr. Sci.*, 442:35 pp.
- HIGA, A, E HINGST-ZAHER & M DE VIVO. 2002. Size and shape variability in the skull of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) from de Brazillian Coast. *The Latim America Journal of Aquatic Mammals*, special issue, 1:145-152.
- HOHN, AA, RJ READ, S FERNANDEZ, O VIDAL & LT FINDLEY. 1996. Life history of the vaquita, *Phocoena sinus* (Phocoenidae, Cetacea). *J. Zool., Lond.*, 239: 235-251.
- JEFFERSON, TA & K. VAN WAEREBEEK, 2004. Geographic variation in skull morphology of humpback dolphins (*Souza* spp). *Aquatic Mammals*, 30(1): 3-17.
- KASUYA, T & RL BROWNELL. 1979. Age dertermination, reproduction and growth of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Sci. Rep. Whales Res. Inst.*, Tokio, 31:45-67.
- KINAS, PG. 2002. The impact of incidental kills by gill nets on the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in Southern Brazil. *Bull. Mar. Sci.*, 70(2): 409-421.
- LAILSON-BRITO JR, J, MA AZEREDO, O MALM, RM RAMOS, APM DI BENEDITTO & MFC SALDANHA. 2002. Trace metals in liver and kidney of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the north coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Lat.Am. J. Aq. Mamm.*, special issue, 1:107-114.
- LÁZARO, M, EP LESSA & H HAMILTON. 2004. Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Mar. Mam. Sci.*, 20(2): 201-214.
- LEE, PJ. 1971. Multivariate analysis for the fisheries biology. *Fish. Res. Bd. Can. Tech. Rep.*, 244:1-182.
- LESSA, G, PR GONÇALVES & LM PESSOA. 2005. Variação geográfica em caracteres cranianos quantitativos de *kerodon rupestris* (Wied,1820) Rodentia,Caviidae). *Arq. Mus. Nac.*, Rio de Janeiro, 63(1): 75-88.
- LEWISON RL, LB CROWDER, AJ READ & SA FREEMAN. 2004. Understanding impacts of fisheries bycatch on marine megafauna. *TREE*, 19(11):598-604.
- MALHOTRA, A. & RS. THORPE.1997. Size and shape variation in a Lesser Antillean anole, *anolis oculatus* (Sauria: Iguanidae) in relation to habitat. *Biol. J. Linn. Soc.*, 60:53-72.
- MANLY, BFJ. 1994. *Multivariate Statistical Methods: A primer* (2nd Edition). Chapman & Hall, 215p.
- MAINDONALD, J & BRAUN, J. 2003. *Data Analysis and Graphics Using R: an example-based approach*. Cambridge University Press. 362pp.
- MARIGO, J, FCW ROSAS, ALV ANDRADE, MR OLIVEIRA, RA DIAS & JL CATÃO-DIAS.2002. Parasites of Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from São Paulo and Paraná States, Brazil. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, special issue, 1:115-122.
- MARTIN, G. 1996. Birds in double trouble. *Nature*, 380: 666-667.
- MAYR, E. 2000. The biological species concept, *In: Wheeler, Q, R. Meier. (Eds) Species concepts and phylogenetic theory*. New York, Columbia University Press. 2-29.

