



FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS  
UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Seleção sexual e estimativa populacional em  
*Syngnathus typhle* na Ria Formosa (Portugal)**

Magda Mirotas Frade

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor José Pedro Andrade

**2015**

## **Seleção sexual e estimativa populacional em *Syngnathus typhle* na Ria Formosa (Portugal)**

Declaração de autoria do trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

### **Copyright**

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

**Aos meus quatro**

## **Instituição e condições**

Mestrado em Biologia Marinha na Universidade do Algarve, Grupo de Investigação de Biologia Pesqueira e Hidroecologia

## **Agradecimentos**

Às duas pessoas mais importantes na minha vida, aos meus pais, Carmo e António, pelo seu apoio e amor incondicional ao longo de todo o meu percurso, transmitindo-me todos os seus valores e princípios para que eu seguisse em frente e conseguisse alcançar os meus objetivos. Ao meu irmão Miguel, um dos meus pilares, que esteve sempre presente, pronto a ajudar e amparar. À minha família. Ao Prof. Dr. José Pedro Andrade, pela orientação, ajuda e todo o suporte prestado que tornaram este trabalho possível. À Céline Madeira, mais do que uma orientadora no laboratório, uma amiga, por toda a sua paciência, dedicação e ensinamentos que me permitiram realizar este trabalho. Ao Miguel Correia, pelos conselhos e apoio prestado ao longo deste projeto, a sua ajuda foi valiosa. Aos meus amigos que sempre me acompanharam nos bons e maus momentos e que me dedicaram grande parte do seu carinho e paciência: Maria Elisa Rodrigues, Cátia Freitas, Bárbara Ferreira, Isabel Areosa, Raquel Marques, Ana Costa, Francisco Burquette, Joana Pimental, Filipe Henriques, Daniela Nobre, Francisco Silva, Fábio Pires, Ricardo Martins, Márcia Duarte, Patrícia Ricardo, Pedro Shaw Evangelista, Inga Silva e aos amigos do “sítio”.

## Resumo

A avaliação do tamanho da população é um parâmetro fundamental em diversos estudos ecológicos. Um dos métodos comumente utilizado para determinar o número de efetivos de uma população é o método de marcação-recaptura, baseado em marcadores físicos, o qual consiste na captura inicial de um grupo de indivíduos, na sua marcação e na sua libertação. Numa segunda captura o número de indivíduos marcados na amostra pode ser utilizado para estimar o tamanho da população. Uma nova abordagem para efetuar esta estimativa baseia-se na análise genética de parentesco, através da utilização de microssatélites como marcadores moleculares, permitindo também investigar diversos aspetos da biologia reprodutora. O presente estudo foi desenvolvido com os objetivos de: 1) investigar diversos aspetos da seleção sexual através de experiências *in situ* e *ex situ*, e 2) estimar o número de indivíduos de *Syngnathus typhle* que ocorrem no canal do Ancão, Ria Formosa, através da aplicação destes dois métodos. O período de amostragem, para ambos os métodos, decorreu entre março e junho. Os resultados obtidos através da análise genética permitiram tanto confirmar o sistema genético de acasalamento já descrito nesta espécie, o sistema de acasalamento poliginandrico, bem como, estimar o tamanho da população reprodutora. O censo do tamanho da população, obtido através do método marcação-recaptura, apresentou um valor muito mais elevado relativamente ao do tamanho da população reprodutora, tendo sido propostas algumas hipóteses para explicar esta diferença, relacionando variáveis como a área de amostragem, época de reprodução, sistema de acasalamento bem como a proporção sexual observada e a seleção sexual. A combinação de ambas as estimativas proporciona melhor informação sobre a ecologia reprodutora e permite analisar possíveis alterações ambientais que possam alterar e influenciar ambas as estimativas.

**Palavras-chave:** tamanho da população, sistema de acasalamento, seleção sexual, Syngnathidae, *Syngnathus typhle*, Ria Formosa

## **Abstract**

Population size assessment is a key parameter in ecological studies. Mark-recapture method is commonly used to determine the number of effective population. It is based on physical markers, and consists in an initial capture of a group of individuals, followed by tagging and their release to the environment. In a second capture, the number of individuals marked, present in the sample, can be used to estimate the size of the population. Genetic parentage analysis, by using molecular markers such as microsatellite, is a new approach to estimate population sizes, and also allows the investigation of reproductive biology. The present study aimed: 1) to investigate various aspects of sexual selection through experiments *in situ* and *ex situ*, and 2) to estimate the number of individuals *Syngnathus typhle* occurring in Ancão channel, Ria Formosa, through the application of these two methods described before. Sampling took place from March to June, for both methods. Genetic analysis results allowed the confirmation of the genetic mating system, already described for this species, the confirmation of the polygynandrous mating system, and the estimation of the breeding population size. The census population size, obtained through mark-recapture method, showed a much higher value in relation to the size of the breeding population. Some hypotheses have been proposed to explain this difference, relating variables such as sampling area, breeding season, mating system and the sex ratio observed, and sexual selection. Combining both estimatives of population sizes provides a better information on reproductive ecology and allows the analysis of possible environmental changes that could alter and influence both estimatives.

**Keywords:** population size, mating system, sexual selection, Syngnathidae, *Syngnathus typhle*, Ria Formosa

## Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Seleção sexual.....	1
1.2	Estimativa do tamanho da população .....	3
2.	Material e métodos .....	6
2.1	Local de estudo e amostragem.....	6
2.2	Efeitos da marcação e perda de marcadores .....	9
2.3	Análise genética.....	11
2.3.1	Extração e quantificação do ADN .....	11
2.3.2	Amplificação por reações em cadeia da Polimerase ( <i>PCR</i> ) .....	12
2.3.3	Genotipagem.....	15
2.3.4	Erros de genotipagem .....	15
2.3.5	Análise de parentesco .....	16
2.4	Estimativa do tamanho da população .....	17
3.	Resultados.....	18
3.1	Efeitos da marcação e perda de marcadores .....	18
3.2	Marcadores moleculares .....	19
3.3	Análise de parentesco .....	20
3.4	Dinâmica populacional .....	22
3.5	Estimativas do tamanho da população .....	23
4.	Discussão.....	24
4.1	Efeitos da marcação e perda de marcadores .....	24
4.2	Análise parental e microsatélites.....	26
4.3	Biologia reprodutiva: sistema de acasalamento e seleção sexual .....	27
4.4	Dinâmica populacional e estimativa do tamanho de população .....	30
5.	Conclusão .....	32
6.	Referências .....	33

## Índice de figuras

Figura 1- Os quatro sistemas de acasalamento e gradientes teóricos de intensidade da seleção sexual e grau de dimorfismo sexual. As linhas que ligam machos e fêmeas indicam os parceiros a partir dos quais se originará a prole (Adaptado de Avise <i>et al.</i> , 2002).....	3
Figura 2 – Mapa de Portugal (A) e parte oeste da Ria Formosa (B) com indicação do local de amostragem (circunferência) (C). .....	7
Figura 3 - Figura 3 – <i>S. typhle</i> marcado com VIE cor de laranja na proximidade da barbatana dorsal.....	8
Figura 4 - Local de inserção dos marcadores e exemplo de sequência de cores (branco-verde-cor de laranja) utilizada. ....	9
Figura 5 - Ensaio experimental acerca dos efeitos da marcação e perda de marcadores. A- Tanque controlo (nenhum indivíduo marcado); B, C e D- Replicados 1, 2 e 3 (indivíduos marcados). ....	11
Figura 6 - Perfil de temperaturas em ciclos térmicos da PCR. A- Desnaturação, B- Hibridação e C- Extensão. (Adaptado de Butler, 2012b).....	13
Figura 7 - Comprimento (A) e Peso (B) médio dos indivíduos marcados (quadrado) e dos indivíduos não marcados (controlo, losango) desde março a junho de 2014 (18/04-03/06).....	19
Figura 8 - Distribuição espacial dos juvenis com mãe atribuída e sem mãe atribuída e dos juvenis irmãos e meio-irmão dentro da bolsa de cada macho.....	21
Figura 9 - Número de acasalamentos de machos e fêmea <i>S. typhle</i> . ....	22
Figura 10 - Estrutura populacional e número de machos grávidos durante o período de estudo.....	23

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Sequência de cores de cada indivíduo, em cada tanque (controle, 1,2 e 3). G-verde; R, cor de laranja; W-branco.....	10
Tabela 2 - Descrição dos 10 <i>loci</i> de <i>Syngnathus typhle</i> (Linnaeus, 1758), utilizados no presente estudo. Locus, Primers (5´-3´) (F: forward; R: reverse), motivo de repetição, temperatura de hibridação, volume de primer ( $\mu$ M) e referência bibliográfica do respetivo <i>primer</i> .....	14
Tabela 3 - Análise da variação genética dos dez <i>loci</i> utilizados no presente estudo (K ; número de alelos; Ho; Heterozigotia observada; He; Heterozigotia esperada; Prob. Exclusão; Probabilidade de exclusão; HF; Homozigóticos falsos ou alelos nulos; FA; Falsos alelos, Fis; Coeficiente de consanguinidade). ....	20
Tabela 4- Conjunto de dados e métodos utilizados na obtenção das estimativas do tamanho da população de <i>S. Typhle</i> .....	24

## 1. Introdução

### 1.1 Seleção sexual

A seleção sexual é uma força evolutiva que seleciona as características que aumentam o sucesso reprodutivo dos indivíduos, através da escolha de parceiro ou da competição por acasalamento (Darwin, 1871; Andersson, 1994). Por conseguinte, as variações no *fitness*, devido à seleção sexual, provêm, sobretudo, do sucesso de acasalamento diferencial, encontrando-se, assim, o sistema de acasalamento estreitamente relacionado com a intensidade da seleção sexual e o grau de dimorfismo sexual (Avise *et al.*, 2002; Shuster & Wade, 2003; Rosenqvist & Berglund, 2011).

Originalmente, Darwin (1871) sugeriu que espécies altamente polígenas com papel sexual “tradicional” tendem a ser mais dimórficas sexualmente do que as espécies menos polígenas. Um análogo da teoria de Darwin prediz que, em espécies com papéis sexuais invertidos, espera-se um maior dimorfismo nos traços sexuais secundários em espécies mais poliândricas do que em espécies que apresentam um sistema de acasalamento menos poliândrico (Jones & Avise, 1997a).

A família Syngnathidae, que inclui cavalos-marinhos, marinhas e dragões marinhos, apresenta frequentemente um papel sexual reverso (Berglund & Rosenqvist, 1993), definido como a situação em que a competição por acasalamento é mais intensa entre fêmeas do que entre machos (Vincent *et al.*, 1992). Nesta situação, a seleção sexual irá causar efeitos mais significativos nas fêmeas e nos seus traços sexuais secundários, como o tamanho, a coloração e a ornamentação do corpo, do que nos machos (Williams, 1975). O tamanho da fêmea desempenha um papel importante na competição por parceiros (Ripley & Foran, 2006; Paczolt & Jones, 2010). As fêmeas de maior tamanho são preferidas como parceiros de acasalamento (Berglund *et al.*, 1986a; Ahnesjö, 1992) e têm maior sucesso na competição intrasexual por acasalamento (Berglund & Rosenqvist, 1993; Vincent *et al.*, 1995) o que reflete os benefícios competitivos desta característica corporal.

As diferentes taxas de potencial reprodutivo dos machos e das fêmeas, isto é, o número máximo de descendentes que um indivíduo é capaz de produzir por unidade de tempo (Kvarnemo & Ahnesjö, 1996), são utilizadas para predizer a direção e a intensidade da competição pelo acesso a parceiros sexuais, ou seja, qual o sexo que desempenha o papel sexual predominante (Clutton-Brock & Vincent, 1991). A teoria da

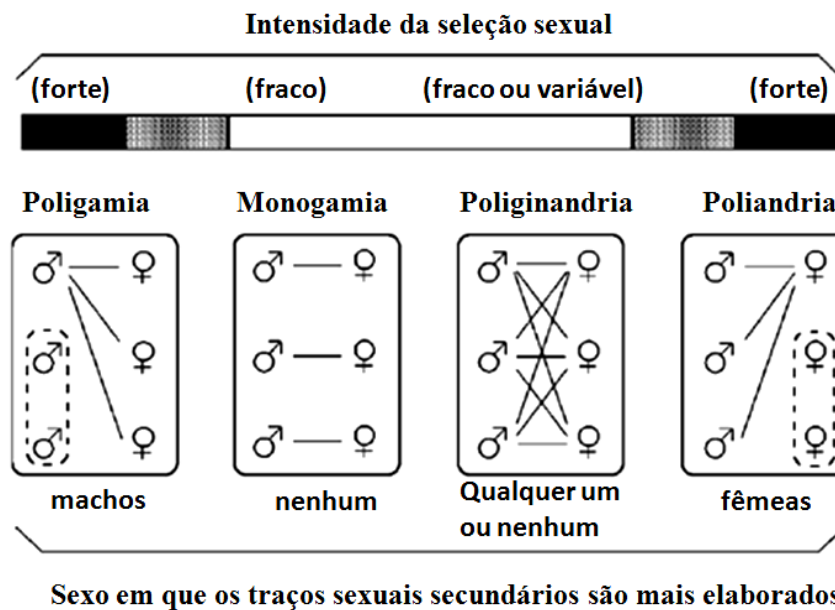
seleção sexual prediz que, quando a taxa de potencial reprodutiva dos machos está abaixo da taxa das fêmeas, a proporção sexual operacional (proporção de machos e fêmeas reprodutivamente ativos) tem tendência para ser atribuída às fêmeas, ocorrendo, assim, uma reversão na direção da seleção sexual e, conseqüentemente, o fenômeno de inversão do papel sexual. Espécies que apresentem inversão do papel sexual proporcionam a oportunidade de testar a teoria da seleção, que derivou, fundamentalmente, a partir de observações em organismos com papel sexual convencional. Por isso, são as candidatas ideais para testar teorias relacionadas com a evolução das diferenças sexuais e a sua influência na seleção sexual (Darwin, 1871; Williams, 1975; Wilson *et al.*, 2003).

Em espécies que apresentam inversão do papel sexual, o fenômeno da gravidez masculina parece ser o principal responsável pela evolução e inversão do mesmo, pois a capacidade que o macho tem para criar ovos fica abaixo da capacidade que a fêmea possui para os produzir, ou seja, as fêmeas dão origem a mais ovos do que aqueles que os machos conseguem acomodar nas suas bolsas (Svensson, 1988; Berglund *et al.*, 1989; Berglund & Rosenqvist, 1990). Esta desigualdade reprodutiva determina a inversão do papel sexual acima mencionado (Clutton-Brock & Vincent, 1991; Clutton-Brock & Parker, 1992).

