



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

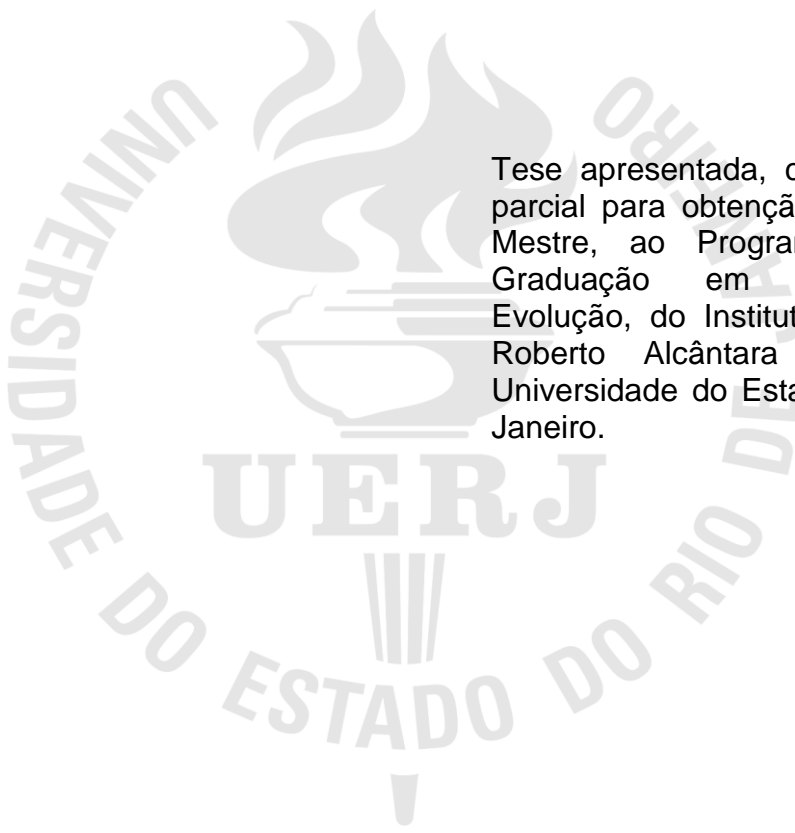
Rafaela Magalhães Aires

**Análises genéticas de carcaças de atobá marrom, *Sula leucogaster*  
(Boddaert, 1783), da região centro-norte do Estado do Rio de  
Janeiro**

Rio de Janeiro  
2013

Rafaela Magalhães Aires

**Análises genéticas de carcaças de atobá marrom, *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783), da região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Lôbo-Hajdu

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C284 Aires, Rafaela Magalhães.  
Análises genéticas de carcaças de atobá marrom, *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783), da região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro / Rafaela Magalhães Aires. – 2013.

94f.: il.

Orientadora: Gisele Lôbo-Hajdu.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.  
Inclui bibliografia.

1. Ave marinha – Campus, Bacia de (RJ) – Teses. I. Lôbo-Hajdu, Gisele.. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 598.2(815.3)

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

---

Assinatura

---

Data

Rafaela Magalhães Aires

**Análises genéticas de carcaças de atobá marrom, *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783), da região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Lôbo-Hajdu

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra Maja Kajin

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Denise Monnerat Nogueira

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Maurício Brandão Vecchi

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

Ao meu pai Ramos, que mesmo  
ausente é minha inspiração  
sempre.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ivone pelo apoio incondicional mesmo sem entender muito bem o que faço.

À minha tia avó Alda e minha tia Maide pelo incentivo, preocupação, apoio, cobranças e broncas quando necessárias. Sem a força delas nada disso seria possível.

À minha orientadora Gisele Hajdu por ter me acolhido com muito carinho desde o início da faculdade e me incentivando durante todos esses longos 7 anos.

À Estéfane Cardinot por incentivar meu ingresso ao mestrado. Graças ao seu empenho esse trabalho foi possível.

À Prof<sup>a</sup> Jaqueline Gusmão e seu aluno Rafael Piergiorgio o meu imenso obrigada por terem me acodido no momento mais crítico da minha dissertação.

Aos meus colegas de laboratório em especial ao Thiago de Paula por inúmeras vezes ter parado a sua tese para me ajudar, a Débora Maína por todo carinho e sábios conselhos que tem me dado nesses anos de trabalho e ao Prof Marcelo por ser sempre prestativo e antencioso.

Ao maior presente que o mestrado me deu: a amizade de Raquel Costa e Luisa Manna. Agradeço imensamente à ajuda da Lú na revisão e sugestões nas várias versões dessa dissertação, a sua paciência, amizade e compreensão. E a Raquel por tornar mais divertida as disciplinas obrigada por sua preocupação, carinho e troca de angustias durante a finalização desse trabalho.

Às minhas fieis escudeira Gisele Machado e Camila Cupello pela amizade, lealdade e ajuda que sempre me deram quando precisei.

Às minhas amigas do LabAngio: Laila, Vivi e Aline.pelas gargalhadas e por tornar o departamento mais divertido.

À todos os meus amigos que mesmo não estando presente no meu dia-a-dia acadêmico estiveram sempre preocupados comigo (pripalmente quando desapareço para escrever) e torcendo por mim.

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ.

Ao GEMM-Lagos pelo suporte com as amostras.

À CAPES pela bolsa de Mestrado.

É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a ouve.

*Victor Hugo*

## RESUMO

AIRES, Rafaela Magalhães. *Análises genéticas de carcaças de atobá marrom, Sula leucogaster (Boddaert, 1783), da região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro*. 2013. 94p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A região da Baía de Campos está exposta a diversas atividades antrópicas, que interferem diretamente no funcionamento do ecossistêmico marinho. O estudo da fauna marinha na costa centro-norte fluminense mostra grande relevância, diversas aves marinhas residem ou passam grande parte de seu período migratório ao longo da Baía de Campos, entre elas está *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783). Embora essas aves sejam altamente móveis, suas populações apresentam uma estrutura populacional genética robusta. Com o intuito de verificar a estruturação e as relações evolutivas da população de *Sula leucogaster* na Baía de Campos foram recolhidas 91 amostras de encalhe e os dados gerados para esta região foram comparados com dados já publicados de outras baías oceânicas. A partir da região controle do DNA mitocondrial foram gerados 26 haplótipos, todos exclusivos da Baía de Campos, muitos raros e apenas oito possuíam frequência comum. As análises mostraram que a população da Baía de Campos é um estoque genético de *Sula leucogaster*. Tal fato pode ser atribuído ao comportamento filopátrico e ao hábito costeiro dessa espécie que impede o fluxo gênico entre populações. Além disso, a população da Baía de Campos detém baixa variabilidade genética e possivelmente está sofrendo efeito gargalo ou seleção purificadora, corroborados por valores do teste Fu, o que é comum para espécies que se dividem em subpopulações. Os dados filogenéticos demonstram um contato recente entre as populações da Baía de Campos e da ilha de Ascensão. As condições oceanográficas também têm influência na estruturação de populações de *Sula leucogaster*, visto que a ausência de barreiras e a proximidade geográfica poderiam favorecer contato secundário com o Mar do Caribe, fato não evidenciado nas análises. Sendo assim, a divergência de populações nessa espécie e a baixa variabilidade genética são fatores preocupantes para a manutenção da população de atobás marrons em uma área de grande impacto ambiental.

Palavras-chaves: Variabilidade genética. Conservação. Aves marinhas.



## ABSTRACT

AIRES, Rafaela Magalhães. *Genetic analysis of carcasses of brown booby, *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783), from the North-Central region of Rio de Janeiro State.* 2013. 94p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The region of Campos Basin is exposed to various anthropogenic activities that affect directly the behavior of marine ecosystem. The study of marine fauna in North-Central coast of Rio de Janeiro is of great importance, several marine and coastal birds live or spend most of their migratory period along the Campos Basin, between them is *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783). Although these birds are highly mobile, their populations have a robust genetic population structure. In order to check the structure and evolutionary relationships of the population of *Sula leucogaster* in the Campos Basin, 91 stranding samples were collected, and the data of this region were compared with the published data. From the control region of mitochondrial DNA, 26 haplotypes were identified, all of them being unique to the Campos Basin. Most of these haplotypes were rare, only eight have common frequencies. The analyses show that the population of the Campos Basin is a genetic stock of *Sula leucogaster*. This fact can be attributed to the filopatric behavior and coastal habit of this species that prevents the gene flow between populations. Moreover, the population of the Campos Basin has low genetic variability and is possibly suffering a bottleneck effect or purifying selection, supported by Fu test values, which is common for species divided into subpopulations. The phylogenetic data demonstrates a recent contact between the populations of the Campos Basin and Ascensão island. The oceanographic conditions also influence the structuring of populations of *Sula leucogaster* populations, as the absence of barriers and geographical proximity could favor secondary contact with the Caribbean Sea, which was not evident in the analyzes. Thus, the low amount of gene flow and the low genetic variability are worrying factors for the maintenance of the population of brown boobies in this area of high environmental impact.