- MENDEZ, M, HC ROSEBAUM & P BORDINO. 2007. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts and management implications. *Conserv. Genet.*
- MILINKOVITVH, C, R LEDUC, R TIEDEMANN & A DIZON. 2001. Application of molecular data in cetacean taxonomy and population genetics with special emphasis on defining species boundaries. In Evans, PGH & JA Raga (Eds) Marine mammals: Biology and conservation. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 325-359.
- MORITZ, C. 1994. Defining evolutionarily 'significant units' for conservation. *TREE*, 9:373-375.
- NORRIS, KS. 1961. Standardized methods for measuring and recording data on the smaller cetaceans. *J. Mamm.*, 42(4): 471-476.
- OTT, PH. 1994. Estudo da ecologia alimentar de *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D'Orbigny 1844) (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral norte do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Monografia de Bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 69p.
- OTT, PH. 2002. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de cetáceos do Atlântico Sul Ocidental: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 142p.
- PEREZ, JE, LL TAMINI, G CHIARAMONTE & HL CAPOZZO. 1996. Alimentación del delfín Franciscana en el sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Resumo da VI Reunion de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, Viña del Mar, Chile, p91.
- PERRIN, WF 1975a. Variation and taxonomy of spotted and spinner porpoise (genus *Stenella*) in the eastern tropical Pacific and Hawaii. *Bull. Scr. Inst. Ocean.*, 21:206 pp.
- PERRIN, WP, PA. AKIN & JV KASHIWADA. 1991. Geographic variation in external morphology of the spinner dolphin *Stenella longirostris* in the eastern Pacific and implications for conservation. *Fish. Bull.*, 89:411-428.
- PERRIN, WF. 2002. Geographic Variation. In: Perrin, WF, B. Wursig & JGM Thewissen (Eds). Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego, CA. 510-515.
- PERRIN, WF, MLL DOLAR & M AMANO. 2003. Cranial sexual dimorphism and geographic variation in Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei*. *Mar. Mamm. Sci.*, 19(3):484-501.
- PICHLER, F, D ROBINEAU, RNP GOODALL, MA MEYER, C OLAVARRÍA & CS BAKER. 2001: Origin and radiation of the genus *Cephalorhynchus*. *Mol. Ecol.*, 10: 2215- 2223.
- PINEDO, MC, 1982. Análise dos conteúdos estomacais de *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D'Orbigny, 1844) e *Tursiops gephyreus* (LAhille,1908) (Cetacea, Platanistidae e Delphinidae) na zona estuarial e costeira de Rio Grande, RS, Brasil. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, Tese de Mestrado, 95p.
- PINEDO, MC.1991. Development and variation of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Tese de doutorado, University of California, Santa Cruz, USA.406p.
- PINEDO, MC.1995. Development and variation external morphology of the Franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Rev. Bras. Biol.*, 55(1): 85-96.

- PRADERI, R, MC PINEDO & EA CRESPO. 1989. Conservation and management of *Pontoporia blainvillei* in Uruguay, Brazil and Argentina. In: Perrin, WF, RL Brownell, Z Kaya & L Jiankang (Eds) *Biology and Conservation of the River Dolphins*. Occasional paper, 3: 52-56.
- RALLS, K. 1977. Sexual dimorphism in mammals: avian models and unanswered questions. *Am. Nat.* 111:917-937.
- RAMOS, RMA, AP DI BENEDITO & NRW LIMA, 2000a. Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. *Brazil. Aq. Mamm.*, 26(1): 65-75.
- RAMOS, RMA, APM DI BENEDITTO & NRW LIMA, 2000b. Relationship between dental morphology, sex, body length and age in *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Brasil. Biol.*, 60(2): 283-290.
- RAMOS, RMA, APM DI BENEDITTO, S SICILIANO, MCO SANTOS, AN ZERBINI, C BERTOZZI, AFC VICENTE, E ZAMPIROLI, FS ALVARENGA & NRW LIMA. 2002. Morphology of the Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) off Southeastern Brazil: Sexual Dimorphism, Growth and Geographic Variation. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, 1:129-144.
- READY, AJ & KA TOLLEY. 1997. Postnatal growth and allometry of harbour porpoises from the bay of fundy. *Can. J. Zoo.*, 75:122-130.
- READ, A. 2005. Bycatch and Depredation. In: Reynolds, JE, WF Perrin, RR Reeves, S Montgomery & TJ Ragen. *Marine mammal research: conservation beyond crisis*. Chapter 2. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- REEVES, RR, BD SMITH, EA CRESPO & GN DI SCIARA. 2003. *Dolphins, Whales and Porpoises: 2002-2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans*. IUCN/SSC Cetacean Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- REEVES, RR, WF PERRIN, BL TAYLOR, CS BAKER & SL MESNICK (Eds). 2004. Report of the Workshop on Shortcomings of Cetacean Taxonomy in Relation to Needs of Conservation and Management, April 30 – May 2, 2004, La Jolla, California. NOAA Technical Memorandum NMFS.
- REYMENT, RA, RE BLACKITH & NA CAMPBELL. 1984. *Multivariate Morphometrics*. Academic Press, 233p.
- RODRIGUEZ, D, L RIVERO & R BASTIDA. 2002. Feeding ecology of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in marine and estuarine waters of Argentina. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, volume especial, 1: 77-94.
- ROSAS, FCW. 2000. Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia fluviatilis* e *Pontoporia blainvillei* no litoral sul do Estado de São Paulo e litoral do Estado do Paraná, Brasil. *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 145p.
- ROSAS, FCW & ELA MONTEIRO-FILHO. 2002. Reproductive parameters of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) on the coast of São Paulo and Paraná States, Brazil. *Mamm.*, 66(2):231-245.