Na espécie *Syngnathus typhle* (Linnaeus, 1758), bem como em todas as espécies da família Syngnathidae, os machos providenciam todo o cuidado parental pós-zigótico (Vincent *et al.*, 1992) que se inicia depois de a fêmea transferir os ovos não fertilizados para uma bolsa com duas pregas ventrais existente no macho. Os machos libertam o esperma para dentro da bolsa ocorrendo, então, a fertilização. A bolsa volta a abrir apenas quando os machos libertam os juvenis, várias semanas mais tarde (Jones & Avise, 2001). Durante o desenvolvimento dos embriões o macho fornece proteção, nutrientes e oxigênio à sua prole (Berglund *et al.*, 1986a; Kamler, 2005). O facto de a fertilização acontecer dentro da bolsa do macho assegura a paternidade da descendência (Berglund *et al.*, 1986a, 1986b; Jones & Avise, 1997a), provavelmente um elemento importante na evolução da estratégia de alto investimento, por parte do macho, na criação da descendência (Smith, 1996).

Segundo vários estudos (Berglund *et al.*, 1988; Berglund & Rosenqvist, 1990; Jones *et al.*, 1999a), as fêmeas e os machos de *S. typhle* acasalam múltiplas vezes durante a época de reprodução, o que configura um sistema de acasalamento poliginandrico

(Jones & Avise, 2001). Em comparação com outras espécies de Syngnathideos, *S. typhle* exibe um grau de dimorfismo sexual moderado, em que machos e fêmeas são fenotipicamente semelhantes, exceto durante a época de corte e acasalamento, na qual as fêmeas apresentam padrões de ornamentação temporários (Berglund *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 1998). A figura 1 demonstra o efeito da seleção sexual em espécies como as da família Syngnathidae e nos seus sistemas de acasalamento, à exceção de que nestas espécies não ocorre poligamia.



**Figura 1-** Os quatro sistemas de acasalamento e gradientes teóricos de intensidade da seleção sexual e grau de dimorfismo sexual. As linhas que ligam machos e fêmeas indicam os parceiros a partir dos quais se originará a prole (Adaptado de Avise *et al.*, 2002).

## 1.2 Estimativa do tamanho da população

Muitos estudos ecológicos têm como base a estimativa do tamanho de uma determinada população (Krebs, 1989). O conhecimento deste parâmetro e da sua variação é fundamental (Tenan *et al.*, 2013), pois permite uma melhor compreensão da dinâmica populacional, de interações entre espécies e de padrões de doenças em populações (Bord *et al.*, 2014). Este parâmetro também se comporta como uma componente chave na implementação de medidas eficazes de gestão e de conservação (Mace *et al.*, 2010), bem como na gestão eficiente das pescarias, prevenindo a sobre-exploração ou o colapso de diversos mananciais (Powers & Monk, 2010).

A estimativa da abundância dos efetivos populacionais no meio natural pode ser realizada através de diversos métodos (Krebs, 1989; Sutherland, 2006). No entanto, é um parâmetro de difícil estimação, pois não é possível realizar uma contagem completa dos indivíduos e o número de efetivos populacionais deve ser inferido através de uma amostragem parcial da população, utilizando modelos estatísticos apropriados (Seber, 1982, 1992; Kendall & Nichols, 1995). Um dos métodos mais utilizados é o método de marcação e recaptura e tem como base a marcação dos indivíduos numa captura inicial, posteriormente libertados. Uma segunda amostra de indivíduos é mais tarde capturada e o número de animais marcados na amostra dá-nos a estimativa do tamanho da população (Seber, 1982). Os valores referentes às recapturas podem ser utilizados para uma variedade de propósitos, incluindo a monitorização dos indivíduos e o cálculo do tamanho da população, através de fórmulas padrão de captura-marcação-recaptura (Pollock *et al.*, 1990; Sandercock, 2006).

Estudos com base na técnica de marcação e recaptura utilizam uma grande diversidade de marcadores físicos, desde marcadores externos artificiais a marcadores internos e marcadores eletrónicos (Caldwell *et al.*, 2011). Em Syngnathideos, os principais marcadores físicos utilizados são marcadores artificiais externos (por exemplo, marcadores em volta do pescoço ou na cauda) e marcadores internos (por exemplo visible implant fluorescent elastomer, VIFE) (Monteiro *et al.*, 2005; Curtis, 2006; Sogabe & Yanagisawa, 2007; Palma *et al.*, 2008; Caldwell *et al.*, 2011; Harasti *et al.*, 2012). Estes marcadores devem possuir características que provoquem efeitos mínimos nos parâmetros básicos de crescimento linear e ponderal, mortalidade e reprodução, isto para que os resultados de estudos que utilizem o método da marcação, reproduzam variáveis fidedignas (Willis & Babcock, 1998).

No entanto, a aplicação de técnicas moleculares em biologia tem possibilitado uma melhor compreensão de diversos tópicos da ecologia no habitat natural, não só em Syngnatídeos como em muitas outras espécies. Estas técnicas não substituem a observação direta do comportamento, mas a sua utilização pode providenciar informação acerca da seleção sexual, dos sistemas de acasalamento, da ecologia comportamental, da filogeografia, da especiação e da conservação genética (Mobley *et al.*, 2011). Para uma eficaz implementação de medidas de conservação, as estimativas do tamanho da população e do tamanho da população reprodutora são requisitos

necessários (Roff & Zacharias, 2011), sendo fundamental a utilização das técnicas moleculares.

De entre os diversos marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples (Jones *et al.*, 2010), são particularmente adequados e utilizados com maior preferência para estudos de determinação do parentesco. Estes marcadores tendem a ser altamente polimórficos e os seus perfis são frequentemente específicos para um determinado indivíduo, sendo que, na maioria dos casos, são codominantes contendo, cada embrião, um registo de ambos os alelos maternos e paternos (Avise, 2004; Pemberton, 2009; Mobley *et al.*, 2011). O uso de marcadores moleculares permite a reconstrução dos genótipos das fêmeas através de análise de parentesco, subtraindo os alelos do pai a partir dos genótipos da progénie, restando apenas os alelos da mãe (Mobley *et al.*, 2011). Assim, através da utilização dos microssatélites, e com base na da análise parental, o tamanho da população reprodutora pode ser estimado.

A análise parental é a base da investigação em ecologia molecular (Jones *et al.*, 2010). O desenvolvimento de microssatélites como marcadores moleculares (Tautz, 1989) tem permitido o estudo de sistemas de acasalamento em populações naturais com espécies em que os comportamentos de acasalamento são difíceis de observar diretamente (Brockmann, 1994; Craighead *et al.*, 1995; Kellogg *et al.*, 1995; Primmer *et al.*, 1995), permitindo também grandes progressos na análise de parentesco. Para além destas aplicações, os microssatélites podem ser utilizados como complemento de métodos tradicionais, como o de marcação e recaptura, pois possibilitam a determinação do número efetivos numa determinada população, tornando esta estimativa mais fidedigna.

Nos Syngnathideos, o fenómeno da gravidez masculina faz com que estes *taxa* sejam especialmente atrativos do ponto de vista do sistema de acasalamento. Os microssatélites tornaram-se os marcadores moleculares ideais para a realização de estudos de análise de parentesco em populações do meio selvagem (Jones & Avise, 2001; Avise *et al.*, 2002), pois foram os primeiros marcadores com variação suficiente, de fácil utilização, e que podem ser analisados a partir de pequenas amostras de tecido de embriões. A partir destas amostras, informações como níveis de variação genética, padrões de fluxo genético entre populações, processos demográficos como padrões de migração, tamanho efetivo da população e tamanho da população reprodutora local

podem ser obtidas (Teske *et al.*, 2003; López *et al.*, 2010; Saarman *et al.*, 2010; Mobley *et al.*, 2011). O facto de os machos grávidos poderem ser capturados com toda a sua progénie intacta, torna os estudos de parentesco em Syngnathideos mais fiáveis, pois o registo completo da quantidade de vezes que o macho acasalou e com qual das fêmeas o fez fica preservado no corpo do macho progenitor (Jones & Avise, 2001).

Na Ria Formosa, são escassos os estudos acerca da família Syngnathidae, nomeadamente do género *Syngnathus*, existindo apenas dois estudos acerca do sistema de acasalamento, um incide na espécie *Syngnathus abaster* (Hübner *et al.*, 2013) e outro na espécie *Syngnathus typhle* (Rispoli & Wilson, 2008). Ainda em *Syngnathus typhle*, realizou-se outro estudo que investigou os hábitos alimentares desta espécie (Oliveira *et al.*, 2007). Em face da necessidade de alargar o nosso conhecimento e em virtude da escassez de estudos sobre esta família, e em particular a espécie *Syngnathus typhle*, onde é a quinta mais abundante pelo menos em algumas zonas, como o canal do Ancão, Ria Formosa (Erzini *et al.*, 2002), foi então definida a realização deste estudo.

O presente estudo tem como objetivos a investigação de diversos aspetos da seleção sexual, bem como a estimação do tamanho da população de *S. typhle* (Linnaeus, 1758), ao longo de quatro meses, através da aplicação de duas abordagens distintas: 1) da abordagem molecular, com base em análise de parentesco que, para além de complementar a estimativa do tamanho da população, é utilizada para estudar várias características da seleção sexual presente nesta espécie, 2) do método tradicional de marcação-recaptura, de forma a estimar os efetivos de *S. typhle* no canal do Ancão, Ria Formosa.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Local de estudo e amostragem**

O presente estudo foi desenvolvido num dos canais da Ria Formosa (Canal de Ancão), um sistema lagunar mesotidal localizado na costa sul de Portugal (Figura 2) (36°58'– 37°3' N, 8°2'– 7°32' W), com um comprimento de cerca de 55 km (E-W), uma largura máxima de 6 km (N-S) (Alcântara *et al.*, 2012) e uma área de aproximadamente 170 km<sup>2</sup>. Esta laguna é constituída por sistemas de sapais, planícies de maré e por uma rede complexa de canais e enseadas que interagem com as águas oceânicas adjacentes através de seis barras (Tett *et al.*, 2003). A temperatura da água

varia entre 12°C e 27°C (Newton & Mudge, 2003) e a salinidade apresenta uma variação de valores entre 13 (Inverno) e 36.5 (Verão) (Goela, 2005).



**Figura 2** – Mapa de Portugal (A) e parte oeste da Ria Formosa (B) com indicação do local de amostragem (circunferência) (C).

Fonte: Google Earth

O período de amostragem decorreu nos meses de março (18.03.2014), abril (02.04.2014), maio (01.05.2014) e junho (28.06.2014) durante os quais se recolheram dados para o estudo de marcação-recaptura e para a análise genética (apenas de março a maio). Os exemplares foram capturados durante a maré baixa utilizando como arte de pesca a redinha. A redinha é uma arte do tipo das artes envolventes-arrastantes, semelhante ao cerco utilizado na pesca da sardinha, com a diferença de que é alada para a praia. Tem um comprimento de 7m, uma altura de 1.60m e uma malhagem de 5mm. É ideal para utilizar em zonas pouco profundas, é uma arte pouco seletiva, que abrange toda a coluna de água e que captura organismos de todas as dimensões.

Após a captura, procedeu-se à identificação, a olho nu, dos indivíduos e do sexo (macho ou fêmea). Os machos podem ser distinguidos pela presença de uma bolsa localizada na face ventral da cauda e as fêmeas pela distensão na parte anterior do tronco. Os machos foram adicionalmente caracterizados pelo estado da sua bolsa, se está plana e junto ao corpo, indicador de um macho não grávido, ou se está inchada e preenchida com ovos, indicador de um macho grávido.

Na recolha de dados para a análise genética, a amostra de tecido de todas as fêmeas e machos obteve-se através da técnica de “swabbing” externo. Esta é uma técnica de amostragem não invasiva, em contraste com métodos tradicionais, que requerem o corte

de uma pequena quantidade de tecido, e consiste numa firme fricção de um cotonete ao longo da superfície dorsal ou ventral, adquirindo-se assim uma amostra ADN sem colocar em risco a sobrevivência dos indivíduos (Prunier *et al.*, 2012).

Para o estudo marcação-recaptura, em cada sessão de amostragem, todos indivíduos (n=205) foram marcados através do método da injeção de Visible Implant Elastomer (VIE; Northwest Marine Technology, Inc.). Este é um método que possibilita a colocação interna de marcadores coloridos que são visíveis externamente. Este consiste na utilização de um elastómero de duas componentes, biocompatível, que, depois de misturado, torna-se um líquido espesso que é injetado por debaixo do tecido com uma seringa hipodérmica e num volume reduzido (> 1 ml). Após algumas horas, o elastómero solidifica formando uma marca pigmentada bem definida sem causar dano no tecido. As marcas foram colocadas no lado direito, na proximidade da barbatana dorsal (Figura 3), e as mesmas foram introduzidas nos espécimes segundo o Sistema Manual de Injeção de Elastómero (Northwest Marine Technology, Inc.). Foram utilizadas duas cores fluorescentes (branco e cor de laranja) e estas, durante a segunda e terceira sessão de amostragem, permitiram registar a presença de exemplares recapturados, ou seja, que tinham sido marcados anteriormente, na primeira ou na segunda amostragem.



**Figura 3** - Figura 3 – *S. typhle* marcado com VIE cor de laranja na proximidade da barbatana dorsal.

Após a recolha de dados para ambos os estudos, as fêmeas e machos não grávidos foram libertados próximo da zona onde foram capturados. Os machos grávidos foram retirados do meio, transportados para a estação experimental do Ramalhete e isolados em taques de vidro com capacidade de 10L (o número de tanques variou consoante o número de indivíduos amostrados), em sistema aberto e com alimentação ajustada, de modo a que ocorresse um bom desenvolvimento dos embriões, e para que a

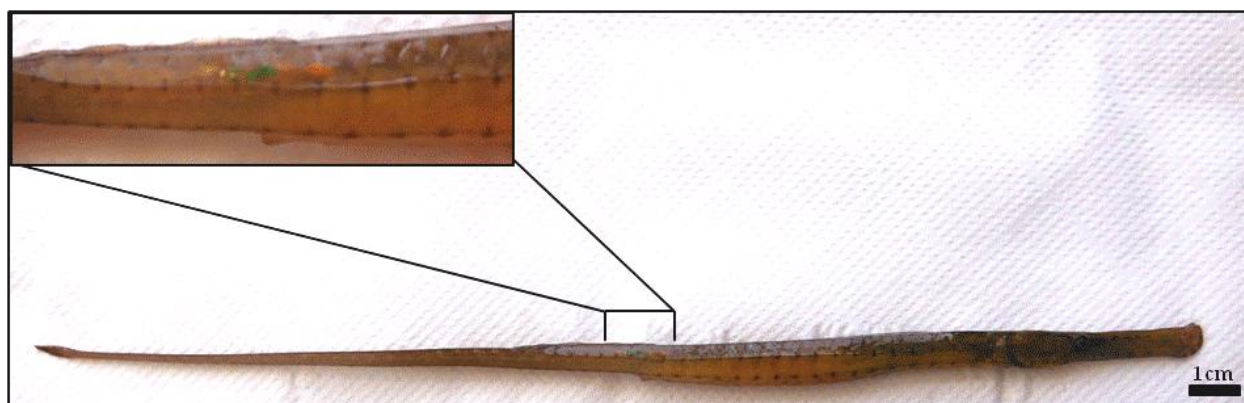
probabilidade de canibalismo dos machos para com os juvenis diminuísse. Os machos permaneceram nos tanques até ao nascimento dos juvenis.