Keywords: Genetic variability. Conservation. Seabirds.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 –  | Os dez diferentes sulídeos.....   | 17 |
| Figura 2 -  | Mapa de distribuição do registro de ocorrência da espécie <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783).....   | 18 |
| Figura 3 –  | Atobá marrom.....   | 18 |
| Figura 4 –  | Hipóteses filogenéticas para Sulidae a partir de dados moleculares com base em sequencias de citocromo b do DNA mitocondrial.....                       | 21 |
| Figura 5 –  | Hipótese filogenética para <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783)....   | 23 |
| Figura 6 –  | Esquema representativo do DNA mitocondrial.....   | 28 |
| Figura 7 –  | Esquema representativo da região não codificante CR1 do DNA mitocondrial.....   | 29 |
| Figura 8 –  | Área de coleta de amostras de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) no estado do Rio de Janeiro.....   | 35 |
| Figura 9 –  | Esquema da eletroforese em gel de agarose para a estimativa de quantificação de DNA.....  | 37 |
| Figura 10 – | Esquema da amplificação dos genes CHD-Z e CHD-W.....  | 39 |
| Figura 11 – | Mapa de área de amostragem de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783).....   | 45 |
| Figura 12 – | Gel de agarose 0,8 % apresentando exemplo de quantificação do DNA genômico total de amostras de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783).....           | 47 |
| Figura 13 – | Sexos de <i>Sula leucogaster</i> para as amostras.....  | 48 |
| Figura 14 – | Visualização do eletroferograma do seqüenciamento destacando as regiões ambíguas e as regiões puras com as possíveis substituições.....                 | 51 |
| Figura 15 – | Representatividade dos haplótipos na Bacia de Campos, RJ (BC) e suas respectivas freqüências em 61 amostras de carcaça de <i>Sula leucogaster</i> ..... | 53 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 16 – | Árvore de Máxima Verossimilhança produzida a partir do alinhamento de seqüências de 489 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial de colônias de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) da Bacia de Campos e seqüências do <i>GenBank</i> ..... | 63 |
| Figura 17 – | Rede parcimoniosa de haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de <i>Sula leucogaster</i> encontrados para as regiões da Bacia de Campos (BC), Cabo Verde (Cvd) e Ascensão (Asn).....   | 64 |
| Figura 18 – | <i>Mismatch Distribution</i> de seqüências de região controle do DNA mitocondrial de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) para localidade da Bacia de Campos no litoral brasileiro, seguindo o modelo de expansão súbita.....                             | 65 |
| Figura 19 – | Regressão linear entre distância genética ( $F_{ST}$ ) e geográfica (em Km) considerando as quatro colônias de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) no Atlântico e Mar do Caribe.....   | 66 |

## LISTA DE TABELAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 –  | Locais de Amostragem, abreviatura e número de indivíduos amostrados por Morris-Pocock e colaboradores, 2010.....   | 46 |
| Tabela 2 –  | Número de tombo UERJ, identificação do sexo para 60 amostras e identificação haplotípica para 61 amostras.....   | 49 |
| Tabela 3 –  | Regiões com as referentes posições e nucleotídeos de ambigüidades nas seqüências de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) geradas a partir de amostras coletadas na Bacia de Campos, considerando 480 pares de bases..... | 52 |
| Tabela 4 –  | Posição dos sítios polimórficos dos vinte e quatro haplótipos (excluindo haplótipos com heteroplasmia) da região controle do DNA mitocondrial encontrados para as amostras de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783).....  | 54 |
| Tabela 5 –  | Índices de diversidade para as populações de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) do oceano Atlântico, considerando fragmento de DNA mitocondrial de 489 pares de bases.....   | 55 |
| Tabela 6 –  | Índices de diversidade para a população de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) da Bacia de Campo/Rio de Janeiro, separados por gêneros considerando fragmento de DNA mitocondrial de 489 pares de bases.....            | 55 |
| Tabela 7 –  | Índices de diversidade para as populações de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) em colônias do Oceano Pacífico, Índico e Mar do Caribe, considerando fragmento de DNA mitocondrial de 489 pares de bases.....          | 56 |
| Tabela 8 –  | Diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as nove localidades do Atlântico, Pacífico, Caribe e Índico (diagonal inferior) e os valores associados de $P$ (diagonal superior).....  | 57 |
| Tabela 9 –  | Valores de $p$ do teste exato de não diferenciação entre populações, considerando nove localidades de amostragem de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783).....  | 58 |
| Tabela 10 – | Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as três localidades de sítios reprodutivos de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) no Oceano Atlântico.....  | 59 |
| Tabela 11 - | Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as nove localidades de sítios reprodutivos de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783) nos oceanos Índico, Pacífico, Atlântico e Mar do Caribe.....                | 60 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabela 12 – | Número de migrantes por geração ( $Nm$ ) entre as populações de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783).....   | 61 |
| Tabela 13 – | Valores do teste de <i>goodness-of-fit</i> de <i>Mismatch Distribution</i> e valores de $D$ e $F_s$ , referentes aos testes de neutralidade de Tajima e $F_u$ , considerando modelos de expansão demográfica, para a localidade da Bacia de Campos de <i>Sula leucogaster</i> (Boddaert, 1783)..... | 65 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| AG                              | <i>among groups</i> , entre grupos (componente da variação da AMOVA)   |
| AMOVA                           | <i>Analysis of Molecular Variance</i> , Análise de Variância Molecular   |
| AP/WG                           | <i>among populations / within groups</i> , entre populações / dentro de grupos (componente da variação da AMOVA) |
| Asn                             | Referência para haplótipos de Ascensão   |
| BC                              | Referência para haplótipos Bacia de Campos   |
| cm                              | centímetros  |
| CHD                             | gene codificante da proteína ligante da DNA cromo helicase ( <i>Chromo Helicase DNA binding protein</i> )        |
| CTAB                            | brometo de cetiltrimetilamônio   |
| Cvd                             | Referência para haplótipos Cabos Verde   |
| <i>D</i>                        | índice de neutralidade segundo Tajima (1989)   |
| DNA                             | ácido desoxirribonucléico  |
| DNAmit                          | ácido desoxirribonucléico mitocondrial   |
| dNTP                            | deoxinucleotídeos trifosfato   |
| EDTA                            | ácido etilenodiaminotetracético  |
| <i>et al.</i>                   | e colaboradores  |
| g                               | gramas   |
| GEMARS                          | Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul   |
| GEMM-Lagos                      | Grupo de Estudo de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos  |
| <i>h</i>                        | diversidade haplotípica  |
| H                               | número de haplótipos   |
| ICMBio                          | Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade  |
| IUCN                            | União Internacional para a Conservação da Natureza ( <i>International Union for Conservation of Nature</i> )     |
| <i>k</i>                        | número médio de diferenças pareadas  |
| Km                              | quilômetros  |
| M                               | Molar  |
| MEGA                            | <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>  |
| MgCl <sub>2</sub>               | cloreto de magnésio  |
| min                             | minutos  |
| mL                              | mililitros   |
| mM                              | milimolar  |
| MMA                             | Ministério do Meio Ambiente, Brasil  |
| N                               | número amostral  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | carbonato de sódio   |
| NaCl                            | cloreto de sódio   |
| ng                              | nanogramas   |
| <i>Nm</i>                       | número de migrantes  |