- ROSAS, FCW, ELA MONTEIRO-FILHO & MR OLIVEIRA. 2002. Incidental catches of Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from the coastal waters of São Paulo State, southeastern Brazil. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, volume especial, 1: 169-174.
- SAILA, SB & JM FLOWERS. 1969. Geographic morphometric variation in American lobster. *Syst. Zool.* 18: 330-338.
- SECCHI, ER. 2006. Modelling the population dynamics and viability analysis of Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) and Hector's Dolphins (*Cephalorhynchus hectori*) under the effects of bycatch in fisheries, parameter uncertainty and stochasticity. *Tese de doutorado*. Universidade de Otago, Dunedin, New Zealand. 254 p.
- SECCHI, ER, AN ZERBINI, M BASSOI, L DALLA ROSA, LM MOLLER & CC ROCHA-CAMPOS. 1997. Mortality of franciscanas, *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillnetting in southern Brazil. *Rep. Int. Whal. Commn.*, 47:653-658.
- SECCHI, ER, JY WANG, BW MURRAY, CC ROCHA-CAMPOS & BN WHITE. 1998. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Can. J. Zool.*, 76(1): 622-627.
- SECCHI, E, PH OTT & D DALEWICZ. 2002. Report of the Fourth Workshop for the Coordinated Research and Conservation of The Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Western South Atlantic. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, volume especial, 1:11-20.
- SECCHI, ER, D DANILEWICZ & PH OTT. 2003a. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implications to meet management objectives. *J Cetacean Res. Manage.*, 5(1):61-68.
- SECCHI, ER, PH OTT & D DANILEWICZ. 2003b. Effects of fishing bycatch and the conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. In: Gales, N, M Hindell & R Kirkwood (Eds) *Marine Mammals: Fisheries, Tourism and Management Issues*. CSIRO Publishing. Collingwood. Australia. Pages 174-191.
- SECCHI, ER, PG KINAS, M MUELBERT. 2004. Incidental Catches of Franciscana in Coastal Gillnet Fisheries in the Franciscana Management Area III: period 1999-2000. *Lat. Am. J. Aq. Mamm.*, 3(1): 61- 68.
- SEIXAS, TG, HA KEHRIG, G FILLMANN, APM DI BENEDITTO, CMM SOUZA, ER SECCHI, I MOREIRA., & O. MALM. 2007 Ecological and biological determinants of trace elements accumulation in liver and kidney of *Pontoporia blainvillei*. *Sci. Tot. Environ.*, 385:208-220.
- SICILIANO, S. 1994. Review of small cetaceans and fishery interactions in coastal waters of Brazil. *Rep. Int. Whal. Comm.*, volume especial, 15: 241-250.
- SICILIANO, S, APM DI BENEDITTO & RMA RAMOS. 2002. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterizações dos habitats e fatores de isolamento das populações. *Bol. Mus. Nac. Zool.*, 47(6):1-15.
- TAYLOR, BL. 1997. Defining "population" to meet management objectives for marine mammals. In: DIZON, AE, SJ CHIVERS & WF PERRIN (Eds). *Molecular Genetics of Marine Mammals*. Mar. Mamm. Sci., publicação especial, 33:49-65.
- TAYLOR, BL. 2005. Identifying Units to Conserve. In: Reynolds, JE, WF Perrin, RR Reeves, S Montgomery & TJ Ragen. *Marine mammal research: conservation*