Após o nascimento dos juvenis registou-se a medida e peso de cada macho e procedeu-se ao seu registo fotográfico. De seguida, registou-se o número de descendentes provenientes de cada macho e escolheram-se, aleatoriamente, 1/3 dos juvenis recém-nascidos, os quais foram conservados individualmente, em álcool a 70%, em microtubos de 1.5ML devidamente identificados para posterior extração de ADN e genotipagem.

## 2.2 Efeitos da marcação e perda de marcadores

O efeito da marcação nos indivíduos, em particular a mortalidade e a perda marcadores, foi determinado através da realização de uma experiência laboratorial. O ensaio consistiu na captura de 40 indivíduos, utilizando a arte de pesca redinha (descrita anteriormente), sendo depois transportados para a estação experimental do Ramalhete.

De seguida, na estação experimental, os exemplares foram marcados através do método da injeção de Visible Implant Elastomer (VIE; Northwest Marine Technology, Inc.) (descrito anteriormente). As marcas foram colocadas no lado direito, abaixo da barbatana dorsal (Figura 4). De modo a permitir a individualização de cada indivíduo por tanque, foram utilizadas três cores VIE (verde, cor de laranja e branco), sequenciadas de maneira a não existirem repetições da mesma cor (em sequência) (Tabela 1.). A marcação dos espécimes foi realizada através do Sistema Manual de Injeção de Elastômero (Northwest Marine Technology, Inc.).



**Figura 4** - Local de inserção dos marcadores e exemplo de sequência de cores (branco-verde-cor de laranja) utilizada.

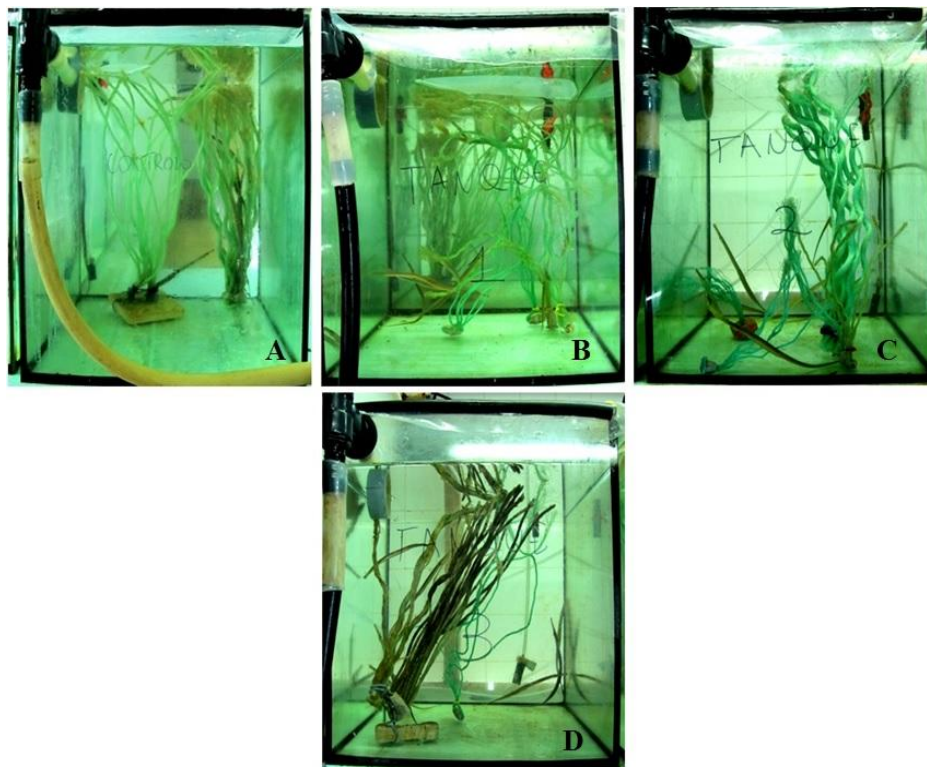
**Tabela 1** - Sequência de cores de cada indivíduo, em cada tanque (controle, 1,2 e 3). G-verde; R, cor de laranja; W-branco.

	<b>Controlo</b>	<b>Tanque 1</b>	<b>Tanque 2</b>	<b>Tanque 3</b>
<b>Indivíduos</b>	_____	GGG	GGG	GGG
	_____	RRR	RRR	RRR
	_____	WWW	WWW	WWW
	_____	GRW	GRW	GRW
	_____	RGW	RGW	RGW
	_____	WRG	WRG	WRG
	_____	WGR	WGR	WGR
	_____	GWR	GWR	GWR
	_____	RWG	RWG	RWG
	_____	GRG	GRG	GRG

Posteriormente os indivíduos foram mantidos em quatro tanques com aproximadamente 60L (Figura 5), em sistema aberto, com arejamento, fornecimento de água (cerca de 10L.h<sup>-1</sup>) e sistema de filtração no sistema de escoamento de água de modo a impedir a fuga de alimento e indivíduos em experiência. Os tanques foram ainda cobertos por uma película de plástico de modo a evitar que as marinhas transpusessem os mesmos. Os parâmetros de salinidade e temperatura foram mantidos segundo as condições naturais existentes. Em cada tanque colocaram-se 10 exemplares, sendo que um foi o controlo, isto é, nenhum dos organismos foi marcado, e os restantes três tanques foram os replicados. Os animais pertencentes ao tanque do controlo foram manuseados da mesma forma que os animais marcados, à exceção do procedimento de marcação. Diariamente, procedeu-se à 1) captura de alimento vivo (misidáceos) que, de seguida, foi proporcionado aos indivíduos, e 2) à inspeção dos tanques, de modo a verificar a eventual existência de indivíduos mortos.

A experiência teve a duração de três meses. Semanalmente, todos os indivíduos foram medidos, pesados e as suas marcas foram observadas de modo a detetar, ou não, o seu desaparecimento. Uma vez que se utilizou um elastómero fluorescente, foi necessário recorrer à utilização de uma lanterna com luz UV, para uma melhor visualização das marcas, à exceção daqueles presentes no tanque do controlo. Este ensaio experimental permitiu efetuar uma comparação dos parâmetros básicos de crescimento linear e ponderal, entre os indivíduos do tanque de controlo e dos três

replicados, bem como avaliar eventuais efeitos da marcação, tendo como base os parâmetros vitais acima indicados, e a durabilidade das marcas inseridas. Todos os dados foram submetidos ao teste estatístico One-way ANOVA (Zar, 1999). Quando se verificaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ), as médias de cada grupo de dados em análise foram comparadas com o teste de Dunnett (teste de múltiplas comparações) (Dunnett, 1955). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GRAPHPAD PRISM 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Em todos os procedimentos estatísticos, foi efetuado o teste de normalidades para todos os dados.



**Figura 5** - Ensaio experimental acerca dos efeitos da marcação e perda de marcadores. A- Tanque controlo (nenhum indivíduo marcado); B, C e D- Replicados 1, 2 e 3 (indivíduos marcados).

## 2.3 Análise genética

### 2.3.1 Extração e quantificação do ADN

O ADN dos indivíduos foi extraído segundo o método padrão Fenol-Clorofórmio (Butler, 2012a). Este é um método de extração orgânica, que se baseia na utilização de solventes orgânicos para extrair contaminantes, tais como o fenol e o clorofórmio. O

fenol é um forte desnaturante de proteínas facilitando a sua remoção dos extratos celulares, tornando-as insolúveis à fase aquosa. O clorofórmio além de desnaturante possui a propriedade de estabilizar a interface celular e aumentar a densidade das misturas permitindo uma fácil remoção das proteínas. O ADN é mais solúvel na fase aquosa da mistura, então quando centrifugadas, as proteínas e os detritos celulares são separados da fase aquosa permitindo que as moléculas de dupla cadeia de ADN possam ser transferidas de forma limpa para posterior análise (Butler, 2012a). Para que os contaminantes sejam separados na fase orgânica e que o ADN permaneça na fase aquosa, um valor correto de concentração de sal e pH devem ser utilizados (Qiagen, 2002).

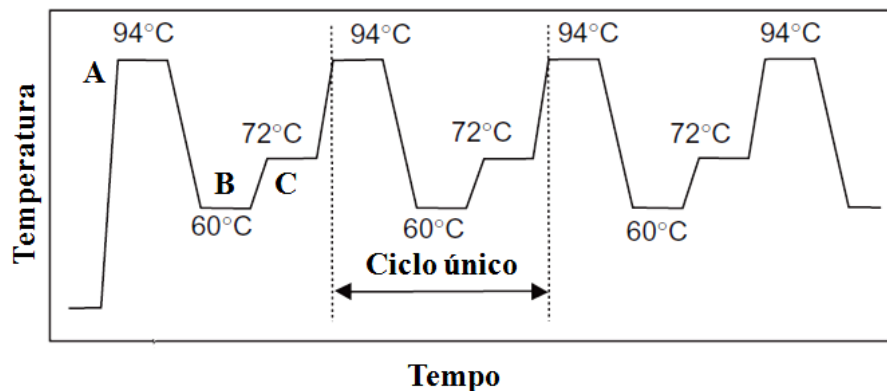
Ambas as extração de ADN, dos cotonetes e dos juvenis, foram adaptadas do protocolo descrito por Sambrook *et al.*(1989). Assim, às amostras foi-lhes adicionado solução tampão (2mM de EDTA 0.5M; 100µl Tris 1M; 20% SDS) e enzima Proteinase K e de seguida incubou-se a uma temperatura de 56°C para que as células ficassem completamente lisadas (digestão noturna). Após a digestão, adicionou-se fenol e clorofórmio álcool isoamílico sendo posteriormente retirado o sobrenadante (fase aquosa) com o ADN, e procedeu-se à precipitação das amostras com adição acetato de sódio 3M a pH 7 e etanol. Por fim o sobrenadante foi descartado e o precipitado secou a 55°C. De seguida eluiu-se o mesmo em água MiliQ. A qualidade e integridade do ADN extraído foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose. A quantificação do ADN foi realizada através do espectrofotómetro NanoDrop.

### **2.3.2 Amplificação por reações em cadeia da Polimerase (PCR)**

A reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) é um processo enzimático em que uma região específica de ADN é replicada várias vezes até que se obtenham múltiplas cópias da mesma, através da amplificação controlada pela enzima Polimerase *Taq* (isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*). É um método rápido, eficaz e realizado *in vitro* (Laudenbach *et al.*, 1999). Foram otimizados e utilizados na caracterização do genótipo de cada individuo 10 microssatélites/*loci* (3 PCR *multiplex* e 4 PCR *simplex*), apresentados na tabela 2.

Para a realização de cada reação de PCR, com um volume final de 10 µL, utilizou-se 1x tampão de reação, 0.8mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de dNTP's, entre 0.1 e 0.3µM dos

*primers* Forward e Reverse (Tabela 2), 0.2 unidades da enzima GoTaq e 1µl de ADN proveniente da extração e perfeit-se o volume com água miliQ. Esta reação, como ilustra a figura 6, inicia-se com o passo da desnaturação, em que a amostra é exposta a um aquecimento de 94°C ocorrendo assim a quebra e separação das cadeias de dupla hélice de ADN. De seguida ocorre a hibridação dos *primers* complementares conforme a sua temperatura ótima (56°C, 58°C, 60°C ou 64°C) e para que a síntese da nova cadeia se inicie eleva-se a temperatura para 72°C, cuja corresponde à ótima de funcionamento da enzima *Taq* (Hartl & Jones, 2006). Por fim, a etapa final de extensão a 72°C.



**Figura 6** - Perfil de temperaturas em ciclos térmicos da PCR. A- Desnaturação, B- Hibridação e C- Extensão. (Adaptado de Butler, 2012b).

**Tabela 2** - Descrição dos 10 *loci* de *Syngnathus typhle* (Linnaeus, 1758), utilizados no presente estudo. Locus, Primers (5'-3') (F: forward; R: reverse), motivo de repetição, temperatura de hibridação, volume de primer ( $\mu\text{M}$ ) e referência bibliográfica do respetivo *primer*.