|                     |  |
|---------------------|--|
| $p$                 | índice de diferenciação do teste exato de não diferenciação entre populações   |
| $P$ (ou $P$ -value) | nível de significância   |
| pb                  | pares de bases   |
| PCR                 | reação em cadeia da polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )  |
| pH                  | potencial de hidrogênio  |
| RJ                  | Rio de Janeiro   |
| rpm                 | Rotações por minuto  |
| S                   | número de sítios variáveis   |
| <i>Taq</i>          | <i>Thermus aquaticus</i>   |
| TBE                 | tampão tris-borato-EDTA  |
| Tris-HCl            | tampão tris-ácido clorídrico   |
| U                   | unidades   |
| UV                  | ultravioleta   |
| V                   | volts  |
| °C                  | graus Celsius  |
| $\mu$ L             | microlitros  |
| WP                  | <i>within populations</i> , dentro de populações (componente da variação da AMOVA)   |
| $\Phi$ CT           | valor de estatística $\Phi$ da AMOVA que responde pela variação entre grupos (AG), análogo ao índice de fixação ( $F_{ST}$ ) |
| $\Phi$ SC           | valor de estatística $\Phi$ da AMOVA que responde pela variação entre populações dentro de grupos (AP/WG)                    |
| $\Phi$ ST           | valor de estatística $\Phi$ da AMOVA que responde pela variação dentro de populações (WP)                                    |
| $\pi$               | diversidade nucleotídica   |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
|       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 16 |
| 1     | <b>CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE</b> .....   | 16 |
| 1.1   | <b>Características gerais dos atobás</b> .....   | 16 |
| 1.2   | <b>Composição genética e conhecimento atual da filogenia de atobás</b> .....   | 20 |
| 1.3   | <b>Bacia de Campos dos Goytacazes, RJ, importante área de abrigo e alimentação no Atlântico</b> .....                  | 23 |
| 1.4   | <b>Poluição e outras ameaças</b> .....   | 24 |
| 1.5   | <b>Técnicas moleculares no estudo de populações de aves marinhas</b> .....   | 27 |
| 1.5.1 | <u>DNA mitocondrial como marcador genético</u> .....   | 27 |
| 1.5.2 | <u>Identificação do sexo em carcaças de Atobá marrom</u> .....   | 30 |
| 1.6   | <b>Caracterização do Problema</b> .....  | 30 |
| 2     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 32 |
| 2.1   | <b>Objetivo Geral</b> .....  | 32 |
| 2.2   | <b>Objetivos Específicos</b> .....   | 32 |
| 3     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 33 |
| 3.1   | <b>Coleta de tecido</b> .....  | 33 |
| 3.2   | <b>Área de coleta</b> .....  | 33 |
| 3.3   | <b>Purificação de DNA gênomico de <i>Sula leucogaster</i></b> .....  | 35 |
| 3.4   | <b>Quantificação da extração de DNA</b> .....  | 36 |
| 3.5   | <b>Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento</b> .....                                   | 37 |
| 3.6   | <b>Amplificação de fragmento do gene CHD para determinação do sexo</b> .....   | 38 |
| 3.7   | <b>Visualização dos produtos amplificados após eletroforese em gel de 12% de poliacrilamida corado por prata</b> ..... | 38 |
| 3.8   | <b>Análise dos dados</b> .....   | 40 |
| 3.8.1 | <u>Systat</u> .....  | 40 |
| 3.8.2 | <u>Seqman e Bioedit</u> .....  | 40 |
| 3.8.3 | <u>Mega</u> .....  | 40 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.8.4 | <u>TCS</u> .....   | 41 |
| 3.8.5 | <u>Arlequin</u> .....  | 42 |
| 3.9   | <b>Dados para comparações</b> .....  | 44 |
| 4     | <b>RESULTADOS</b> .....  | 47 |
| 4.1   | <b>Purificação de DNA genômico e amplificação por PCR</b> .....                                      | 47 |
| 4.2   | <b>Análise da proporção sexual</b> .....   | 48 |
| 4.3   | <b>Aparente heteroplasmia</b> .....  | 50 |
| 4.4   | <b>Composição genética das populações de <i>Sula leucogaster</i></b> .....                           | 50 |
| 4.5   | <b>Estrutura genéticas das colônias de <i>Sula leucogaster</i></b> .....                             | 56 |
| 4.6   | <b>Relações filogenéticas e filogeográficas entre os haplótipos de <i>Sula leucogaster</i></b> ..... | 62 |
| 5     | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 67 |
| 5.1   | <b>Composição genética das populações de <i>Sula leucogaster</i></b> .....                           | 67 |
| 5.2   | <b>Estrutura genética das populações de <i>Sula leucogaster</i></b> .....                            | 68 |
| 5.3   | <b>Relações filogenéticas e filogeográficas entre os haplótipos</b> .....                            | 73 |
| 5.4   | <b>Implicações para conservação</b> .....  | 75 |
|       | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 76 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 77 |
|       | <b>APÊNDICE A – Protocolos de Biologia Molecular</b> .....   | 90 |

## INTRODUÇÃO

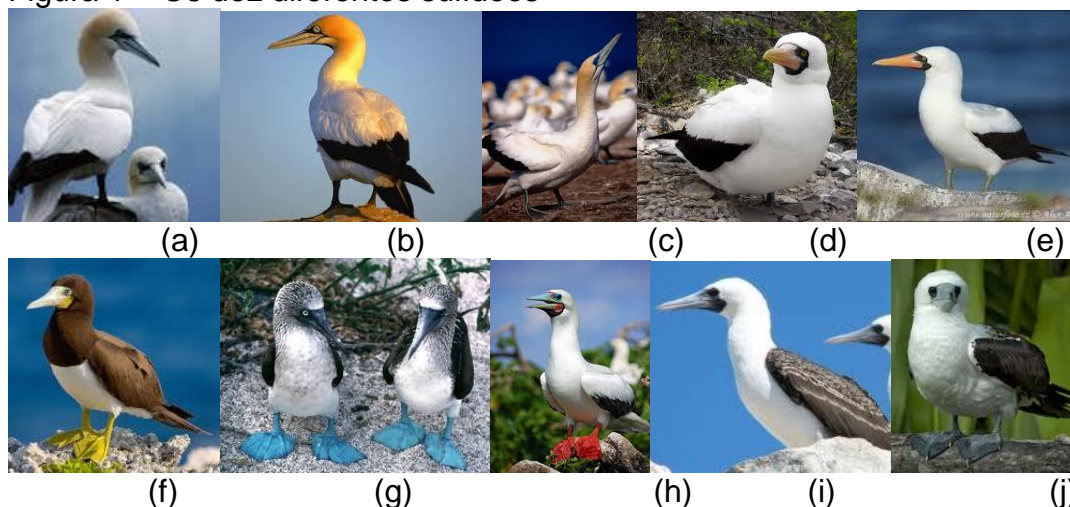
### 1 Caracterização da espécie

#### 1.1 Características gerais dos atobás

Os sulídeos (Superclasse Tetrapoda > Classe Aves > Ordem Pelecaniformes > Família Sulidae) constituem uma família de aves ciconiiformes (antes pelecaniformes), que compreende três gêneros (*Morus* Linnaeus, 1753; *Sula* Brisson, 1760 e *Papasula* Olson e Warheit, 1988) e dez espécies de aves marinhas conhecidas como alcatraz, atobá ou ganso patola que possuem distribuição pantropical (Figura 1). São reconhecidas em todo o mundo seis espécies do gênero *Sula* Brisson, 1760: *Sula dactylatra* Lesson, 1831 (atobá mascarado ou atobá branco); *Sula granti* Rothschild, 1902 (atobá de Nazca); *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) (atobá marrom); *Sula neboxii* Milne-Edwards, 1882 (atobá de pés azuis); *Sula sula* (Linnaeus, 1766) (atobá de pé vermelho) e *Sula variegata* (Tschudi, 1843) (atobá peruano) (*World Register of Marine Species, WoRMS*, <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=137055>). Três espécies de atobá utilizam a costa brasileira para reprodução: *Sula leucogaster*, *S. dactylatra* e *S. sula* (SICK, 1997) e outras duas espécies possuem registros ocasionais na costa brasileira: *Morus serrator* e *M. capensis* (SICK, 1997); o primeiro capturado nas Ilhas Moleques do Sul (BEGE e PAULI, 1989) e o segundo avistado em alto-mar (SICK, 1997; BENCKE, 2001). A espécie *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783), conhecida popularmente como atobá marrom, alcatraz-pardo, toba, mergulhão, mambembo ou mumbebo, é o foco do presente estudo.

Diversos estudos inferem as Ilhas costeiras como ambientes de extrema importância para um grande número de espécies de aves marinhas, servindo como locais de repouso, alimentação e principalmente reprodução (BEGE e PAULI, 1988; SOARES e SCHIEFLER, 1995; BRAUN e BRANCO, 2002), podendo interferir na distribuição geográfica desses organismos.

Figura 1 – Os dez diferentes sulídeos



Legenda: (a) - *Morus bassanus* (Linnaeus, 1758) (ganso patola); (b) - *Morus capensis* (Lichtenstein, 1823) (atobá do cabo); (c) - *Morus serrator* Gray, 1843) (atobá australiano); (d) - *Sula dactylatra* Lesson, 1831; (e) - *Sula granti* Rothschild, 1902; (f) - *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783); (g) - *Sula nebouxii* Milne-Edwards, 1882; (h) - *Sula sula* (Linnaeus, 1766); (i) - *Sula variegata* (Tschudi, 1843) ; (j) - *Papasula abbotti* (atobá de Abbott).

O atobá marrom é uma ave característica dos mares tropical e subtropical, amplamente distribuída por todos os oceanos do planeta (SICK, 1997) (Figura 2), acredita-se que existam mais de 150 colônias reprodutivas ao redor do mundo (Nelson, 1978). No Brasil é possível encontrar sítios de nidificação no arquipélago dos Abrolhos, Bahia, (ALVES *et al.*, 1997, 2004); nas Ilhas de Santana, Francês, Moleques do Sul (COELHO *et al.*, 1981); Ilha de Cabo Frio (COELHO *et al.*, 2004), Cagarra, Palmas, Comprida, Alfavaca, Grande e Jorge Grego no litoral do Rio de Janeiro (ALVES *et al.*, 2004). Estas aves têm hábito costeiro, diferente de outras espécies de atobá, que possuem hábito mais pelágico (SCHREIBER e NORTON, 2002).