- beyond crisis. Chapter 2. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- THORPE, RS, M CORTI & E CAPANNA.1982. Morphometric divergence of Robertsonian population/species of *Mus*: A multivariate analysis of size and shape. *Experientia*, 38:920-923.
- THORPE, RS. 1983a. A review of the numerical methods for recognizing and analyzing racial differentiation. *In*: Felsenstein J, ed. Numerical Taxonomy: Proceedings of a NATO Advanced Studies Institute. *NATO ASI Series*, Vol. G1, 404-423.
- THORPE, RS. 1983b. A biometric study on the effects of growth on the analysis of geographic variation: tooth number in green geckos (Reptilia: Phelsuma). *J. Zool., Lond.*, 201: 13-26.
- THORPE, RS & L. LEANY.1983. Morphometric studies in inbred and hybrid house mice (*Mus* sp): Multivariate analysis of size and shape. *J. Zool., Lond.* 199: 421-432.
- THORPE, R. S 1988. Multiple group principle component analysis and population differentiation. *J. Zool., Lond.*, 216:37-40.
- UNEP/CMS, 2000 (Ed) 2000. Report of the Third Workshop for Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Southwestern Atlantic. UNEP/CMS, Bonn.
- WADE, PR. & R ANGLISS.1997. Guidelines for assessing marine mammal stocks: Registro do GAMMS workshop April 3-5, 1996, Seattle, Washington. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-OPR-12. 93 p.
- WALTER, T. 1997. Curvas de crescimento aplicadas a organismos aquáticos. Um estudo de caso para toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) do extremo sul do Brasil. *Monografia de Bacharelado*, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 102 p.
- WANG, JY, LS CHOU & BN WHITE.1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus:*Tursiops*) in Chinese waters. *Mol. Ecol.*, 8:1603-1612.
- WANG, JY, LS CHOU & BN WHITE. 2000a. Osteological differences between two sympatric forms of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. *J. Zool., Lond.*, 252: 147-162.
- WANG, JY, LS CHOU & BN WHITE. 2000b. Differences in the external morphology of two sympatric species of bottlenose dolphins (Genus *Tursiops*) in the Waters of China. *J. Mamm.*, 81(4): 1157-1165.
- WANG, JY. 2002. Stock Identity. *In*: Perrin, WF, B WUrsig & JGM Thewissen (Eds). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, CA. Pages 1189-1192.
- WAPLES, RS. 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp, and the definition of "species" under the Endangered Species. *Mar. Fish. Rev.*, 53: 11-22.
- WAPLES, RS. 1995. Evolutionarily Significant Units and the Conservation of Biological Diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium*, 17:8-27.
- WINANS, GA & RS NISHIOKA. 1987. A multivariate description of change in body shape of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Aquaculture*, 66, 235-245.

ANEXOS

ANEXO I

ANEXO II

Anexo II (cont.)

* exemplares adultos que efetivamente foram utilizados nas análises

** único macho maturo presente na amostra proveniente da Argentina, designada como FMA IV; este exemplar não foi utilizado nas análises.

ANEXO III

Função *subs.na.norm*: para substituição de NA's pela média da distribuição condicional correspondente. Necessita da função *med.cond.norm*.

```
subs.na.norm <- function(x,m,S)
```

```
x => vetor de dados com alguns elementos NA
```

```
m => vetor de médias
```

```
S => matriz de covariância
```

```
retorna 'x.out' com NAs preenchidos pelas médias condicionais
```

```
{ local <- 1:length(x)
```

```

q.el <- local[is.na(x)]
if(length(q.el)==0) x.out <- x
else
{ out <- med.cond.norm(q.el,m,S,x[-q.el])
  x.out <- x
  x.out[q.el]<-out[[1]]}
x.out}

```

Função *med.cond.norm*: para obter médias do vetor $X(q \times 1)$ a partir do conhecimento dos $(p-q)$ valores de $X(p \times 1)$.

```

med.cond.norm <- function(q.el,m,S,x.dado)
q.el => elementos do vetor que compoe X(qx1)
m => vetor das medias de X(px1)
S => matriz de covariancia de X(px1)
x.dado => vetor com os (p-q) valores conhecidos
{ p.el <- 1:length(m)
  nq.el <- p.el[-q.el]
  m1 <- m[q.el]
  m2 <- m[nq.el]
  S11 <- S[q.el,q.el]
  S22 <- S[nq.el,nq.el]
  if(length(q.el)==1) S12 <- t(S[q.el,nq.el])
  else S12 <- S[q.el,nq.el]
  S22.inv <- solve(S22)
  m1.x <- m1 + S12%%S22.inv%%as.numeric(x.dado-m2)
  S11.x <- S11 - S12%%S22.inv%%t(S12)
  list(m1.x,S11.x)}

```

Função *f.padron*: para padronizar as colunas na matriz de dados x tal que tenham média=0 e $dp=1$.

```

f.padron <- function(x)
{ p <- dim(x)[2]
  z <- x
  m.x <- numeric()

```

```

s.x <- numeric()
for( i in 1:p)
{m.x[i] <- mean(x[,i],na.rm=T)
  s.x[i] <- sd(x[,i],na.rm=T)}
for(i in 1:p) z[,i] <- (x[,i]-m.x[i])/s.x[i]
z}