Locus	Primer (5' - 3')	Motivo	Temperatura de hibridação	Volume de Primer ( $\mu\text{M}$ )	Referência
Styph12	F: GCGTCCCATTCACTGACTTGATTG	[(CA) <sub>12</sub> CT(CA) <sub>5</sub> ]	60°C	0.1 $\mu\text{l}$	Jones <i>et al.</i> , 1999b
	R: CCCCATGCTTCAGGCTTTCCTAT			0.2 $\mu\text{l}$	
Styph18	F: GCAGGGATGAAGTGACAATG	(CA) <sub>51</sub>	58°C	0.1 $\mu\text{l}$	Jones <i>et al.</i> , 1999b; Rispoli & Wilson, 2008
	R: AAGTGGTCCAATGAGGGC			0.2 $\mu\text{l}$	
Styph44	F: TGCCATCTTGCTGATAAGTTG	[(GT) <sub>15</sub> CT(GT) <sub>6</sub> ]	60°C	0.2 $\mu\text{l}$	Jones <i>et al.</i> , 1999b
	R: AAAACTGATGAGGAACTCTGA			0.3 $\mu\text{l}$	
Slep11	F: AAC TCA AGC GCT GCT GCA TAC	—————	64°C	0.2 $\mu\text{l}$	Genbank accession numbers: HM777471 – HM777473
	R: TCC AGG CTG GCA AGG CCT CTG AC			0.3 $\mu\text{l}$	
Slep12	F: CGT TTA TCG CAG AGG TTG CAG	—————	60°C	0.2 $\mu\text{l}$	Genbank accession numbers: HM777471 – HM777473
	R: AAC GCT AGC ACA TGT CGA TGG TCT C			0.3 $\mu\text{l}$	
Slep13	F: GCC ATT GAT GTG TGG CCA TGA TTG	—————	60°C	0.1 $\mu\text{l}$	Genbank accession numbers: HM777471 – HM777473
	R: TGA GGT ACA CCA CTC ACT GAC GAC			0.2 $\mu\text{l}$	
Sy_ty_5	F: CGTGTTGTCAGAGAGGCTGA	(AC) <sub>14</sub>	58°C	0.2 $\mu\text{l}$	Roth <i>et al.</i> , 2012
	R: TGACAACCAAAGCGTCATCT			0.3 $\mu\text{l}$	
Sy_ty_6	F: GGATTA AACCACTGTTAATTTG	(TG) <sub>12</sub>	56°C	0.1 $\mu\text{l}$	Roth <i>et al.</i> , 2012
	R: TGCCAATATCTTAACACAGTCAGC			0.2 $\mu\text{l}$	
Sy_ty_11	F: TTGGAATGAATTTATTGACCTTACAT	(GT) <sub>11</sub>	56°C	0.1 $\mu\text{l}$	Roth <i>et al.</i> , 2012
	R: TGACTGAGAGTATGTGCCAAATG			0.2 $\mu\text{l}$	
Sy_ty_24	F: CCCATTCAGGCGAACTTT	(AC) <sub>10</sub>	60°C	0.2 $\mu\text{l}$	Roth <i>et al.</i> , 2012
	R: TTGCAGTCATTCTCGCAGAC			0.3 $\mu\text{l}$	

### 2.3.3 Genotipagem

Os tamanhos dos alelos foram determinados através da adição de 8 $\mu$ L de solução de migração da amostra (7.7 $\mu$ L de formamida e 0.3 $\mu$ L de marcador molecular GeneScan<sup>TM</sup> 500Liz<sup>®</sup>) a 1.2 $\mu$ L ou 1 $\mu$ L do produto de *PCR*. De seguida as amostras sofreram uma desnaturação a 94°C durante 5 minutos e migraram num sequenciador automático Genetic Analyzer 3130XL de 16 capilares (Applied BioSystems). Os *primers* foram previamente marcados com 6 fam (Styph44, Styph12, Sy\_ty\_11, Sy\_ty\_24 e Slep13), Atto 550 (Slep11 e Slep12), Atto 565 (Styph18) e yakima yellow (Sy\_ty\_5 e Sy\_ty\_6). Posteriormente os resultados foram analisados recorrendo ao software STRand 2.3.79 (Veterinay Genetics Lab) bem como ao software R 2.15.3 (pacote MsatAllele (Alberto, 2009)) para posterior exportação dos dados (R Team Core, 2015).

### 2.3.4 Erros de genotipagem

Os erros de genotipagem verificam-se quando o genótipo de um indivíduo não corresponde ao verdadeiro genótipo e podem ocorrer em qualquer um dos passos da genotipagem (Bonin *et al.*, 2004; Pompanon *et al.*, 2005). Estes erros podem ter diversas causas, tais como variações nas sequências, quantidade e qualidade do ADN, impedindo uma amplificação eficiente e levando à ocorrência de alelos nulos e alelos falsos (Hoffman & Amos, 2005; Pompanon *et al.*, 2005), presença de artefactos bioquímicos causados por adição de um novo alelo por parte da enzima Polimerase ou por fatores humanos nomeadamente contaminações (Bonin *et al.*, 2004; Hoffman & Amos, 2005; Pompanon *et al.*, 2005).

Os erros de genotipagem afetam, quer a estimativa da frequência alélica, quer a distinção exata dos diferentes genótipos e, conseqüentemente, podem criar excesso de homozigóticos, desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, sobrestimação da consanguinidade e perturbações nas estimativas do tamanho e estrutura da população, de diversidade genética e de taxas de migração bem como na análise de parentesco. (Taberlet *et al.*, 1996, 1999; Gagneux *et al.*, 1997; Gomes, 1999; Miller *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Creel, 2003)

De modo a diminuir os efeitos dos erros de genotipagem, foi estimada a probabilidade de erro de genotipagem repetindo, separadamente, dez vezes, a amplificação pela reação de *PCR* de 6 amostras aleatórias para todos os *loci*. Utilizou-se o programa GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002) para estimar o tipo e a probabilidade dos

diferentes erros de genotipagem e construir um genótipo consenso. Este foi construído através do método de *Threshold* (com valor 2) em que, caso um alelo surja pelo menos duas vezes nos replicados de cada amostra, é aceite.

### 2.3.5 Análise de parentesco

As tabelas de caracterização genética foram elaboradas utilizando o pacote informático GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004), de modo a determinar as frequências alélicas bem como a heterozigotia esperada ( $H_e$ ) e a heterozigotia observada ( $H_o$ ). Para a análise do parentesco, recorreu-se ao programa CERVUS 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007), o qual determina o par de progenitores mais provável na origem de cada indivíduo da prole, através de marcadores genéticos. Este programa utiliza o método da exclusão que, através de incompatibilidades entre os progenitores e a descendência, rejeita indivíduos candidatos a progenitores (Jones *et al.*, 2010). De modo a distinguir estatisticamente os candidatos não excluídos, o programa calcula a probabilidade de *ratio* LOD (*Likelihood ratio*) e identifica o progenitor candidato que tem maior probabilidade de ser o verdadeiro progenitor. Um valor de LOD positivo significa que o par candidato tem maior probabilidade de ser o verdadeiro candidato, enquanto um valor de LOD negativo indica que o par candidato tem menor probabilidade de ser o verdadeiro candidato (Kalinowski *et al.*, 2007). O valor delta (diferença entre o LOD do par com maior probabilidade e o LOD do segundo mais provável) determina a confiança estatística deste teste (Kalinowski *et al.*, 2007).

Para a simulação foram consideradas as frequências alélicas de 117 progenitores (23 machos e 94 fêmeas candidatas), com uma amostragem de 60% nas fêmeas e 100% nos machos e 10 000 descendentes. Utilizou-se uma proporção de erro de 0,19 (média das taxas de erro obtidas com o programa GIMLET), e definiu-se que cada amostra contém um mínimo de 4 em 10 *loci* genotipados. Para determinar o número mínimo de reprodutores necessários para fundamentar a prole existente, utilizou-se o programa GERUD v.2.0 (Jones, 2005), um programa que reconstrói os genótipos parentais quando os progenitores não são conhecidos, na condição em que a progénie contenha apenas irmãos ou meios-irmãos (Jones, 2005).

## 2.4 Estimativa do tamanho da população

O método mais simples de estimar o tamanho da população é o método de Peterson de marca - recaptura uma vez que este método baseia-se na captura, marcação e libertação de uma amostra inicial de indivíduos (M) e numa posterior captura de uma segunda amostra (C). O número de indivíduos recapturados (marcados) nessa mesma amostra (R) permite obter a estimativa do tamanho da população (Fórmula 1).

$$\hat{N} = \frac{(M+1)(C+1)}{(R+1)} - 1 \quad (1)$$

Este método poder ser modificado e, em estudos de análise de parentesco, é uma mais-valia, pois pode ser aplicado em dados da análise genética. Assim, o tamanho da população reprodutora feminina pode ser aferido através desta abordagem modificada, em que M é o número de fêmeas que correspondem aos genótipos maternos dos embriões, uma vez que as fêmeas “marcam-se” a si próprias ao acasalar com alguns dos machos presente na amostra, C é o número de fêmeas adultas geneticamente analisadas, e R é o número de fêmeas que contribuíram para a descendência dos machos grávidos (Jones & Avise, 1997a). Dada a proporção sexual adulta observada, o tamanho da população reprodutora feminina ( $\hat{N}_{bf}$ ) traduz o tamanho da população reprodutora masculina ( $\hat{N}_{bm}$ ), e o tamanho total da população reprodutora ( $\hat{N}_b$ ).

O censo do tamanho total da população foi estimado através dos dados obtidos no estudo de marca-recaptura, usando o método original de Schnabel (Schnabel, 1938) e o método de Schumacher e Eschmeyer (Schumacher & Eschmeyer, 1943). O método de Schnabel trata amostras múltiplas como uma série de amostras do modelo de Peterson e obtém uma estimativa da população como uma média ponderada das estimativas de Peterson (Krebs, 1989) (Fórmula 2). O método de Schumacher e Eschmeyer é uma derivação do método de Schnabel mas é mais robusto (Seber, 1982) e permite a captura não aleatória de indivíduos marcados e não marcados (Edwards & Eberhardt, 1967; Mares *et al.*, 1981) (Fórmula 3). Em ambos os métodos  $C_t$  é o número total de indivíduos capturados numa amostra  $t$ ,  $R_t$  é o número de indivíduos já marcados quando capturados na amostra  $t$ , e o  $U_t$  é o número de indivíduos marcados pela primeira vez e

libertados na amostra  $t$ , enquanto no método de Schumacher e Eschmeyer  $s$  é o número total de amostras. Um intervalo de 95% foi obtido através da aproximação normal.

$$\hat{N} = \frac{\sum(C_t M_t)}{\sum(R_t M_t)} \quad (2)$$

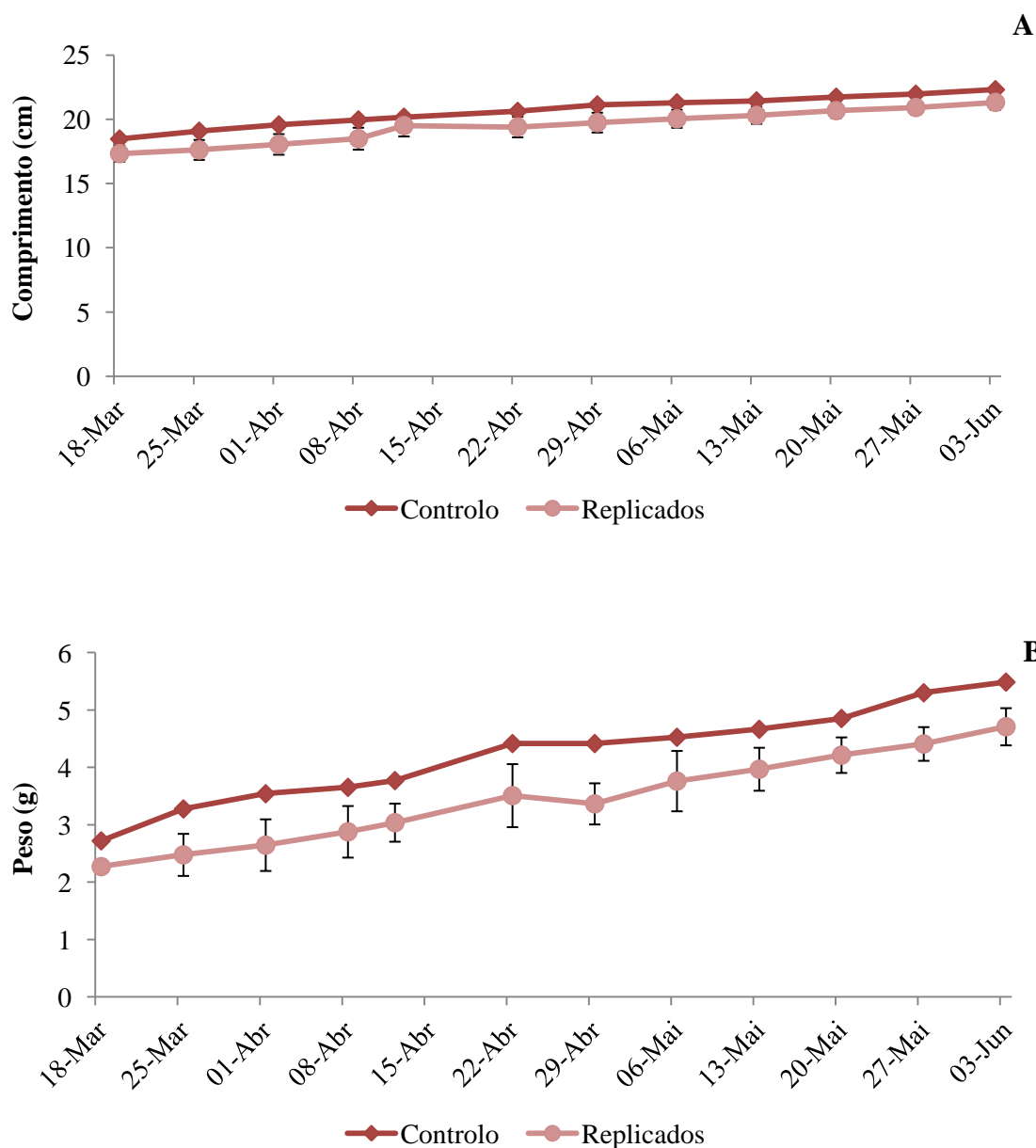
$$\hat{N} = \frac{\sum_{t=1}^s (C_t M_t^2)}{\sum_{t=1}^s (R_t M_t)} \quad (3)$$

Os modelos de marca e recaptura pressupõem que a população em estudo é uma população fechada, todos os indivíduos tem igual probabilidade de serem capturados em todas as amostras e que não existe perda de marcadores.

### 3. Resultados

#### 3.1 Efeitos da marcação e perda de marcadores

Ambos os parâmetros medidos semanalmente, peso e comprimento, apresentaram, ao longo do ensaio experimental, valores superiores nos indivíduos do controlo (não marcados) relativamente aos indivíduos dos três replicados (marcados) (Figura 7). O peso médio dos indivíduos do controlo variou entre 2.7g (inicial) e 5.7g (final) e o dos indivíduos submetidos ao tratamento, entre 2.3g (inicial) e 5.5g (final). Relativamente ao comprimento médio dos indivíduos do controlo, este variou entre 18.5cm (inicial) e 22.3cm (final) e o dos indivíduos submetidos ao tratamento variou entre 17.3cm (inicial) e 21.3cm (final). Verificaram-se diferenças significativas no comprimento e no peso entre os indivíduos do controlo e os indivíduos dos replicados (ANOVA,  $p < 0.05$ ), indicando assim que os marcadores influenciam o crescimento dos indivíduos. Observou-se ainda uma baixa taxa de mortalidade devido à injeção do marcador (2.5%). Quanto à durabilidade dos marcadores, estes mantiveram-se em boas condições de visibilidade durante todo o ensaio, começando a perder a quantidade de marcador na 12<sup>a</sup> e última semana de experiência.



**Figura 7** - Comprimento (A) e Peso (B) médio dos indivíduos marcados (quadrado) e dos indivíduos não marcados (controle, losango) desde março a junho de 2014 (18/04-03/06).