O atobá marrom possui dimorfismo sexual na fase adulta, onde as fêmeas são maiores e possuem bico e patas amarelados enquanto os machos são menores e a coloração do bico e das patas é acinzentada. Além dessas características, os machos possuem uma mancha azul em torno dos olhos, enquanto as fêmeas possuem uma pequena mancha azul a frente dos olhos, podendo ser chamado de terceiro olho (SCHREIBER e NORTON, 2002) (Figura 3).

Figura 2 - Mapa de distribuição do registro de ocorrência da espécie *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).



Fonte: *Encyclopedia of Life*. Disponível em: < <http://eol.org>.>

Figura 3 – Atobá marrom



Legenda: (a) - Casal de atobá marrom em ritual de corte ; (b) - diferenças entre machos e fêmeas.

Fonte: <http://www.arkive.org/brown-booby/sula-leucogaster/image-G130980.html>.

Esta espécie possui um comportamento reprodutivo bastante elaborado, onde o estabelecimento dos pares e a manutenção destes são extremamente ritualizados (SIMMONS, 1967) e possuem um território bem definido, respondendo agressivamente quando o mesmo é invadido, seja por indivíduos da mesma espécie ou não (BEGE e PAULI, 1989). A maturidade sexual e a plumagem adulta são adquiridas entre dois e seis anos de vida, sendo que estas aves podem viver entre 10 a 20 anos (HENNICKE *et al.*, 2012). Na estação reprodutiva a fêmea coloca dois ovos por ninhada tendo período de incubação de aproximadamente 42 dias (SICK, 1997). Geralmente apenas um filhote sobrevive, pois o segundo ovo é o “ovo de segurança”, caso o primeiro ovo ou o filhote seja perdido, a tentativa de reprodução pode continuar com uma pequena ou nenhuma interrupção de tempo, e sem

necessidade de recomeçar todo o processo (SIMMONS, 1967). Os atobás-marrons costumam ser bastante fiéis ao sítio de reprodução (DORWARD, 1962; BAUMGARTEN, 1998; SCHREIBER e NORTON, 2002; EFE *et al.*, 2006), no entanto, os machos parecem ser mais fiéis que as fêmeas (NELSON, 1978; EFE *et al.*, 2006). A reprodução desta espécie está diretamente relacionada com a abundância de recursos alimentares (SIMMONS, 1967). Durante a época de reprodução, os atobás forrageiam principalmente em busca de peixes voadores e lulas, localizados no entorno da colônia de reprodução (ALVES *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2004).

Nos anos iniciais de vida os atobás viajam grandes distâncias, atingido cerca de 2.000 km do seu local de nascimento, mas tendem a voltar para suas colônias natais após cerca de três anos (NELSON, 1978; BAUMGARTEN, 2003), enquanto pouco se conhece a respeito do modelo de movimentação dos adultos (estes podem deixar suas ilhas reprodutivas quando fora do período reprodutivo) (EFE *et al.*, 2006). No entanto, mesmo fora do período reprodutivo, é possível avistar inúmeros atobás marrons ao longo da costa, o que está relacionado ao tipo de forrageamento desses animais.

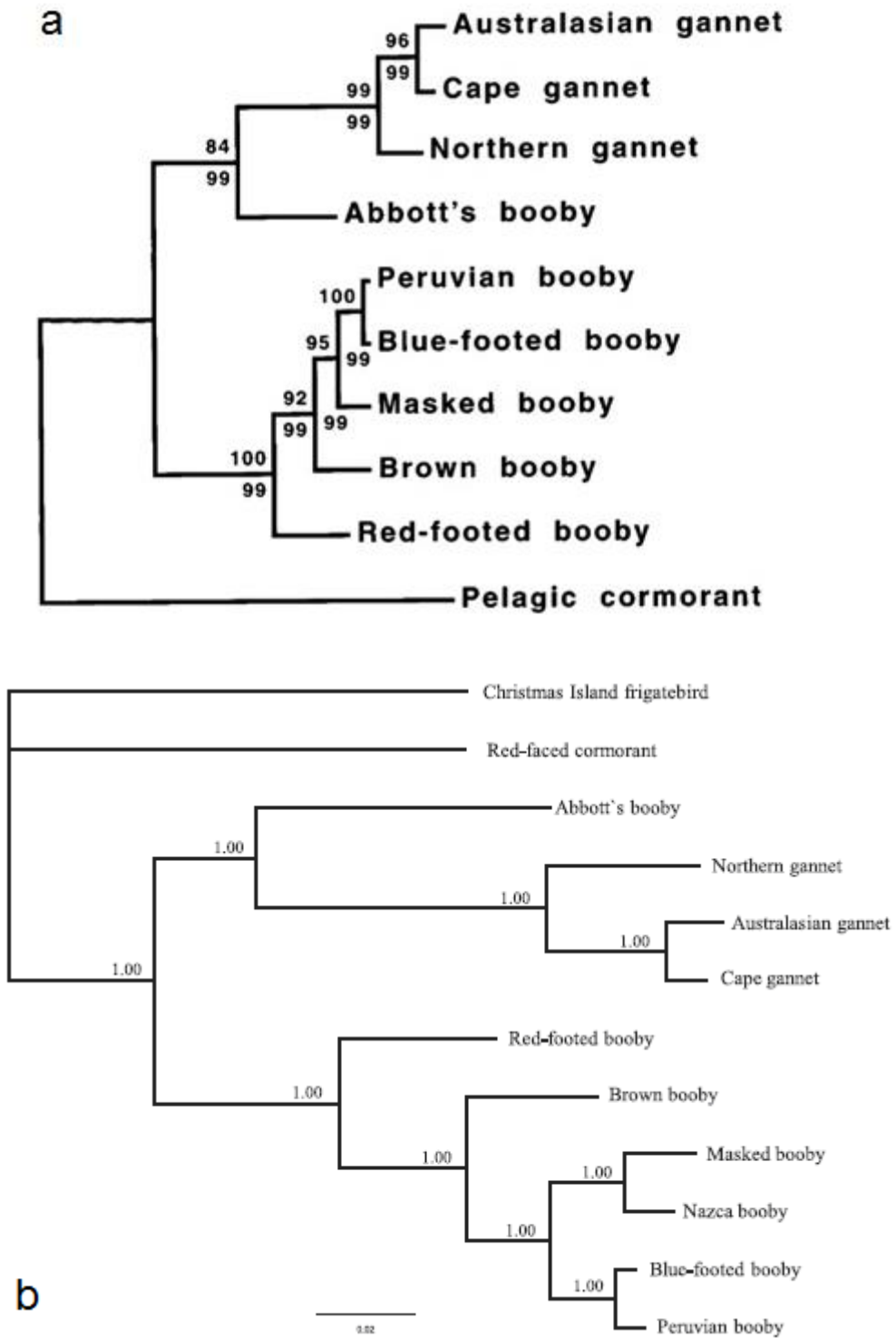
Ao contrário de outras espécies de atobá, *S. leucogaster* é geralmente avistada forrageando próximo ao litoral, em complexos estuarinos que apresentem ambientes de manguezal, perto de praias ou rochedos, capturando, principalmente peixes e moluscos encontrados a poucos metros da superfície da água, através da aprimorada técnica de mergulho que consiste na queda oblíqua da ave sobre a presa avistada (BEGE e PAULI, 1988; NORTON, 1988; SICK, 1988; MORAES e KRUL, 1995; CROXALL e PRINCE, 1996; BRANCO 1999, 2001; BRAUN e BRANCO, 2002). No estudo de Nixon e Lee (1998), os autores acrescentam que, em alguns casos, os atobás permanecem flutuando na superfície da água para observar a densidade dos cardumes de peixes através de rápidos mergulhos com a cabeça, podendo assim investir em sua captura.

## 1.2 Composição genética e conhecimento atual da filogenia de atobás

As aves marinhas do gênero *Sula* possuem características de história de vida que as tornam modelos de organismos particularmente bons para estudos sobre evolução e ecologia baseados em DNA. Esses organismos podem viajar grandes distâncias, violando assim os pressupostos de divergência de população e muitos modelos de especiação, mesmo que apresentem filopatria (voltar ao local de nascimento para reprodução) (DORWARD, 1962; BAUMGARTEN, 1998; SCHREIBER e NORTON, 2002; EFE *et al.*, 2006). Embora as localidades de reprodução possam ser de difícil acesso, estas aves marinhas geralmente reproduzem em grandes colônias de onde amostras suficientes podem ser coletadas para análises genéticas robustas (TAYLOR e FRIESEN, 2012).