```

Função f.mgpca

```

f.mgpca <- function(lcrabs,crabs.grp,nomes)
# lcrabs: matrix com nxp contendo vetores de medicoes
# crabs.grp: vetor de tamanho n contendo o fator que classifica cada linha em um dos k grupos
# nomes: vetor com os k caracteres identificando grupos.
{n.grp <- table(crabs.grp)
  k.grp <- dim(n.grp)
  n.total <- dim(lcrabs)[1]
  sq.T <- (n.total-1)*cov(lcrabs)
  gl.grp <- n.grp - 1
  p <- dim(lcrabs)[2]
  sq.W <- matrix(rep(0,p*p),ncol=p)
  for(i in 1:k.grp)
    sq.W <- sq.W + (gl.grp[i])*cov(lcrabs[crabs.grp==nomes[i],])
  sq.B <- sq.T-sq.W
  covmtx.w <- sq.W/(n.total-k.grp)
  pca.dentro <- eigen(covmtx.w,symmetric=T)
  auto.vec <- (-1)*pca.dentro$eigenvalues
  escores <- as.matrix(lcrabs)%*%auto.vec
  saida <- list(val=pca.dentro$values,
    vec=auto.vec,
    escores=escores,
    sq.W=sq.W,
    sq.B=sq.B)
  saida}

```

Função f.plotlda


```

f.plotlda <- function(saida.lda,f1,f2)
# O arquivo 'saida.lda' é o objeto gerado pela funcao lda()
# f1 e f2 sao números dos LDs que queremos graficar

# Nota: 1) é necessário dispor da funcao 'f.cont()'
#      2) implementação somente para LD1, LD2 e LD3

{ n <- saida.lda$N
  g <- length(saida.lda$counts)
  library(MASS)
  fran.pred <- predict(fran.lda)

  esc123.lda <- fran.pred$x[, 1:3]
  media.lda <- matrix(rep(0,3*g),ncol=g)
  for(i in 1:3)
    media.lda[i,]<-tapply(fran.pred$x[,i],fran.pred$class,mean)
  class <- fran.pred$class
  nomes <- as.character(unique(fran.pred$class))
  sq.W <- f.mgpca(esc123.lda,class,nomes)$sq.W
  cov.W <- sq.W/(n-g)
  W.esc <- cov.W[c(f1,f2),c(f1,f2)]

  out.A <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,2],media.lda[f2,2]),W.esc)
  out.B <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,4],media.lda[f2,4]),W.esc)
  out.D <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,6],media.lda[f2,6]),W.esc)
  out.a <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,1],media.lda[f2,1]),W.esc)
  out.b <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,3],media.lda[f2,3]),W.esc)
  out.d <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,5],media.lda[f2,5]),W.esc)

  # Gráfico:
  xa.M <- 1.2*(max(c(out.A[,1],out.B[,1],out.D[,1],out.a[,1],out.b[,1],out.d[,1])))
  xa.m <- 1.2*(min(c(out.A[,1],out.B[,1],out.D[,1],out.a[,1],out.b[,1],out.d[,1])))
  xa <- max(abs(xa.M),abs(xa.m))
  ya.M <- 1.2*(max(c(out.A[,2],out.B[,2],out.D[,2],out.a[,2],out.b[,2],out.d[,2])))
  ya.m <- 1.2*(min(c(out.A[,2],out.B[,2],out.D[,2],out.a[,2],out.b[,2],out.d[,2])))
  ya <- max(abs(ya.M),abs(ya.m))

  eqsplot(out.A,xlim=c(-xa,xa),ylim=c(-ya,ya),pch=".",
          xlab=as.character(f1),ylab=as.character(f2))

```

```

points(out.B,pch=".")
points(out.D,pch=".")
points(out.a,pch=".")
points(out.b,pch=".")
points(out.d,pch=".")