### 3.2 Marcadores moleculares

Os 10 *loci* apresentaram um total de 235 alelos, variando entre 5 e 47 alelos/*locus*, com um valor médio de 24 alelos por *locus* (tabela 3). Os valores de heterozigotia observados variam entre 0,305 e 0,805, enquanto que a heterozigotia esperada variou entre 0,406 e 0,941. A estimativa dos erros de genotipagem revelou a presença de alelos nulos em proporções elevadas (23% a 39%) nos *loci* Slep12, Slep13, Styph12 e Styph44, e de alelos falsos, variando estes entre 9% e 19% nos *loci* Slep12, Slep13,

Styph12 e Styph18. Os *loci* Slep12, Slep 13 e Styph 44 apresentam maior probabilidade de exclusão, com valores 0,431, 0,572, e 0,614, respectivamente. Relativamente ao coeficiente de consanguinidade, este apresenta um valor médio de 0.2 ao longo dos dez *loci*.

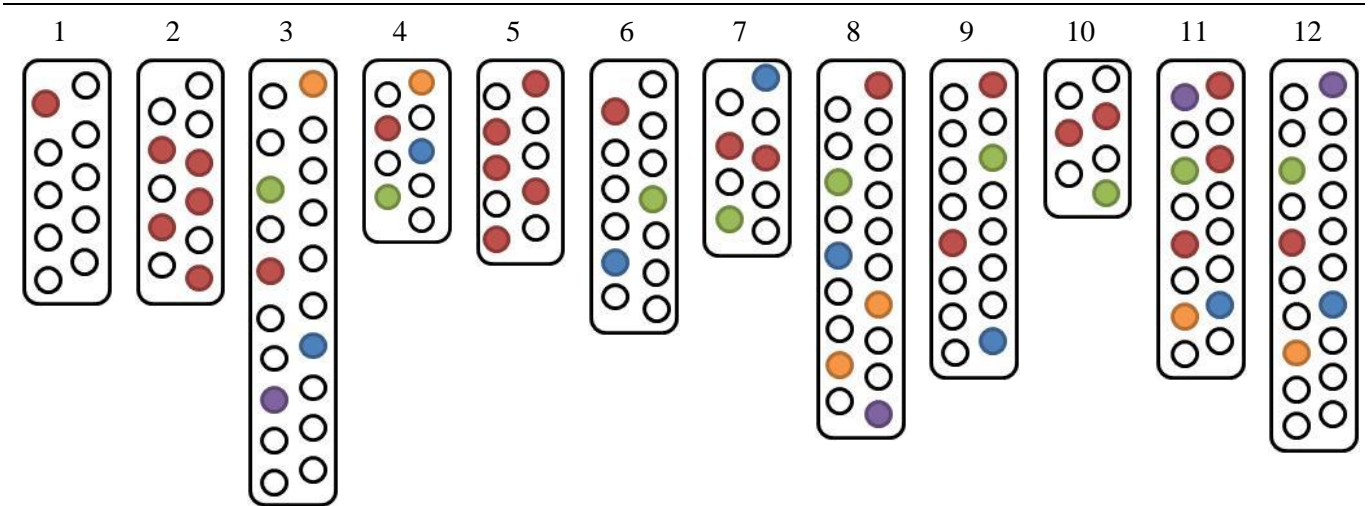
**Tabela 3** - Análise da variação genética dos dez *loci* utilizados no presente estudo (K; número de alelos; Ho; Heterozigotia observada; He; Heterozigotia esperada; Prob. Exclusão; Probabilidade de exclusão; HF; Homozigóticos falsos ou alelos nulos; FA; Falsos alelos, Fis; Coeficiente de consanguinidade).

Locus	K	Ho	He	Prob. de exclusão	Tipos de erros		Fis
					HF	FA	
Slep 11	47	0.7945	0.9407	0.120	0.000	0.000	0.157
Slep 12	12	0.4898	0.5858	0.626	0.229	0.127	0.165
Slep 13	8	0.3052	0.4063	0.745	0.375	0.089	0.25
Styph 12	32	0.6092	0.8796	0.231	0.241	0.19	0.309
Styph 18	37	0.5131	0.9327	0.132	0.000	0.139	0.451
Styph 44	5	0.5768	0.4594	0.757	0.385	0.000	-0.254
Syty_5	10	0.6925	0.7859	0.628	0.000	0.000	0.12
Syty_6	22	0.6414	0.8119	0.132	0.000	0.000	0.211
Syty_11	18	0.4313	0.5505	0.402	0.000	0.000	0.218
Syty_24	44	0.8047	0.9319	0.354	0.000	0.000	0.138
Todos os <i>loci</i>	235	0.5859	0.7285	-	-	-	0.177

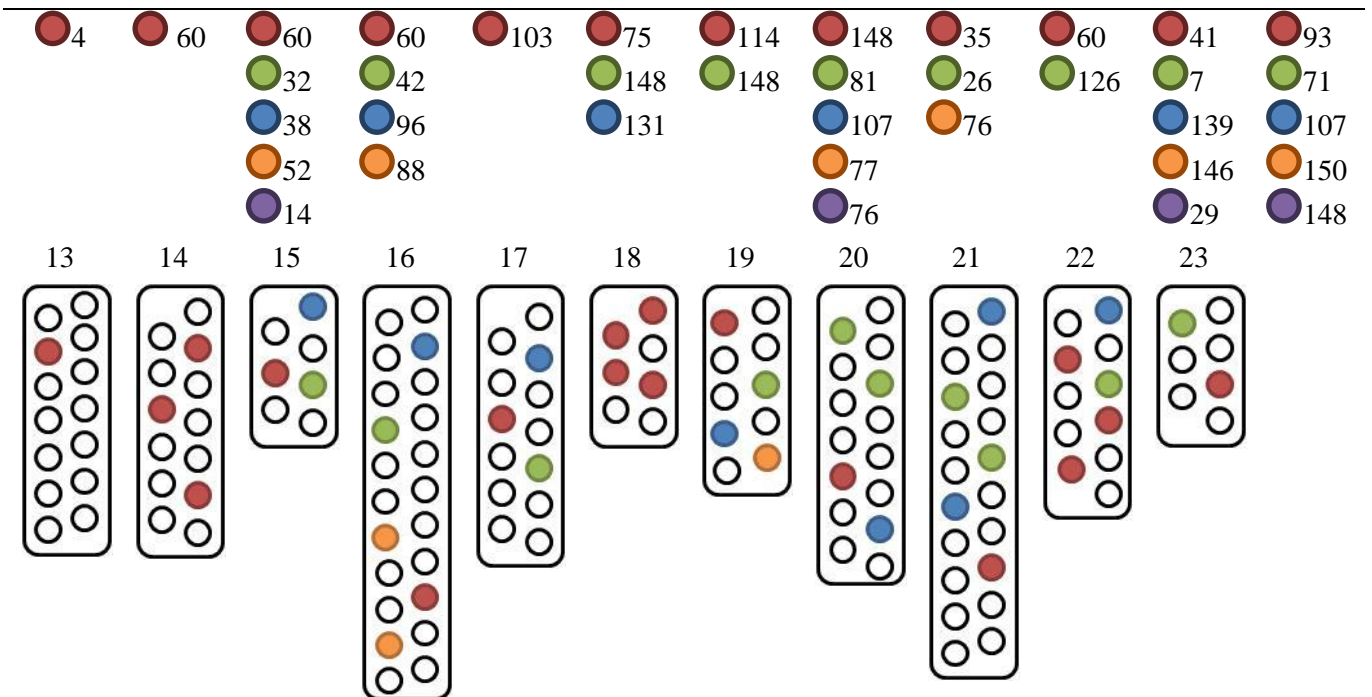
### 3.3 Análise de parentesco

O programa CERVUS atribuiu, a todos os descendentes, o seu pai conhecido sem nenhuma discordância, verificando-se, assim, uma total confiança na paternidade das bolsas de juvenis de cada macho (Figura 8). Os resultados obtidos diferem da simulação efetuada por este programa, que previa a atribuição da maternidade a 28 % dos descendentes com 95% de confiança e 53% dos descendentes com 80% de confiança. Os restantes 19% dos descendentes previam-se não lhes serem atribuídos paternidade. Entre os juvenis analisados, 96 (32%) foram atribuídos a fêmeas capturadas durante a amostragem, apresentando compatibilidades em, pelo menos, 4 ou mais *loci*. Os restantes 205 descentes (68%) mostraram incompatibilidades em, pelo menos 2, ou mais, *loci*. No total, 70 fêmeas contribuíram para as bolsas dos machos, das quais 46 foram capturadas durante a amostragem.

Bolsas de embriões e a identidade do macho correspondente



Juvenis atribuídos à fêmea amostrada (ID)



Dentro de cada bolsa:  
 ○ Juvenis sem fêmea atribuída  
 ● Juvenis com fêmea atribuída  
 - Cor igual: irmãos  
 - Cor diferente: Meios-irmãos

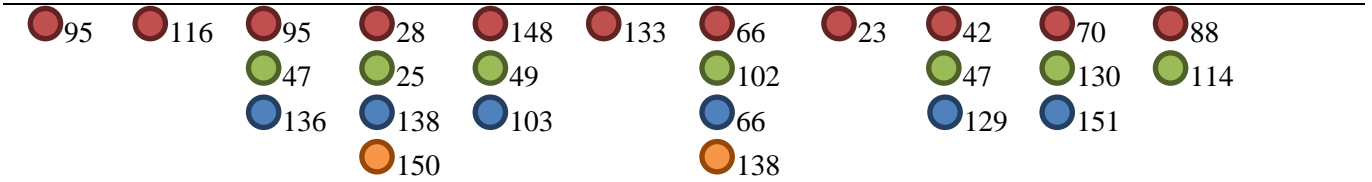


Figura 8 - Distribuição espacial dos juvenis com mãe atribuída e sem mãe atribuída e dos juvenis irmãos e meio-irmão dentro da bolsa de cada macho.

Em média cada macho deu à luz 39 descendentes, variando entre 10 e 67 descendentes. Cada macho recebeu ovos de diversas fêmeas. O número médio de acasalamentos bem-sucedidos por macho foi de  $2,87 \pm 0,20$  (erro padrão), variando entre dois e cinco acasalamentos. Relativamente ao número médio de acasalamentos bem-sucedidos, por parte das fêmeas, este foi de  $1,37 \pm 0,13$  (erro padrão). Verificou-se a existência de juvenis com a mesma mãe mas em diferentes bolsas dos machos, o que indica que as fêmeas também acasalam com diferentes machos. Duas das fêmeas capturadas (fêmea 60 e 148) contribuíram para quatro bolsas diferentes, uma fêmea (fêmeas 88) contribuiu para três bolsas diferentes e oito fêmeas (fêmeas 42, 47, 66, 76, 95, 107, 138 e 150) contribuíram para duas bolsas diferentes.

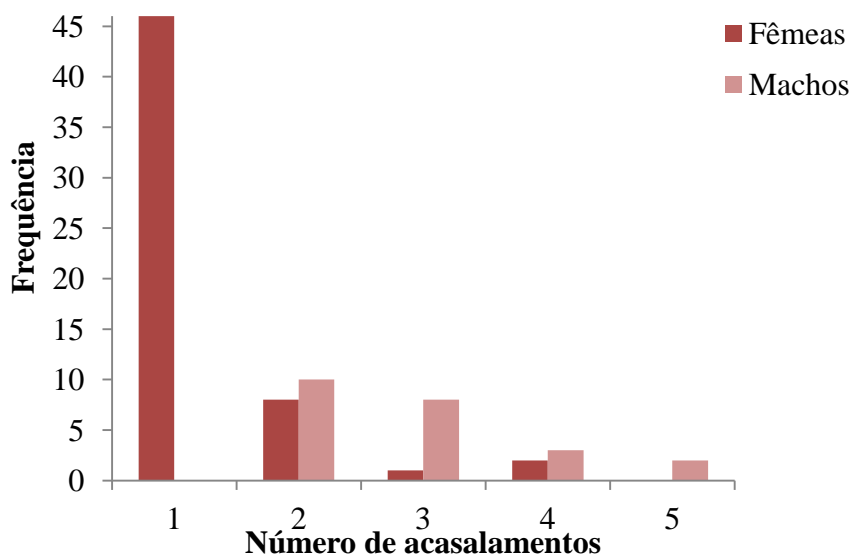
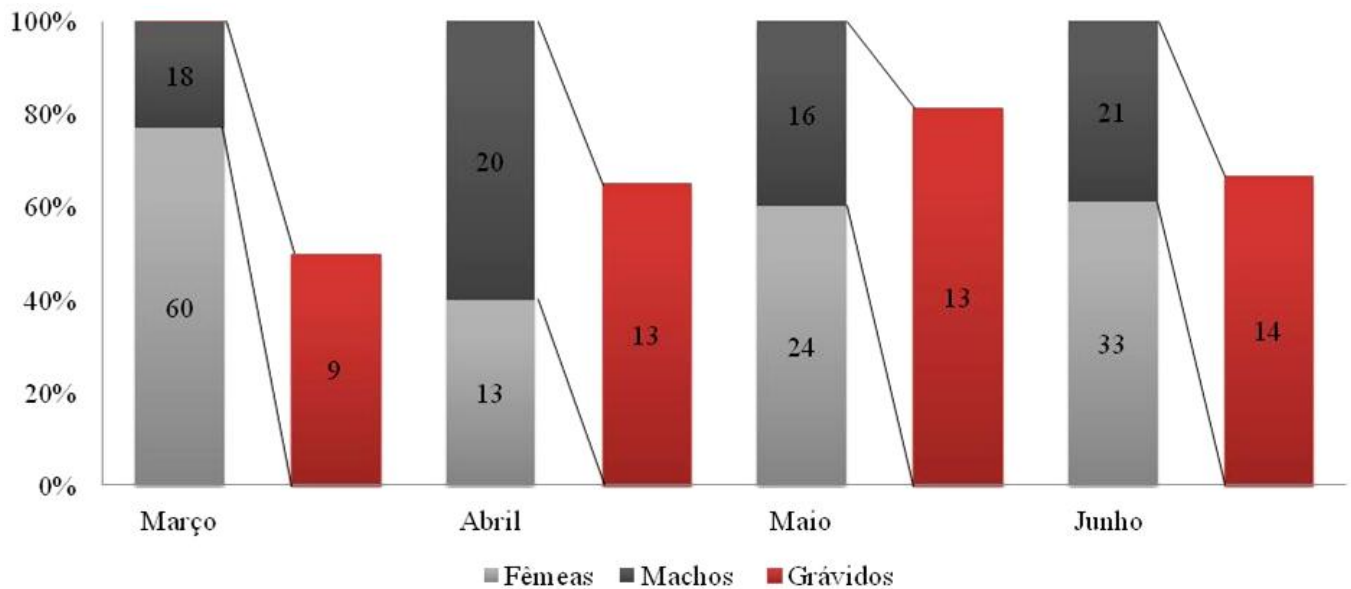


Figura 9 - Número de acasalamentos de machos e fêmeas *S. typhle*.