A distribuição pantropical de metade das espécies existentes de *Sula* confundem muitas interpretações biogeográficas da topologia e tempos de divergência (FRIESEN e ANDERSON, 1997), no entanto, várias grandes barreiras para o fluxo de genes existiram nos trópicos e podem ter isolado espécies incipientes e promovido divergência alopátrica (Figura 4a). Com base em análises moleculares do DNA mitocondrial há evidências que o surgimento das linhagens de Sulidae tenha ocorrido entre o início e meados do Mioceno (FRIESEN e ANDERSON, 1997), embora estes autores considerem apenas duas grandes linhagens: *Sula* e *Morus* + *Papasula*. Os recentes resultados do trabalho de Patterson e colaboradores (2011) suportam a maioria das hipóteses filogenéticas de evolução de Sulidae proposto por Friesen e Anderson (1997) (Figura 4a e b), sendo que a especiação mais recente de *Sula* ocorreu no leste tropical do Pacífico, onde dois pares de espécies irmãs (*Sula dactylatra* / *Sula granti* e *Sula nebouxii* / *Sula variegata*) parecem ter divergido aproximadamente um milhão de anos atrás (FRIESEN e ANDERSON, 1997).

Figura 4 – Hipóteses filogenéticas para Sulidae a partir de dados moleculares com base em sequencias de citocromo b do DNA mitocondrial.



Legenda: (a) - Segundo FRIESEN ; ANDERSON, 1997; (b) - Segundo PATTERSON et al, 2011, usando o método de Estimativa Bayesiana da Árvore de Espécies (BEST).

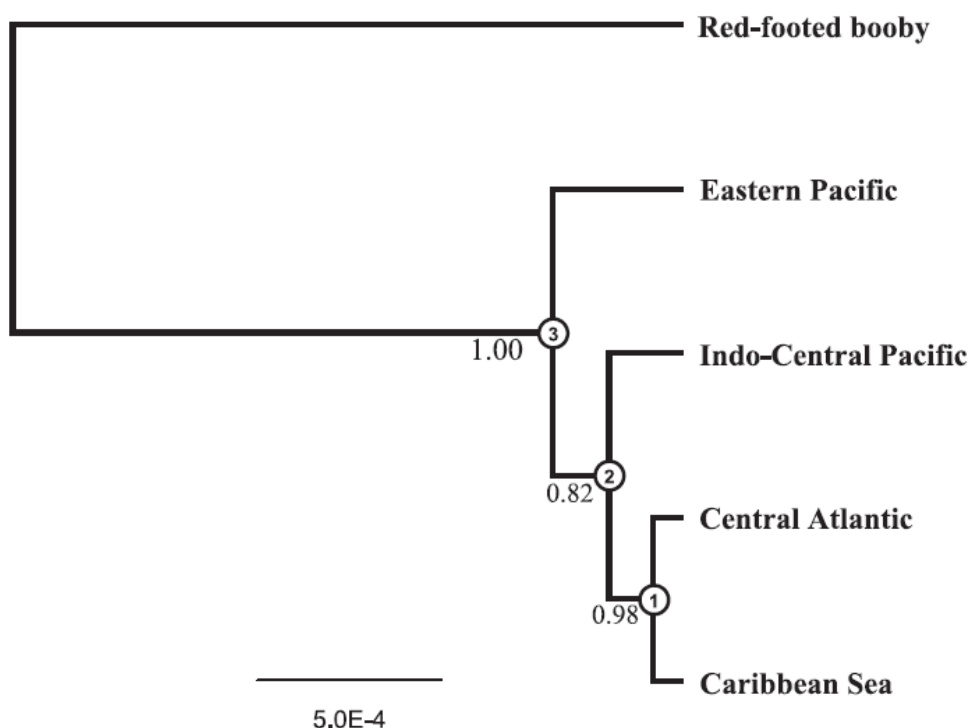
Embora essas aves sejam altamente móveis, com poucas barreiras aparentes à dispersão, muitas vezes populações de aves marinhas apresentam uma estrutura populacional genética robusta (FRIESEN *et al.*, 2007). As análises do estudo de Levin e Parker (2012) revelam que, apesar de curtas distâncias geográficas entre várias colônias de reprodução de *Sula granti*, há diferenciação genética substancial dentro do arquipélago de Galápagos, e que três populações geneticamente distintas ocorrem dentro do arquipélago, com base em análise Bayesiana de agrupamento. Padrões parecidos são apresentados em *Sula dactylatra*, onde suas populações apresentam forte estruturação (STEEVES *et al.*, 2005a). Em contra partida, resultados de estudos de diversidade gênica com populações de *Sula nebouxii* e *Sula variegata* apresentam uma fraca estruturação genética populacional (TAYLOR *et al.*, 2011a, b). Essas espécies são semelhantes para as principais características ecológicas, como por exemplo, a especialização em sistemas de águas frias de ressurgências, o que pode aumentar a dispersão e reduzir a fidelidade à colônia (TAYLOR *et al.*, 2011a, b).

Assim como *Sula granti* e *Sula dactylatra*, *Sula leucogaster* apresenta alta estruturação genética em suas populações que se reproduzem em todas as bacias oceânicas, principalmente no Mar do Caribe, Atlântico, Índico e Pacífico (NELSON, 1978). No estudo de Morris-Pocock e colaboradores (2010 a), os resultados, a partir de análises mitocondriais, mostram uma diversificação entre os fragmentos reprodutivos. O fluxo gênico parece ser limitado por barreiras físicas (por exemplo, o Istmo do Panamá e corrente Benguela) e pela preferência pelo hábito costeiro, que atua na redução de fluxo gênico entre colônias próximas geograficamente (STEEVES *et al.*, 2005 b). No atobá marrom, as populações, em ambos os lados das barreiras, parecem ter sido geneticamente isoladas há, pelo menos, 100.000 anos e exibem variação notável na plumagem, podendo ser parcialmente agrupados por região (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010a). Tanto indivíduos do sexo feminino, como masculino, das áreas de nidificação no Pacífico Central e no Caribe são marrons com barriga branca, enquanto os machos dos assentamentos no leste do Pacífico têm grau variado de branco em suas cabeças e pescoços (NELSON, 1978). Estudos mais recentes, com resultados gerados a partir de análises de DNA nuclear, sustentam a hipótese de uma divisão global nas populações de atobá marrom, sendo separadas em quatro grandes grupos genéticos que correspondem a grandes



áreas oceanográficas: (1) Mar do Caribe, (2) Oceano Atlântico Central, (3) Oceano Índico e Oceano Pacífico Central e (4) Leste do Oceano Pacífico (Figura 5) (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2011) (Figura 5). Portanto, a costa brasileira estaria inclusa no grupo do Oceano Atlântico Central, sendo uma área de grande relevância para estudos comparativos de análises genéticas.

Figura 5 – Hipótese filogenética para *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) a partir de dados moleculares com base em seqüências nucleares exemplificando os quatro grupos genéticos.



Legenda: Segundo MORRIS-POCOCK *et al.*, 2012, usando o método de Estimativa Bayesiana da Árvore de Espécies (BEST).

### 1.3 Bacia de Campos dos Goytacazes, RJ, importante área de abrigo e alimentação no Atlântico

A região da Bacia de Campos possui características geológicas que favorecem a exploração petrolífera, dessa forma sendo passível a impactos ambientais. Portanto, o monitoramento da fauna marinha na costa centro-norte fluminense mostra grande relevância, uma vez que a mesma está exposta a diversas atividades antrópicas, que interferem diretamente no funcionamento ecossistêmico marinho (DE MOURA *et al.*, 2012). Diversas aves marinhas e

costeiras residem ou passam grande parte de seu período migratório ao longo da Bacia de Campos, área de estudo deste projeto. As lagoas costeiras fornecem abrigo e locais importantes para alimentação. Tanto aves com hábitos costeiros como aquelas com hábitos oceânicos podem ser abundantemente observadas, mortas ou vivas, ao longo das praias (S. Siciliano, comunicação pessoal).

O crescente interesse na conservação das populações de aves marinhas da zona costeiro-marinha brasileira aumentou a necessidade de informações atualizadas sobre a demografia das espécies que nidificam em território nacional, como os atobás (BRANCO, 2004), visto que a ação antrópica em locais de nidificação e alimentação das aves pode comprometer seu sucesso reprodutivo (FURNESS, 1982; BURGER e GOCHFELD, 1994; BOERSMA *et al.*, 2002). *Sula leucogaster* é tida como uma espécie de elevada fidelidade ao sítio reprodutivo, com pouca emigração permanente (DORWARD, 1962; BAUMGARTEN, 1998; SCHREIBER e NORTON, 2002; EFE *et al.*, 2006). Ainda, Miyaki (2001) reporta que o atobá marrom apresenta uma baixa variabilidade genética, mas é uma espécie com grandes populações, e que nem sempre existe correlação entre diversidade genética e status de ameaça. Por isso, devemos tomar cuidado ao realizar programas de conservação; compreender como a espécie se encontra na natureza é a informação mais relevante. O conhecimento de dados como o número de indivíduos, sua distribuição, sua ecologia e seu comportamento reprodutivo podem ser ainda mais vitais para a sobrevivência do táxon ameaçado e para efetivamente preservá-lo (MIYAKI, 2001).