```

```

text(media.Lda[f1,2],media.Lda[f2,2],labels=as.character(saida.Lda$lev[2]))
text(media.Lda[f1,4],media.Lda[f2,4],labels=as.character(saida.Lda$lev[4]))
text(media.Lda[f1,6],media.Lda[f2,6],labels=as.character(saida.Lda$lev[6]))
text(media.Lda[f1,1],media.Lda[f2,1],labels=as.character(saida.Lda$lev[1]))
text(media.Lda[f1,3],media.Lda[f2,3],labels=as.character(saida.Lda$lev[3]))
text(media.Lda[f1,5],media.Lda[f2,5],labels=as.character(saida.Lda$lev[5]))

```

```

abline(0,0)
segments(0,-ya,0,ya)
segments(media.Lda[f1,2],media.Lda[f2,2],
         media.Lda[f1,4],media.Lda[f2,4])
segments(media.Lda[f1,4],media.Lda[f2,4],
         media.Lda[f1,6],media.Lda[f2,6])
segments(media.Lda[f1,1],media.Lda[f2,1],
         media.Lda[f1,3],media.Lda[f2,3])
segments(media.Lda[f1,3],media.Lda[f2,3],
         media.Lda[f1,5],media.Lda[f2,5])

```

Função `fplotlda.femeas`:

```

f.plotlda.femeas <- function(saida.Lda,f1,f2)

# O arquivo 'saida.Lda' é o objeto gerado pela funcao lda()
# f1 e f2 sao números dos LDs que queremos graficar

# Nota: 1) é necessário dispor da funcao 'f.cont()'
#       2) implementação somente para LD1, LD2 e LD3

{n <- saida.Lda$N
g <- length(saida.Lda$counts)
library(MASS)
fran.pred <- predict(saida.Lda)

esc123.Lda <- fran.pred$x[,1:3]
media.Lda <- matrix(rep(0,3*g),ncol=g) for(i in 1:3)
media.Lda[i,]<-tapply(fran.pred$x[,i],fran.pred$class,mean)

class <- fran.pred$class
nomes <- as.character(unique(fran.pred$class))

```

```

sq.W <- f.mgpca(esc123.lda,class,nomes)$sq.W
cov.W <- sq.W/(n-g)
W.esc <- cov.W[c(f1,f2),c(f1,f2)]

out.A <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,1],media.lda[f2,1]),W.esc)
out.B <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,2],media.lda[f2,2]),W.esc)
out.F <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,3],media.lda[f2,3]),W.esc)
out.G <- f.cont(0.95,c(media.lda[f1,4],media.lda[f2,4]),W.esc)

# Gráfico:
xa.M <- 1.2*(max(c(out.A[,1],out.B[,1],out.F[,1],out.G[,1])))
xa.m <- 1.2*(min(c(out.A[,1],out.B[,1],out.F[,1],out.G[,1])))
xa <- max(abs(xa.M),abs(xa.m))
ya.M <- 1.2*(max(c(out.A[,2],out.B[,2],out.F[,2],out.G[,2])))
ya.m <- 1.2*(min(c(out.A[,2],out.B[,2],out.F[,2],out.G[,2])))
ya <- max(abs(ya.M),abs(ya.m))

eqsplot(out.A,xlim=c(-xa,xa),ylim=c(-ya,ya),pch=".",
        lab=as.character(f1),ylab=as.character(f2))
points(out.B,pch=".")
points(out.F,pch=".")
points(out.G,pch=".")

text(media.lda[f1,1],media.lda[f2,1],labels=as.character(saida.lda$lev[1]))
text(media.lda[f1,2],media.lda[f2,2],labels=as.character(saida.lda$lev[2]))
text(media.lda[f1,3],media.lda[f2,3],labels=as.character(saida.lda$lev[3]))
text(media.lda[f1,4],media.lda[f2,4],labels=as.character(saida.lda$lev[4]))

abline(0,0)
segments(0,-3*ya,0,3*ya)

```

Função `f.cont`: fornece contornos de densidade p para uma v. a. Normal bi-dimensional com média m e covariância S conhecida.

```

f.cont <- function(p,m,S)
{h <- 80 # número de pontos da reticula de x1
  S.e <- eigen(S)
  P <- S.e$vector
  L <- S.e$value
  rm(S.e)
  k <- qchisq(p,2)
  y1 <- seq(-sqrt(k*L[1]),sqrt(k*L[1]),length = h)

  Y <- matrix(c(y1[1],0),ncol=2)

```

```
for(i in 1:(h-2))
{ Y <- rbind(Y,c(y1[i+1],(-1)*sqrt((k-(y1[i+1]^2)/L[1])*L[2])))
  Y <- rbind(Y,c(y1[i+1],sqrt((k-(y1[i+1]^2)/L[1])*L[2])))}

Y <- rbind(Y,c(y1[h],0))
M <- matrix(rep(m,2*h-2),ncol=length(m),byrow=T)
X <- Y%*%t(P) + M
X}
```