### 3.4 Dinâmica populacional

A estrutura da população observada sofreu alterações ao longo dos quatro pontos de amostragem, representadas na figura 10. A população, no mês de março, foi composta maioritariamente por fêmeas (77%; n=60). Em abril o número de fêmeas diminuiu (39% n=13) e a população foi constituída principalmente por machos (61%; n= 20). No mês de maio e de junho as percentagem de fêmeas e machos aumentaram, à exceção da percentagem de machos que, em junho, sofreu uma pequena diminuição. Em maio a

percentagem de fêmeas aumentou para 60% (n=24) e de machos para 40% (n=16). Em junho, a percentagem de fêmeas aumentou para 61.1% (n=33). A proporção sexual foi atribuída às fêmeas ao longo de todo o estudo à exceção do mês de Abril. O número de machos com sinais de atividade reprodutiva aumentou durante os meses de estudo.



**Figura 10** - Estrutura populacional e número de machos grávidos durante o período de estudo.

### 3.5 Estimativas do tamanho da população

Durante o estudo de marcação-recaptura, foram marcados no total 205 indivíduos, dos quais 12 foram recapturados. A estimativa do tamanho total da população variou entre 1128 (Método de Schnabel) e 1388 (Método de Schumacher & Eschmeyer) (Tabela 4), com amplos intervalos de confiança de 95% devido à baixa taxa de recaptura. Através da análise parentesco, verificou-se que 70 fêmeas contribuíram para as bolsas dos machos. Das 130 fêmeas capturadas, 46 foram identificadas como progenitoras. Com a utilização destes valores no método modificado de Peterson, a estimativa do tamanho da população reprodutora feminina foi obtida com um valor 235 fêmeas (intervalos de confiança de 95%: 167 – 325). Dada a proporção sexual adulta observada, esta estimativa traduz o tamanho da população reprodutora masculina ( $\hat{N}_{bm}$ ) com um valor de 136 machos reprodutores, e o tamanho total da população reprodutora ( $\hat{N}_b$ ) com um valor de 371 indivíduos.

**Tabela 4-** Conjunto de dados e métodos utilizados na obtenção das estimativas do tamanho da população de *S. Typhle*.

Conjunto de dados	Tamanho da população	Modelo	Estimativa	Intervalo de confiança (95%)
Marca-recaptura	Censo do tamanho total da população	Método de Schnabel	1128	721 – 2192
		Método de Schumacher & Eschmeyer	1388	695 – 2258
Genética	Tamanho da população reprodutora feminina ( $\hat{N}_{bf}$ )	Método de Peterson	235	167 – 325
	Tamanho da população reprodutora masculina ( $\hat{N}_{bm}$ )	Traduzido a partir de $\hat{N}_{bf}$ utilizando a razão sexual observada	136	–
	Tamanho total da população reprodutora ( $\hat{N}_b$ ).	Soma de $\hat{N}_{bf}$ e $\hat{N}_{bm}$	371	–

## 4. Discussão

### 4.1 Efeitos da marcação e perda de marcadores

A marcação externa com VIE tem sido uma das técnicas de identificação e marcação mais utilizada em estudos da biologia dos Syngnathideos (Caldwell *et al.*, 2011). A maioria das técnicas de marcação deve ser duradoura e sem necessidade de manutenção (de modo a que permita uma monitorização a longo prazo e estimar variáveis biológicas) e devem ter também efeitos reduzidos no bem-estar e no comportamento animal (Jepsen *et al.*, 2002; Bridger & Booth, 2003; Cooke, 2003; Murchie *et al.*, 2004), bem como na mortalidade, crescimento e reprodução. Desta forma, contribui-se para que os resultados de estudos que utilizem a técnica de marcação reflitam parâmetros tão precisos quanto possível da população em estudo (Frederick, 1997; Willis & Babcock, 1998).

No presente estudo verificou-se que os marcadores tiveram um efeito negativo no crescimento (linear e ponderal) dos indivíduos marcados, relativamente aos não marcados. No entanto, outros estudos que utilizaram esta técnica de marcação demonstraram, que, no geral, o efeito do VIE é limitado. Estes mesmos estudos

consideraram que, no meio selvagem, esta técnica não tem efeitos biológicos significativos tendo em conta que as diversas variáveis ambientais presentes no meio (como por exemplo, parâmetros físico-químicos e disponibilidade de alimento) têm uma maior influência sobre o crescimento dos indivíduos (Dewey & Zigler, 1996; Olsen & Vøllestad, 2001; Woods & Martin-Smith, 2004). Contudo, ainda que a aplicação desta técnica revele efeitos mínimos, ainda não foi atribuída uma causa específica para a diferença existente no crescimento entre os indivíduos marcados e não marcados. Duas hipóteses são propostas para explicar esta desigualdade:

- 1) O material biocompatível de que é composto o elastómero, pode não ter influência na mortalidade, no entanto poderá ter um efeito desconhecido no organismo dos espécimes influenciando deste modo o seu desenvolvimento. Este efeito pode mudar de espécie para espécie, daí o facto de afetar negativamente umas espécies e não outras.
- 2) Após a aplicação do elastómero e do stress associado, os indivíduos poderão ter estado durante um período de tempo sem efetuarem uma alimentação adequada para as suas necessidades, influenciando assim o seu desenvolvimento. Em oposição, os indivíduos não marcados continuaram a desenvolver-se normalmente, causando assim diferenças significativas no crescimento entre os indivíduos marcados e não marcados.

De modo a minimizar os efeitos negativos desta técnica em parâmetros como o crescimento, surgiu o método da foto identificação. Este é um método inovador que foi utilizado em Syngnathideos, especificamente na espécie *Hippocampus guttulatus* (Correia *et al.*, 2014) e permite realizar estudos de marcação – recaptura de forma não invasiva. Neste caso a marca natural (padrão de pontos) presente nos cavalos-marinhos permite a utilização da foto identificação, no entanto, nas marinhas, esse tipo de padrão não está bem definido e a aplicação deste método pode não permitir a obtenção de dados fidedignos. Assim, é essencial a descoberta e a aplicação de novos métodos de marcação que não comprometam o desenvolvimento normal dos indivíduos.

Não se verificou mortalidade causada pelo processo de marcação, o que está em concordância com outros estudos realizados, em que a mortalidade associada com a marcação foi nula, ou não significativamente diferente, entre os indivíduos do controlo e os marcados, nomeadamente em espécies como *Hippocampus guttulatus*, *Lepomis*

*macrochirus*, *Pagrus auratus* (Dewey & Zigler, 1996; Bailey *et al.*, 1998; Willis & Babcock, 1998; Olsen & Vøllestad, 2001; Woods & Martin-Smith, 2004).

Geralmente, os marcadores VIE apresentam alta retenção se forem corretamente aplicados (Woods & Martin-Smith, 2004). No final do ensaio experimental, os marcadores começaram a ser menos visíveis, quer a olho nu, quer com a utilização da luz UV, indicando que a aplicação dos marcadores, ainda que seguindo as instruções do sistema manual de injeção de elastômero, não foi efetuada da melhor forma devido à inexperiência na realização do processo.

## 4.2 Análise parental e microssatélites

As diversas características presentes nos microssatélites, particularmente o facto de serem altamente polimórficos, codominantes e utilizados com base na técnica de PCR (Jones *et al.*, 2010) , fazem com haja preferência na sua utilização relativamente a outros marcadores moleculares, em diversos campos como, entre outros, a ecologia. Estes marcadores permitem obter uma maior diversidade de informação genética, que em complementaridade com informações provenientes de outros campos sem ser a ecologia (Guichoux *et al.*, 2011; Gruber & Adamack, 2014), conseguem proporcionar soluções e respostas a questões que tanto podem estar relacionadas apenas com indivíduos dentro de uma população, como entre populações ou entre comunidades (Hartl & Clark, 1997; Selkoe & Toonen, 2006; Blanchet, 2012).

Para que análise de parentesco seja bem-sucedida, são necessários requisitos importantes como marcadores altamente polimórficos ou um grande número de marcadores com um nível de polimorfismo baixo ou moderado (Jones *et al.*, 2010), bem como uma amostra representativa da população (Oddou-Muratorio *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2010). Neste estudo, no qual foram utilizados 10 microssatélites, todos os indivíduos foram genotipados com sucesso em, pelo menos, cinco dos dez *loci*, o que indica que as amostras genéticas apresentam uma qualidade adequada. Quanto ao polimorfismo dos *locus* utilizados, estes mostraram uma média de 26 alelos por *locus*, sendo que dois dos *loci* apresentaram baixo polimorfismo (7 e 10 alelos/*locus*) o que pôde diminuir o grau de polimorfismo do conjunto dos *loci*.

Em comparação com estudos de parentesco anteriormente realizados em *Syngnathus spp.*, que utilizam entre 2 e 6 *locus* (Jones & Avise, 1997a, 1997b; Jones *et al.*, 1999b, 2000; McCoy *et al.*, 2001; Wilson, 2006) e apresentam um alto grau de polimorfismo, o

número de *loci* utilizados neste estudo aparentou ser relativamente elevado mas, em contrapartida, o polimorfismo observado é suficientemente alto (à exceção dos *locus Styph 44* e *Slep 13*) e fazem com que os *loci* utilizados sejam adequados à atribuição da maternidade. A maternidade foi atribuída maioritariamente com 80% de confiança indicando, assim, a adequabilidade dos *loci* utilizados.

Contudo, verificou-se uma taxa de erro a 19%, que, ainda que reduzida, pode afetar, quer a frequência alélica, quer a determinação exata dos diferentes genótipos e, em consequência, as estimativas de diversidade genética e paternidades por se comportarem como possíveis fatores de falsa exclusão (Marshall *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2004). Estimativas erróneas da frequência alélica podem levar à criação de um excesso de homozigóticos (Taberlet *et al.*, 1996; Gagneux *et al.*, 1997a), sendo, este excesso, causado principalmente pela existência de alelos nulos.

No presente estudo, verificou-se uma grande incidência de alelos nulos nos *locus Slep12*, *Slep13*, *Styph 12* e *Styph 44*, o que, em conjunto com os erros de genotipagem, poderá ter tido efeito na percentagem de confiança com que foi atribuída a maternidade. Uma baixa taxa de alelos nulos pode ter um impacto negligenciável em diversos tipos de análise, no entanto, para alguns tipos de análises de parentesco pode ter impactos substanciais (Dakin & Avise, 2004). Apesar da possível influência da presença de erros de genotipagem e da presença de alelos nulos, todas as razões referidas acima indicam que a atribuição da maternidade foi bem-sucedida.

### **4.3 Biologia reprodutiva: sistema de acasalamento e seleção sexual**

Todos os membros da família Syngnathidae são caracterizados por prestarem um cuidado uni parental, em que os machos transportam os embriões e estes desenvolvem-se nas suas bolsas ou anexados ao seu ventre. Este fenómeno de gravidez masculina faz com que esta *taxa* seja especialmente atrativo, na perspetiva do estudo dos sistemas de acasalamento e de parentesco (Jones & Avise, 2001; Avise *et al.*, 2002).

No presente estudo, cada macho recebeu ovos de múltiplas fêmeas, ao longo de uma única gravidez. O número médio de acasalamentos bem-sucedidos, por cada macho, foi de 2.9, variando entre 2 e 5 fêmeas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriormente realizados em *S. typhle* (Berglund *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1999b;

Rispoli & Wilson, 2008). A taxa de acasalamento múltiplo em *Syngnathus* pode variar devido a fatores ambientais, demográficos (Shuster & Wade, 2003; Mobley & Jones, 2009) e ecológicos tais como, a densidade populacional e a escolha de parceiros. Esta escolha é por sua vez influenciada pelo risco de predação, proporção sexual operacional e disponibilidade de encontros (Berglund & Rosenqvist, 1993; Berglund, 1994, 1995; Fuller & Berglund, 1996). Através das análises genéticas realizadas em *Syngnathus*, verifica-se que a multiplicidade de acasalamentos varia consoante a espécie, podendo observar-se desde taxas de acasalamentos múltiplos baixas, como em *S. floridae* (Jones & Avise, 1997a) a altas, por exemplo *S. typhle* (Jones *et al.*, 1999b), sendo estas taxas influenciada pelos fatores acima referidos.

Cada macho grávido recebeu, em média, 39 ovos, variando entre 10 e 67. Em comparação com outros estudos realizados em *S. typhle*, o valor registado neste estudo encontra-se relativamente abaixo dos valores já documentados. Segundo Jones *et al.*, (1999b), cada macho recebeu em média 44.8 ovos e, segundo Rispoli & Wilson, (2008), estudo realizado com indivíduos provenientes da Ria Formosa, cada macho recebeu, em média, 70.6 ovos. A temperatura comporta-se como um importante parâmetro na biologia reprodutora, pois determina a duração da época de reprodução influenciando, assim, o número de ovos transferidos para as bolsas dos machos (Riccatto *et al.*, 2003).

Geralmente, em *Syngnathus*, o acasalamento múltiplo, por parte dos machos, aumenta com a latitude e diminui com o decréscimo da temperatura. Em *S. typhle*, o aumento latitudinal é acompanhado pelo aumento do acasalamento múltiplo, bem como pelo aumento do tamanho corporal, outro dos fatores determinantes no número de ovos nas bolsas dos machos (Silva *et al.*, 2008; Mobley & Jones, 2009). O comprimento dos machos grávidos neste estudo (média de 16.9cm) é semelhante aos valores apresentados no estudo de Rispoli & Wilson, (2008) (média de 16.64). Este mesmo estudo foi realizado entre junho de e agosto, razão provável para que o número médio de ovos por macho seja maior e, por isso mesmo, é de esperar que o número de ovos aumente, ao longo da época reprodutora.

A contribuição de diversas fêmeas para mais de uma bolsa diferente identificada neste estudo evidencia o sistema múltiplo de acasalamento, por parte das fêmeas desta espécie, como reportado em estudos anteriores (Berglund *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1999b; Rispoli & Wilson, 2008). Dado que as fêmeas de *S. typhle* na natureza têm acasalamentos múltiplos (Jones *et al.*, 1999b), e que não foi realizada uma amostragem

extensa da população, a taxa de acasalamentos múltiplos por parte das fêmeas neste estudo pode ter sido subestimada. Tendo em conta esta possível subestimação e o registo de que as fêmeas acasalam diversas vezes, o sistema genético de acasalamento de *S. typhle* pode ser descrito como poliginandrico, em que ambos, machos e fêmeas, acasalam diversas vezes, o que vai de encontro com diversos estudos realizados nesta espécie (Jones *et al.*, 1999a; Rispoli & Wilson, 2008).