#### **1.4 Poluição e outras ameaças**

Aves marinhas são conhecidas como organismos apropriados para biomonitoramento de poluição devido a sua elevada posição trófica na cadeia alimentar, o que leva à acumulação de poluentes; principalmente os que são semivoláteis, o que facilita o seu movimento através de longas distâncias na atmosfera antes de sua deposição (WANIA e MACKAY, 1993), tais como os poluentes orgânicos persistentes (POP), e os organo-metais de baixa solubilidade na água (e.g. mercúrio).

Por sua vez, estes compostos podem ser transferidos das aves para os seus ovos e prole, o que nos pode fornecer observações dos efeitos desses poluentes no processo reprodutivo nas colônias de aves marinhas (VERMEER e PEAKALL, 1977; WALKER, 1990; BURGER e GOCHFELD, 2004). Por ser um predador de topo, o atobá marrom possui elevado potencial de biomagnificação de poluentes (NELSON, 1978). Apesar da alta diversidade da avifauna no Brasil, pouco se sabe sobre a contaminação de tais substâncias e os potenciais efeitos negativos sobre as populações de aves (CUNHA *et al.*, 2012).

Exames de captação e acumulação de metal em *S. leucogaster* habitando áreas impactadas e informações úteis sobre a disponibilidade do metal, podem ser usados para as avaliações de efeitos na saúde, e determinar o risco de tais exposições (SILVA *et al.*, 2005). Há poucos dados disponíveis no Brasil sobre os níveis de metais em aves, a maioria das pesquisas se concentra em peixes e os resultados mostram níveis preocupantes de alguns metais, sendo, assim, possível esperar os mesmos níveis em *Sula leucogaster* (CUNHA *et al.*, 2012). No entanto, no estudo de Ferreira (2010) todos os metais pesquisados mostraram concentrações mais elevadas nas aves do que os encontrados em algumas espécies de peixe. Portanto, a contaminação de metais pode ter efeitos prejudiciais sobre as aves de toda uma região, particularmente nas áreas de alimentação ou reprodução, ou rotas de migração e criadouros.

Na Bacia de Campos existem duas principais entradas de mercúrio (Hg). A fonte difusa é representada pelas atividades de exploração e produção de petróleo que são capazes de introduzir no meio marinho efluentes enriquecidos em substâncias orgânicas e inorgânicas (REZENDE *et al.*, 2002), entre elas o mercúrio, uma vez que este elemento tem sido detectado na composição das águas de produção (AZEVEDO, 2003). A fonte pontual é representada pelo rio Paraíba do Sul, o qual tem sido estudado ao longo das duas últimas décadas principalmente devido ao uso do Hg nas plantações de cana-de-açúcar da região, através de fungicidas organomercuriais e pela atividade de garimpo (LACERDA *et al.*, 1993). Estes estudos anteriores mostraram um nítido enriquecimento dos sedimentos superficiais sob influência da pluma fluvial. Em adição, a determinação do Hg em diferentes frações do material particulado em suspensão apresentou um enriquecimento nas

partículas mais finas, assim como na fração coloidal, evidenciando o tipo de transporte deste elemento para o oceano (ALMEIDA *et al.*, 2007).

A interação com a pesca é outra grande ameaça para essas aves. Nas atividades pesqueiras comerciais é comum o descarte de parte da captura, tanto na forma de peixes sem valor como seus derivados (KRUL, 1999). Associações de aves marinhas com este material são observadas em todo mundo, onde a rica quantidade de peixes provenientes do descarte fornece uma excelente fonte de alimento para diversas espécies (WALTER e BECKER 1994; BRANCO, 1999; KRUL, 1999; ORO, 1999; BRANCO, 2001). Por outro lado, a interação pode causar sérios prejuízos, como por exemplo, a captura acidental de aves em espinhéis e redes de pesca e a depleção de estoques pesqueiros importantes (CRAWFORD e DYER, 1995).

Outro fato grave é o hábito que alguns pescadores têm de agredir as aves marinhas que aguardam sobre o barco o descarte da pesca de arrasto (PELANDA *et al.*, 2007). Isso acontece porque as aves sinalizam a pesca ilegal durante a época de defeso (período em que é proibida a captura do camarão), ou simplesmente por perturbarem os pescadores enquanto selecionam os peixes na rede (pescadores locais, comunicação pessoal). Outra forma de ação direta sobre aves foi detectada por Tasker e colaboradores (2000) que citam a matança de aves consumidoras de peixes de interesse comercial justificando a agressão como forma de evitar o declínio do estoque pesqueiro. Outra violenta ação de pescadores foi registrada por Moreno e colaboradores (2006) no Chile, onde pescadores nervosos matavam aves capturadas acidentalmente nos anzóis de espinhel a fim de economizar tempo.

O turismo também pode ser uma significativa ameaça para as aves marinhas. No trabalho de Soares e Schiefler (1995), os autores indicam como grande problema a ação de moradores e turistas na coleta e pisoteio dos ovos de aves marinhas que reproduzem na Ilhota da Galheta em Laguna, SC.

Estudos de bioindicadores são utilizados para avaliar, dentro do ambiente natural, os ecossistemas e transformá-los em indicadores ecológicos funcionais (CUNHA *et al.*, 2012). O estudo de características de uma espécie em particular pode nos dizer sobre o estado das variações ambientais, reduzindo assim a quantidade de investimento que seria necessário para investigar estas variáveis diretamente e individualmente (LE BOHEC *et al.*, 2012).

## 1.5 Técnicas moleculares no estudo de populações de aves marinhas

Várias ferramentas desenvolvidas na Biologia Molecular mostraram-se muito úteis nos mais diversos estudos de genética e evolução de aves (STEEVES *et al.*, 2003, 2005a e b; PATTERSON *et al.*, 2010). Alguns exemplos de aplicação são estudos de: relações intraespecífica e interespecífica de determinada ave com as demais espécies (filogenia do grupo de interesse), unidades genéticas contidas na espécie (fragmentação ao nível de subespécies ou populações), biologia reprodutiva (incluindo o sistema de acasalamento), identificação do sexo em espécies que não possuem dimorfismo sexual aparente, conservação, monitoramento da variabilidade genética e identificação individual (LE BOHEC *et al.*, 2012). Os marcadores moleculares podem identificar indivíduos híbridos e seus descendentes, permitindo traçar planos de recuperação excluindo indivíduos híbridos de programas de reprodução em cativeiro, ou a partir da população original, se a manutenção de populações geneticamente puras é uma meta do programa de conservação (HAIG *et al.*, 2004). Marcadores moleculares também podem ajudar a avaliar os efeitos das perturbações antrópicas em uma população (e.g. derramamentos de óleo) (RIFFAUT *et al.*, 2005).

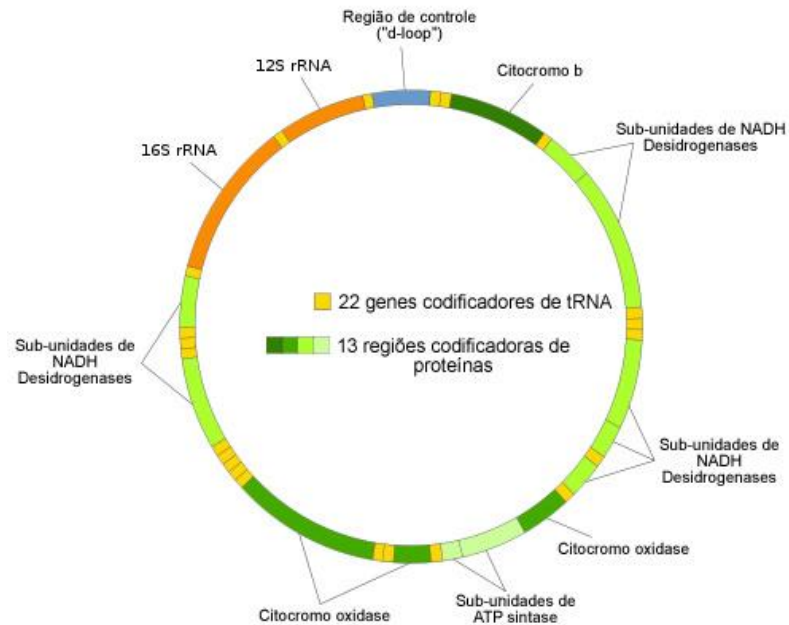
A possibilidade de estimar a variabilidade de grupos de indivíduos é importante para avaliar se a diversidade genética possui alguma relação com o status de ameaça destes grupos (LE BOHEC *et al.*, 2012). Além disso, as técnicas genéticas são ferramentas fundamentais para estudos de biologia e evolução das populações naturais (SLATKIN, 1993).

### 1.5.1 DNA mitocondrial como marcador genético

Desde 1980, a molécula do DNA mitocondrial (DNAMt) passou a fazer parte de muitos, senão da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (WILSON *et al.*, 1985; AVISE *et al.*, 1987; MORITZ *et al.*, 1987; AVISE, 1994). A molécula de DNAMt animal possui fita dupla e é circular (Figura 6). Foram descritos 37 genes, dos quais 13 codificam RNA mensageiros (RNAm) para proteínas envolvidas diretamente no processo do

transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, dois para subunidades ribossômicas e 22 para RNA transportadores (RNAt). O conteúdo em termos de genes e o arranjo em sua ordem são bastante conservados em vertebrados (MORITZ *et al.*, 1987).

Figura 6 - Esquema representativo do DNA mitocondrial.



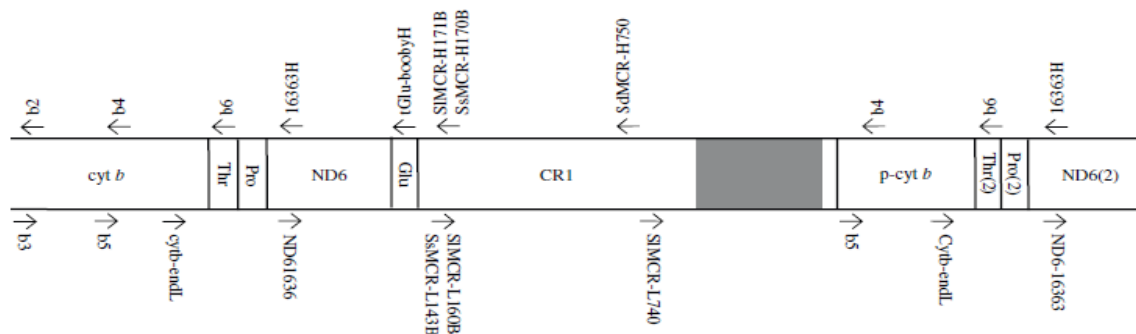
Uma característica bastante atrativa para estudos populacionais e evolutivos utilizando esta molécula é o fato desta apresentar herança matrilinear, de modo que ela não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação, o que faz com que toda a variabilidade existente entre os indivíduos de uma população seja introduzida exclusivamente por mutação (HOEZEL *et al.*, 1991). Essa característica possibilita sua utilização para traçar uma genealogia materna ou até mesmo filogenia, o que muitas vezes pode ajudar a entender o modo de dispersão de muitos organismos (FITZSIMMONS *et al.*, 2000).

Estudos relacionados à estrutura genética das populações e inferências sobre os processos históricos demográficos que moldaram a estrutura atual são viáveis, pois o tamanho efetivo populacional do DNA mitocondrial é quatro vezes menor que o do DNA nuclear; dada sua natureza haplóide e herança uniparental, esta molécula apresenta uma taxa proporcionalmente mais rápida de diferenciação genética (BIRKY *et al.*, 1989). Portanto, é possível observar efeito mais forte da deriva gênica e níveis mais elevados de diferenciação da população, mesmo que a separação tenha ocorrido recentemente em termos evolutivos (FRANKHAM *et al.*, 1995). Isto

pode ser de grande importância em populações que ainda não alcançaram o equilíbrio entre migração e deriva, assim como para áreas com história de colonização recente (AVISE, 2000).

Existe no DNA mitocondrial uma região não codificadora conhecida como A+T nos invertebrados ou “*D-loop*” nos vertebrados, que é responsável pela replicação e transcrição desse genoma. Esse trecho do DNA mitocondrial constitui, portanto, um marcador de evolução rápida e por isso, tem sido mundialmente utilizado para estudos populacionais (um exemplo com atobá marrom: MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010a). Nesse estudo utilizamos a região não codificante CR1, que se encontra entre as extremidades dos *loci* que codificam os RNA transportadores RNAt-Pro e RNAt-Phe (Figura 7). Essa região tem sido usada para analisar evolução em concerto em diversos estudos (TATARENKOV e AVISE, 2007; PATTERSON *et al.*, 2010, MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010a).

Figura 7 – Esquema representativo da região não codificante CR1 do DNA mitocondrial.



Fonte: Retirado do artigo Morris-Pocock *et al.*, 2010.

Apesar de ser bastante utilizada para estudos populacionais é necessário bastante cuidado nas inferências quando só o DNAm<sub>t</sub> é analisado. Sendo uniparental, marcadores mitocondriais não são capazes de revelar um cenário de dinâmica populacional completo (MORITZ *et al.*, 1987). Por esta razão, estudos com marcadores nucleares se fazem necessários para complementar as análises de DNA mitocondrial, e dessa forma, proporcionar um entendimento mais completo da estrutura genética de populações (KARL *et al.*, 1992; KARL e AVISE, 1993; FITZSIMMONS *et al.*, 1997).

### 1.5.2 Identificação do sexo em carcaças de Atobá marrom através de métodos moleculares

A identificação do sexo é de extrema importância para a compreensão da ecologia e demografia das espécies, além de auxiliar na determinação de estratégias de manejo e conservação (SHIZURA e LYON, 2008; LEE *et al.*, 2010). A identificação do sexo em indivíduos encalhados de *Sula leucogaster* possui várias limitações por seu avançado estágio de decomposição. A técnica molecular da análise do gene CHD (do inglês, *Chromo Helicase DNA binding protein*) encontrado nos cromossomos sexuais mostra-se como uma alternativa potencial nesses casos (ELLEGREN e SHELDON, 1997; GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Nas aves, ao contrário do que ocorre nos mamíferos, as fêmeas são heterogaméticas apresentando um par de cromossomos sexuais diferentes (ZW), enquanto os machos são homogaméticos apresentando um par de cromossomos sexuais iguais (ZZ) (SOLARI, 1994). A metodologia molecular para sexagem baseia-se nas diferenças de tamanhos entre os íntrons do gene CHD (GRIFFITHS *et al.*, 1998, KAHN *et al.*, 1998, FRIDOLFSSON e ELLEGREN, 1999).

Através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) se pareiam em uma região “exônica” conservada, mas amplificam uma região “intrônica” (não-codificante) menos conservada, geralmente apresentando comprimentos diferentes entre os genes CHD-Z e CHD-W. O produto da PCR evidencia a variação em tamanho, permitindo assim identificar indivíduos do sexo masculino e feminino (GRIFFITHS *et al.*, 1998), de acordo com o número de bandas geradas (duas nas fêmeas e uma nos machos).

## **1.6 Caracterização do problema**

As alterações no ambiente associadas com as rápidas mudanças no clima são capazes de impor fortes pressões de seleção em características importantes para a aptidão na maioria das espécies. Em resposta a esta seleção, os processos microevolutivos podem ser importantes mecanismos que desencadeiam algumas



das consequências negativas frente à mudança do ambiente (LE BOHEC *et al.*, 2012). Para que se resistam às mudanças nos ecossistemas, a diversidade genética é essencial, sendo necessário estabelecer um limite inferior da dimensão de uma população efetiva necessária para manter um potencial evolutivo (LE BOHEC *et al.*, 2012). Franklin e Frankham (1998) sugeriram que é possível quantificar este valor como o equilíbrio entre a perda de alelos devido à deriva genética e a geração de novos alelos através da mutação. A partir daí, tem sido sugerido que a segurança genética, a longo prazo, de uma espécie pode ser mantida com um tamanho populacional na gama de 500 a 5.000 indivíduos (FRANKHAM, 1995; LYNCH e LANDE, 1998). No entanto, ainda não está claro como a diversidade é mantida em colônias filopátricas, típicas de espécies de aves marinhas. Porém, a manutenção da variabilidade genética é essencial para as capacidades das populações de aves de adaptação às mudanças ambientais. Populações distintas são frequentemente denominadas como Unidades Evolutivamente Significativas (ESU, do inglês *Evolutionarily Significant Units*) e a perda destas populações resultaria em perder alguns dos recursos genéticos da espécie, incluindo potenciais adaptações locais, visto que tais populações podem ser genética e demograficamente isoladas umas das outras (LE BOHEC *et al.*, 2012).