Distintos sistemas de acasalamento têm sido documentados na família Syngnathidae desde a monogamia, passando pela poliginandria à poliandria (Jones & Avise, 1997a, 1997b; Jones *et al.*, 1999b; McCoy *et al.*, 2001; Mobely & Jones, 2007; Rispoli & Wilson, 2008; Mobley & Jones, 2009). O sistema genético de acasalamento está indiscutivelmente relacionado com a direção e a força da seleção sexual (Jones & Avise, 2001). Geralmente, as fêmeas têm uma maior implicação no cuidado parental do que os machos e a competição por acasalamento é predominante nos machos (Jones & Avise, 2001; Kokko & Jennions, 2008). No entanto, o facto de que, nesta família, as fêmeas exibem uma maior competição por acasalar do que os machos, juntamente com um maior investimento parental por parte dos machos, leva à reversão do papel sexual, tornando os machos mais seletivos do que as fêmeas (Berglund & Rosenqvist, 1993).

Um fator importante na competição por encontros é o tamanho corporal (comprimento) das fêmeas. Os machos apresentam preferência por fêmeas maiores, pois estas são caracterizadas por produzirem ovos maiores, possuírem maior probabilidade de transferir maior quantidade de ovos e por originarem uma descendência maior (Berglund *et al.*, 1986a, 1986b; Ahnesjö, 1992). Neste estudo, não foi realizada a análise deste parâmetro, pois não havia dados suficientes para uma análise fiável, mas, a partir da informação obtida, as fêmeas que foram identificadas como mães dos juvenis analisados, apresentaram maior comprimento relativamente às fêmeas que não foram identificadas como progenitoras.

A intensidade da competição por acasalamentos é determinada pela proporção sexual (Jones *et al.*, 2002). A proporção sexual adulta aqui presente exibiu uma tendência para ser atribuída às fêmeas, sugerindo, assim, uma competição por encontros mais intensa por parte das fêmeas, o que está em concordância com a relação entre estes dois parâmetros, acima referida. Estes resultados vão ao encontro de observações anteriormente reportadas (Berglund *et al.*, 1986a; Vincent *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1999b, 2000; Rispoli & Wilson, 2008)

#### 4.4 Dinâmica populacional e estimativa do tamanho de população

A estrutura da população sofreu modificações ao longo dos meses de amostragem como já referido anteriormente, registando-se um claro aumento do número de machos de grávidos de março a junho. Segundo Freire, (2004), a época reprodutiva vai desde fevereiro a outubro e existem dois períodos de maior atividade reprodutiva, entre junho e julho e entre setembro e outubro. Assim, o aumento progressivo do número de machos grávidos está de acordo com este estudo. Uma vez que o período de amostragem do presente estudo terminou em junho, e que o pico de temperatura se regista em agosto, fator determinante da época de reprodução, é de esperar um aumento no número de machos grávidos.

De modo a melhorar o conhecimento acerca desta população, foi então estimado o tamanho da população através das duas abordagens já referidas. Numa das abordagens, o método tradicional de marcação-recaptura, foram utilizados dois métodos, o de Schnabel e o de Schumacher & Eschmeyer, ambos indicados para serem utilizados em populações fechadas como aparenta ser a espécie *S. typhle*. Ambos os métodos devem cumprir as premissas de que o tamanho da população é constante, sem recrutamento ou mortes, a amostragem é aleatória e todos os indivíduos têm igual oportunidade de serem capturados e, por último, os indivíduos não perdem os marcadores.

A violação destas premissas pode levar a uma incorreta estimativa do tamanho da população. Relativamente à primeira premissa, excepcionalmente algum estudo a satisfaz. No entanto, é recomendado um curto período de tempo para realização de estudo de marcação, de modo a que a taxa de nascimentos e de morte ou a migração tenham pouco impacto na estimativa (Seber, 1982). No nosso caso, os dados para o estudo de marcação – recaptura foram recolhidos num período relativamente curto, indo ao encontro da suposição. Conforme a segunda premissa, a amostragem foi, de facto, realizada aleatoriamente. O facto de os indivíduos não permanecerem fielmente junto dos seus companheiros, como os cavalos-marinheiros, ou/e moverem-se livremente na área onde normalmente se alimentam e acasalam, faz com que, aquando da amostragem, esta seja feita aleatoriamente. Em relação à última premissa, a perda de marcadores, não se verificou relevante no presente (a substancial perda foi devido, provavelmente, à incorreta colação do marcador), sendo, assim, cumpridas as três premissas, o que pode validar a estimativa do tamanho da população por este método. No entanto, é necessário ter em atenção que, devido à baixa taxa de recaptura, o intervalo de confiança de 95%

tem maior amplitude e os valores obtidos não podem ser dados como inteiramente exatos.

Comparando esta primeira abordagem com a baseada na análise de parentesco da população amostrada, verifica-se que o tamanho da população reprodutora apresentou um valor muito mais baixo que o censo do tamanho total da população. Através do estudo de marcação-recaptura, o censo da população variou entre 1128 – 1388, valor muito acima relativamente à estimativa do censo da população reprodutora, obtida através da análise genética, que apresenta um valor de 371 reprodutores adultos. Uma vez que ainda não existem estudos que documentem a aplicação de ambas as abordagens para a determinação do tamanho da população desta espécie, várias hipóteses poderão explicar esta discrepância de valores:

- (1) Uma vez que o tamanho da população reprodutora feminina traduz o tamanho da população reprodutora utilizando a proporção sexual, sugere que nem toda a população reprodutora se tenha reproduzido durante o período de amostragem. Através da análise, verificou-se a multiplicidade de acasalamentos por parte das mesmas, razão pela qual não seria de esperar um valor baixo para o tamanho da população reprodutora. No entanto, alterações ambientais podem ter influenciado o número de acasalamentos, refletindo-se, assim, no tamanho da população reprodutora;
- (2) A área de amostragem, foi, provavelmente, reduzida, acompanhada de um possível acasalamento não aleatório, por parte das fêmeas. O sistema genético de acasalamento poliginandrico presente nesta espécie e o facto de que as fêmeas maiores aparentam possuir características mais atrativas para os machos, pode ter levado a uma maior taxa de acasalamento por parte destas fêmeas. Assim, o tamanho da população reprodutora feminina pode estar subestimado por, de certa forma, excluir as fêmeas com menor tamanho;
- (3) O período de amostragem não abrangeu um dos picos de atividade reprodutiva da época de reprodução (junho e julho), abrangendo, apenas, o início de junho. Esta pode ser uma razão pela qual não se tenham obtido informações genéticas da atividade reprodutora num dos seus máximos e, em consequência, uma estimativa do tamanho da população reprodutora baixa.

Nenhuma das três hipóteses aqui apresentadas pode, sozinha, explicar o porquê desta estimativa. No entanto, a combinação das três poderá oferecer uma melhor explicação para a estimativa do tamanho da população reprodutora apresentada neste estudo.

## **5. Conclusão**

Com o presente estudo reforçou-se e comprovou-se novamente o sistema genético de acasalamento já caracterizado anteriormente nesta espécie, o sistema de acasalamento poliginandrico, o qual é descrito por presenciar o acasalamento múltiplo, por parte de ambos os sexos. As estimativas do tamanho da população demonstraram diferenças acentuadas, dependendo do método utilizado. Os valores obtidos através no método tradicional, marcação-recaptura, resultaram ser muito mais elevados que os dados resultantes da análise genética. Foram então propostas algumas hipóteses para explicar esta diferença, relacionando variáveis como a área de amostragem, época de reprodução, sistema de acasalamento bem como a proporção sexual observada e a seleção sexual.

A aplicação de ambas as abordagens, permite a combinação do censo do tamanho da população e o tamanho da população reprodutora, proporcionando assim uma maior e melhor informação sobre a ecologia reprodutora, neste caso em particular acerca do sistema de acasalamento e a sua relação com força e direção sexual. Esta combinação permite também analisar possíveis alterações ambientais que possam alterar e influenciar ambas as estimativas. Deste modo, a utilização de ambas as abordagens em conjunto é vantajoso e possibilita um melhor estudo desta espécie do que utilizando cada abordagem individualmente.

Numa perspectiva futura, a investigação de diversos aspetos da biologia desta espécie, na Ria Formosa, devem ser aprofundados, na medida em que ainda existem lacunas que necessitam ser preenchidas. Um melhor entendimento acerca da biologia reprodutora ao longo de toda a época de reprodução, bem como a sua relação com a seleção sexual e os parâmetros biológicos característicos da ria formosa, é uma dessas lacunas. Uma análise mais extensa e detalhada acerca do tamanho da população, quer no canal do Ancão

como nos outros canais existentes, é também uma mais-valia, para que possam ser feitas comparações e assim perceber o estado atual da população, e caso seja necessário, aplicar medidas de conservação.

## 6. Referências

- Ahnesjö I., 1992. Consequences of male brood care; weight and number of newborn in a sex-role reversed pipefish. *Functional Ecology*, 6, 274–281.
- Alberto F., 2009. MsatAllele\_1.0: An R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *Journal of Heredity*, 100, 394–397.
- Alcântara A., Cravo A., & Jacob J., 2012. Variability of nutrients and chlorophyll a in Ancão inlet during a spring tidal cycle in April 2009. *Ciencias Marinas*, 38, 161–177.
- Andersson M., 1994. *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Avise J., 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.,
- Avise J.C., Jones A.G., Walker D., & DeWoody J.A., 2002. Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lessons for ecology and evolution. *Annual review of genetics*, 36, 19–45.
- Bailey R.E., Irvine J.R., Dalziel F.C., & Nelson T.C., 1998. Evaluations of Visible Implant Fluorescent Tags for Marking Coho Salmon Smolts. *North American Journal of Fisheries Management*, 18, 191–196.
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikri L., & Bonhomme F., 2004. Genetix 4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. .
- Berglund A., 1994. The operational sex ratio influences choosiness in a pipefish. *Behavioral Ecology*, 5, 254–258.
- Berglund A., 1995. Many mates make male pipefish choosy. *Behaviour*, 132, 213–218.
- Berglund A. & Rosenqvist G., 1990. Male limitation of female reproductive success in a pipefish: effects of body-size differences. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 27, 129–133.
- Berglund A. & Rosenqvist G., 1993. Selective males and ardent females in pipefishes. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32, 331–336.
- Berglund A., Rosenqvist G., & Bernet P., 1997. Ornamentation predicts reproductive success in female pipefish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 40, 145–150.

- Berglund A., Rosenqvist G., & Svensson I., 1986a. Reversed sex roles and parental energy investment in zygotes of two pipefish (Syngnathidae) species. *Marine Ecology Progress Series*, 29, 209–215.
- Berglund A., Rosenqvist G., & Svensson I., 1986b. Mate choice, fecundity and sexual dimorphism in two pipefish species (Syngnathidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19, 301–307.
- Berglund A., Rosenqvist G., & Svensson I., 1988. Multiple matings and parental brood care in the pipefish *Syngnathus typhle*. *Oikos*, 51, 184–188.
- Berglund A., Rosenqvist G., & Svensson I., 1989. Reproductive success of females limited by males in two pipefish species. *American Naturalist*, 133, 506–516.
- Bernet P., Rosenqvist G., & Berglund A., 1998. Female-female competition affects female ornamentation in the sex-role reversed pipefish *Syngnathus typhle*. *Behaviour*, 135, 535–550.
- Blanchet S., 2012. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. *Fisheries Management and Ecology*, 19, 120–132.
- Bonin A., Bellemain E., Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., & Taberlet P., 2004. Invited Review How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13, 3261–3273.
- Bord S., Druilhet P., Gasqui P., Abrial D., & Vourc'h G., 2014. Bayesian estimation of abundance based on removal sampling under weak assumption of closed population with catchability depending on environmental conditions. Application to tick abundance. *Ecological Modelling*, 274, 72–79.
- Bridger C.J. & Booth R.K., 2003. The Effects of Biotelemetry Transmitter Presence and Attachment Procedures on Fish Physiology and Behavior. *Reviews in Fisheries Science*, 11, 13–34.
- Brockmann H., 1994. Sperm competition in horseshoe crabs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35, 153–160.
- Butler J.M., 2012a. DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing:Methodology* pp. 29–47. Academic Press, USA.
- Butler J.M., 2012b. PCR Amplification Capabilities and Cautions. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing:Methodology* pp. 69–97. Academic Press, USA.
- Caldwell I.R., Correia M., Palma J., & Vincent A.C.J., 2011. Advances in tagging syngnathids, with the effects of dummy tags on behaviour of *Hippocampus guttulatus*. *Journal of fish biology*, 78, 1769.
- Castro J., Bouza C., Presa P., Pino-Querido A., Riaza A., Ferreiro I., Sánchez L., & Martínez P., 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite *loci*. *Aquaculture*, 242, 119–135.

- Clutton-Brock T. & Vincent A., 1991. The, Sexual selection and Females., potential reproductive rates of males and. *Nature*, 351, 58–60.
- Clutton-Brock T.H. & Parker G.A., 1992. Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *The Quarterly Review of Biology*, 67, 437–456.
- Cooke S.J., 2003. Externally attached radio transmitters do not affect the parental care behaviour of rock bass. *Journal of Fish Biology*, 62, 965–970.
- Correia M., Palma J., Koldewey H., & Andrade J.P., 2014. The use of a non-invasive tool for capture–recapture studies on a seahorse *Hippocampus guttulatus* population. *Journal of Fish Biology*, 84, 872–884.
- Craighead L., Paetkau D., Reynolds H., Vyse E., & Strobeck C., 1995. Microsatellite analysis of paternity and reproduction in arctic grizzly bears. *Journal of Heredity*, 86, 255–261.
- Creel S., 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 12, 2003–2009.
- Curtis J.M.R., 2006. Visible Implant Elastomer Color Determination, Tag Visibility, and Tag Loss: Potential Sources of Error for Mark–Recapture Studies. *North American Journal of Fisheries Management*, 26, 327–337.
- Dakin E.E. & Avise J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- Darwin C., 1871. *The descent of man, and selection in relation sex*. London: Murray.
- Dewey M.R. & Zigler S.J., 1996. An Evaluation of Fluorescent Elastomer for Marking Bluegills in Experimental Studies. *The Progressive Fish-Culturist*, 58, 219–220.
- Dunnnett C.W., 1955. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association*, 50, 1096–1121.
- Edwards W.R. & Eberhardt L., 1967. Estimating cottontail abundance from livetrapping data. *Journal of Wildlife Management*, 42, 125–146.
- Erzini K., Bentes L., Coelho R., Correia C., Lino P.G., Monteiro P., Ribeiro J., & Gonçalves J.M.S., 2002. Recruitment of Sea Breems (Sparidae) and Other Commercially Important Species in the Algarve (Southern Portugal). DG XIV/99/061 e Final Report, 194.
- Frederick J.L., 1997. Evaluation of fluorescent elastomer injection as a method for marking small fish. *Bulletin of Marine Science*, 61, 399–408.
- Freire T., 2004. Reproductive biology of *Syngnathus typhle*, Linnaeus, 1758, (Pisces, Syngnathidae), from the Ria Formosa. University of Algarve.,

- Fuller R. & Berglund A., 1996. Behavioral responses of a sex-role reversed pipefish to a gradient of perceived predation risk. *Behavioral Ecology*, 7, 69–75.
- Gagneux P., Boesch C., & Woodruff D.S., 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6, 861–868.
- Goela P., 2005. Plano Teórico de Monitorização da Ria Formosa segundo a Directiva Quadro da Água. Tese de mestrado. Universidade do Algarve.
- Gomes I., 1999. Hardy-Weinberg quality control. *Annals of Human Genetics*, 63, 535–538.
- Gruber B. & Adamack A.T., 2014. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 384–387.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaimeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., & Petit R.J., 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11, 591–611.
- Harasti D., Martin-Smith K., & Gladstone W., 2012. Population dynamics and life history of a geographically restricted seahorse, *Hippocampus whitei*. *Journal of Fish Biology*, 81, 1297–1314.
- Hartl D.L. & Clark A.G., 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hartl D.L. & Jones E.W., 2006. *Essencial Genetics- A Genomics Perspective*. Jones and Bartlett Publishers, U.S.A.
- Hoffman J.I. & Amos W., 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14, 599–612.
- Hübner K., Gonzalez-Wanguemert M., Diekmann O.E., & Serrão E.A., 2013. Genetic Evidence for Polygynandry in the Black-Striped Pipefish *Syngnathus abaster*: A Microsatellite-Based Parentage Analysis. *Journal of Heredity*, 104, 791–797.
- Jepsen N., Koed A., Thorstad E., & Baras E., 2002. Surgical implantation of telemetry transmitters in fish: how much have we learned? *Hydrobiologia*, 483, 239–248.
- Jones A.G., 2005. Gerud 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes*, 5, 708–711.
- Jones A.G., Adams E.M., & Arnold S.J., 2002. Topping off: a mechanism of first-male sperm precedence in a vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 2078–2081.

- Jones A.G. & Avise J.C., 1997a. Polygynandry in the Dusky Pipefish *Syngnathus floridae* Revealed by Microsatellite DNA Markers. *Evolution*, 51, 1611–1622.
- Jones A.G. & Avise J.C., 1997b. Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Molecular Ecology*, 6, 203–213.
- Jones A.G. & Avise J.C., 2001. Mating Systems and Sexual Selection in Male-Pregnant Pipefishes and Seahorses: Insights from Microsatellite-Based Studies of Maternity. *Journal of Heredity*, 92, 150–158.
- Jones A.G., Rosenqvist G., Berglund A., & Avise J.C., 1999a. Clustered Microsatellite Mutations in the Pipefish *Syngnathus typhle*. *Genetics*, 152, 1057–1063.
- Jones A.G., Rosenqvist G., Berglund A., & Avise J.C., 1999b. The genetic mating system of a sex-role-reversed pipefish (*Syngnathus typhle*): a molecular inquiry. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46, 357–365.
- Jones A.G., Rosenqvist G., Berglund A., & Avise J.C., 2000. Mate Quality Influences Multiple Maternity in the Sex-Role-Reversed Pipefish *Syngnathus typhle*. *Oikos*, 90, 321–326.
- Jones A.G., Small C.M., Paczolt K.A., & Ratterman N.L., 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 10, 6–30.
- Kalinowski S.T., Taper M.L., & Marshall T.C., 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.
- Kamler E., 2005. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetic perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 399–421.
- Kellogg K.A., Markert J.A., Stauffer J.R., & Kocher T.D., 1995. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. *Proceedings of Royal Society of London B*, 260, 79–84.
- Kendall W.L. & Nichols J.D., 1995. On the use of secondary capture-recapture samples to estimate temporary emigration and breeding proportions. *Journal of Applied Statistics*, 22, 751–762.
- Koch M., Hadfiels J.D., Sefc K.M., & Sturmbauer C., 2008. Pedigree reconstruction in wild cichlid fish populations. *Molecular Ecology*, 17, 4500–4511.
- Kokko H. & Jennions M.D., 2008. Parental investment, sexual selection and sex ratios. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 919–948.
- Krebs C.J., 1989. Estimating abundance: Mark-and-recapture techniques. *Ecological Methodology*. pp. 654. Harper & Row, Publishers, New York.

- Kvarnemo C. & Ahnesjö I., 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecology Evolution*, 11, 404–408.
- Laudenbach V., Mantz J., & Desmonts J.M., 1999. Comprendre la biologie moléculaire. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 18, 725–747.
- López A., Vera M., Otero-Ferrer F., Pardo B.G., Martínez P., Molina L., & Bouza C., 2010. Species identification and genetic structure of threatened seahorses in Gran Canaria Island (Spain) using mitochondrial and microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 11, 2431–2436.
- Mace G.M., Collen B., Fuller R.A., & Boakes E.H., 2010. Population and geographic range dynamics: implications for conservation planning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 3743–3751.
- Mares M.A., Streilein K.E., & Willig M.R., 1981. Experimental assessment of several population estimation techniques on an introduced population of eastern chipmunks. *Journal of Mammalian*, 62, 315–328.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., & Pemberton J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.
- McCoy E.E., Jones A.G., & Avise J.C., 2001. The genetic mating system and tests for cuckoldry in a pipefish species in which males fertilize eggs and brood offspring externally. *Molecular Ecology*, 10, 1793–1800.
- Miller C.R., Joyce P., & Waits L.P., 2002. Assessing allelic drop out and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160, 357–366.
- Mobley K.B. & Jones A.G., 2007. Geographical variation in the mating system of the dusky pipefish (*Syngnathus floridae*). *Molecular Ecology*, 16, 2596–2606.
- Mobley K. & Jones A., 2009. Environmental, demographic, and genetic mating system variation among five geographically distinct dusky pipefish (*Syngnathus floridae*) populations. *Molecular ecology*, 18, 1476–1490.
- Mobley K.B., Small C.M., & Jones A.G., 2011. The genetics and genomics of Syngnathidae: pipefishes, seahorses and seadragons. *Journal of fish biology*, 78, 1624–1646.
- Monteiro N.M., Vieira M. da N., & Almada V., 2005. Homing behaviour and individual identification of the pipefish *Nerophis lumbriciformis* (Pisces; Syngnathidae): a true intertidal resident? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 63, 93–99.
- Murchie K.J., Cooke S.J., & Schreer J.F., 2004. Effects of radio-transmitter antenna length on swimming performance of juvenile rainbow trout. *Ecology of Freshwater Fish*, 13, 312–316.

- Newton A. & Mudge S.M., 2003. Temperature and salinity regime in a shallow, mesotidal lagoon, the Ria Formosa, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57, 73–85.
- Northwest Marine Technology Inc., 2008. Implant Elastomer Tag. Project Manual. Guide lines on planning and conducting projects using VIE and associated equipment.v. 2.0 US DJS.
- Oddou-Muratorio S., Houot M.-L., Demesure-Musch B., & Austerlitz F., 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, 12, 3427–3439.
- Oliveira F., Erzini K., & Gonçalves J.M.S., 2007. Feeding habits of the deep-snouted pipefish *Syngnathus typhle* in a temperate coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 72, 337–347.
- Olsen E.M. & Vøllestad L.A., 2001. An Evaluation of Visible Implant Elastomer for Marking Age-0 Brown Trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 21, 967–970.
- Paczolt K. & Jones A., 2010. Post-copulatory sexual selection and sexual conflict in the evolution of male pregnancy. *Nature*, 464, 401–404.
- Palma J., Stockdale J., Correia M., & Andrade J.P., 2008. Growth and survival of adult long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) using frozen diets. *Aquaculture*, 278, 55–59.
- Pemberton J., 2009. Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 275, 613–621.
- Pollock K.H., Nichols J.D., Brownie C., & Hines J.E., 1990. Statistical inference for capture-recapture experiments. *Wildlife Monographs*, 107, .
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., & Taberlet P., 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6, 846–847.
- Powers J.E. & Monk M.H., 2010. Current and future use of indicators for ecosystem based fisheries management. *Marine Policy*, 34, 723–727.
- Primmer C., Mollern A., & Ellegren H., 1995. Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology*, 4, 493–498.
- Prunier J., Kaufmann B., Grolet O., Picard D., Pompanon F., & Joly P., 2012. Skin swabbing as a new efficient DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*). *Molecular Ecology Resources*, 12, 524–531.
- Qiagen, 2002. Genomic DNA Purification, Technical hints, applications, and Protocols.

- R Team Core, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Riccato F., Fiorin R., Franco A., Franzoi P., Libertini A., Pranovi F., & Torricelli P., 2003. Population structure and reproduction of three pipefish species (Pisces, Syngnathidae) in a sea grass meadow of the Venice Lagoon. *Biologia Marina Mediterranea*, 10, 138–145.
- Ripley J. & Foran C., 2006. Population structure, growth rates, and seasonal abundance of two *Syngnathus* pipefish species. *Estuaries and Coasts*, 29, 1161–1171.
- Rispoli V.F. & Wilson A.B., 2008. Sexual size dimorphism predicts the frequency of multiple mating in the sex-role reversed pipefish *Syngnathus typhle*. *Journal of evolutionary biology*, 21, 30–8.
- Roff J. & Zacharias M., 2011. *Marine Conservation Ecology*. Earthscan.
- Rosenqvist G. & Berglund A., 2011. Sexual signals and mating patterns in Syngnathidae. *Journal of Fish biology*, 78, 1647–1661.
- Roth O., Keller I., Landis S.H., Salzburger W., & Reusch T.B.H., 2012. Host are ahead in a marine host – parasite coevolutionary arms race: innate immune system adaptation in pipefish *Syngnathus typhle* against *vibrio phylotypes*. *Evolution*, 66, 2528–2539.
- Saarman N.P., Louie K.D., & Hamilton H., 2010. Genetic differentiation across eastern Pacific oceanographic barriers in the threatened seahorse *Hippocampus ingens*. *Conservation Genetics*, 11, 1989–2000.
- Sambrook J., Fritschi E.F., & Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandercock B.K., 2006. Estimation of demographic parameters from live-encounter data: a summary review. *Journal of Wildlife Management*, 10, 1504–1520.
- Schnabel Z.E., 1938. The estimation of the total fish population of a lake. *The American Mathematical Monthly*, 45, 348–352.
- Schumacher F. & Eschmeyer R., 1943. The estimation of fish populations in lakes or ponds. *Journal of the Tennessee Academy of Science*, 18, 228–248.
- Seber G., 1982. *The estimation of animal abundance and related parameters*. London: Griffin.
- Seber G., 1992. A review of estimating animal abundance. II. *International Statistical Review*, 60, 129–166.
- Selkoe K.A. & Toonen R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615–629.

- Shuster S. & Wade M., 2003. Mating systems and strategies. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Silva K., Vieira M.N., Almada V.C., & Monteiro N.M., 2008. Can the limited marsupium space be a limiting factor for *Syngnathus abaster* females? Insights from a population with size-assortative mating. *Journal of Animal Ecology*, 77, 390–394.
- Smith R.L., 1996. Evolution of paternal care in giant water bugs (*Heteroptera: Belostomatidae*). *Social Competition and Cooperation in Insects and Arachnids: II. Evolution of Sociality* (ed. by J. Choe and B. Crespi), Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Sogabe A. & Yanagisawa Y., 2007. Sex-role reversal of a monogamous pipefish without higher potential reproductive rate in females. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 2959–2963.
- Sutherland W., 2006. *Ecological census techniques: A handbook*. Cambridge University Press, U.S.A.
- Svensson I., 1988. Reproductive costs in two sex-role reversed pipefish species (*Syngnathidae*). *Journal of Animal Ecology*, 57, 929–942.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., & Bouvet J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24, 3189–3194.
- Taberlet P., Waits L.P., & Luikart G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecology Evolution*, 14, 323–327.
- Tautz D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463–6471.
- Tenan S., Rotger Vallespir A., Igual J.M., Moya Ó., Royle J.A., & Tavecchia G., 2013. Population abundance, size structure and sex-ratio in an insular lizard. *Ecological Modelling*, 267, 39–47.
- Teske P.R., Cherry M.I., & Matthee C.A., 2003. Population genetics of the endangered Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*. *Molecular Ecology*, 12, 1703–1715.
- Tett P., Gilpin L., Svendsen H., Erlandsson C.P., Larsson U., Kratzer S., Fouilland E., Janzen C., Lee J., Grenz C., Newton A., Ferreira J.G., Fernandes T., & Scory S., 2003. Eutrophication and some European waters of restricted exchange. *Continental Shelf Research*, 23, 1635–1671.
- Valière N., 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2, 377–379.
- Vincent A., Ahnesjö I., Berglund A., & Rosenqvist G., 1992. Pipefishes and seahorses: Are they all sex role reversed? *Trends Ecology Evolution*, 7, 237–241.

- Vincent A.C.J., Berglund A., & Ahnesjö I., 1995. Reproduct of five ecology pipefish species in one eelgrass meadow. *Environmental Biology of Fishes*, 44, 347–361.
- Williams G., 1975. *Sex and evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Willis T.J. & Babcock R.C., 1998. Retention and in situ detectability of visible implant fluorescent elastomer (VIFE) tags in *Pagrus auratus* (Sparidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32, 247–254.
- Wilson A., Ahnesjö I., Vincent A., & Meyer A., 2003. The dynamics of male brooding, mating patterns, and sex roles in pipefishes and seahorses (family Syngnathidae). *Evolution*, 57, 1374–1386.
- Wilson A.B., 2006. Interspecies mating in sympatric species of *Syngnathus* pipefish. *Molecular Ecology*, 15, 809–824.
- Woods C.M.C. & Martin-Smith K.M., 2004. Visible implant fluorescent elastomer tagging of the big-bellied seahorse, *Hippocampus abdominalis*. *Fisheries Research*, 66, 363–371.
- Xu J., Turner A., Little J., Bleeker E.R., & Meyers D.A., 2002. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Human Genetics*, 111, 573–574.
- Zar J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, N.J. : Prentice Hall.