Determinar os fatores que influenciam a diferenciação das populações é crucial para a obtenção de uma melhor compreensão da geração e manutenção da biodiversidade, particularmente em ecossistemas sob ameaça de mudança do clima, de extração dos recursos e de poluição. Os ecossistemas marinhos enfrentam uma série dessas ameaças, e são mais capazes de resistir a perturbações quando a biodiversidade é elevada (PALUMBI *et al.*, 2008). Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar geneticamente as aves marinhas da espécie *Sula leucogaster* coletadas na Bacia de Campos, vítimas de encalhe e estimar o nível de variabilidade genética das amostras de indivíduos desta espécie encontradas na área de estudo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo a caracterização genética da população de *Sula leucogaster* do litoral da Bacia de Campos com base na variabilidade da região controle do DNA mitocondrial.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a composição genética da população de *Sula leucogaster* da Bacia de Campos através da identificação dos haplótipos que a compõe e da determinação dos índices de diversidade molecular que a caracteriza;
- Comparar a composição genética da população de *Sula leucogaster* da Bacia de Campos com populações de outras Bacias Oceânicas já estudadas (Atlântico, Mar do Caribe, Pacífico e Índico);
- Investigar a estrutura populacional existente nas populações de *Sula leucogaster* quando as amostras da Bacia de Campos estão incluídas;
- Avaliar a proporção entre machos e fêmeas de restos mortais de *Sula leucogaster* recolhidos na área costeira da Bacia de Campos;
- Comparar a diversidade genética encontrada para machos e fêmeas de *Sula leucogaster* da região da Bacia de Campos;
- Verificar a filogenia e filogeografia quando as amostras da região da Bacia de Campos estão presentes.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta de tecido**

Pesquisadores do GEMM-Lagos (Grupo de Estudo de Mamíferos Marinheiros da Região dos Lagos) e colaboradores realizaram nos anos de 2008 a 2010 monitoramentos regulares ao longo da costa brasileira recuperando carcaças encalhadas de mamíferos marinhos, tartarugas e aves marinhas. Os coletores eram ornitólogos, e a coleta só era efetuada se houvesse a possibilidade de identificação da espécie, isto dependia do grau de decomposição dos espécimes. Assim, amostras de fígado e/ou músculo foram coletadas e condicionadas em etanol 70 %.

#### **3.2 Área de coleta**

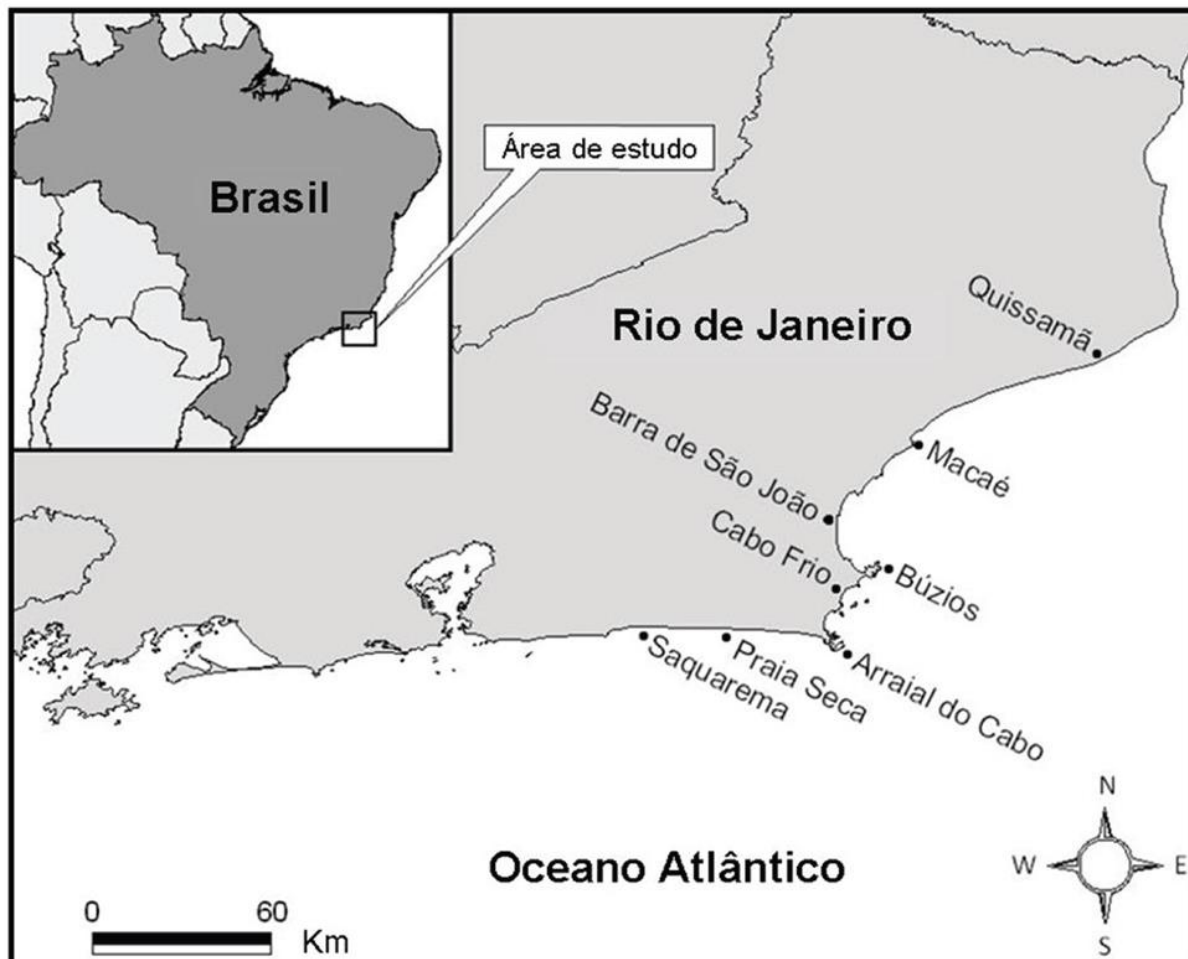
A Bacia de Campos, situada no litoral dos Estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo, entre os paralelos 21 e 23 sul, abrange uma área de 115.800 km<sup>2</sup> até a lâmina d'água de 3.000 metros. É uma área de depósitos sedimentares originados, principalmente, pela erosão de parte das rochas da Serra do Mar (CAETANO-FILHO, 2003). As condições geológicas de formação dessa bacia proporcionaram o acúmulo de grandes quantidades de petróleo em sua plataforma continental (CAETANO-FILHO, 2003). A região recebe investimentos para o desenvolvimento de tecnologia e infraestrutura para a exploração petrolífera, e, conseqüentemente, sofre considerável impacto ambiental.

A área da plataforma continental entre Campos e o Rio de Janeiro apresenta mistura de massas d'água oriundas da corrente do Brasil, corrente Costeira e Água Central do Atlântico Sul (ACAS). A corrente do Brasil é caracterizada por águas oligotróficas de temperatura mais elevada e contribui com as massas d'água junto à costa, recebendo importantes descargas de água doce, devido à ação das desembocaduras de rios de pequeno e médio porte, principalmente o Rio Paraíba do Sul. A ACAS, por sua vez, se encontra entre 200 e 400 metros de profundidade, caracterizada por apresentar menor salinidade, baixa temperatura e altas concentrações de nutrientes (MATSUURA, 1995). Os ventos predominantes na

região da Bacia de Campos são os de nordeste durante a maior parte do ano, considerados importantes mecanismos na geração de correntes nesta plataforma. Durante o verão, quando uma termoclina sazonal se estabelece, os ventos NE/E entre 21° e 23° S se intensificam e controlam o evento de ressurgência, resultando no afloramento de ACAS na plataforma interna. Devido a esse fenômeno, a região sul da área de estudo é caracterizada por elevada produtividade primária, diversidade e abundância de organismos aquáticos (VALENTIN, 2001).

Ao sul da área de estudo, a ressurgência de Cabo Frio é o principal agente controlador das condições oceanográficas costeiras, enquanto que ao norte do Cabo de São Tomé (Campos dos Goytacazes), o Rio Paraíba do Sul possui maior influência. O Rio Paraíba do Sul aumenta drasticamente sua vazão durante o verão (TEIXEIRA *et al.*, 2010), o que faz com que sua área de influência na região costeira próxima a sua desembocadura aumente. Além disso, a maior vazão interfere diretamente na disponibilidade de nutrientes que chegam até o oceano (KRUGER *et al.*, 2006), alterando assim a produtividade biológica e o equilíbrio trófico do ambiente costeiro. O GEMM-Lagos atua na região centro-norte fluminense, entre os municípios de Saquarema e Quissamã, fazendo o monitoramento regular de encalhes nas praias (Figura 8).

Figura 8 - Área de coleta de amostras de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) no estado do Rio de Janeiro. Mapa da área de estudo, compreendida entre Saquarema e Quissamã, regularmente monitorada pela equipe do GEMM-Lagos / Oceanites em 2009 para recolhimento de carcaças de quelônios, aves e mamíferos marinhos



Fonte: Retirado de REIS *et al.*, 2010.

### 3.3 Purificação de DNA genômico total de *Sula leucogaster*

A extração de DNA genômico total foi realizada de acordo com o protocolo modificado de Damato e Corach (1996). Aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de tecido foi subamostrado e, após secagem em papel de filtro, esse fragmento foi cortado em pequenos pedaços e transferido para um microtubo limpo de polipropileno de 1,5 mL (tipo Eppendorff). Foram adicionados 700 µL da solução de tampão de lise contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB 2 %, 100 mM Tris-Cl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl), Proteinase K e beta-mercaptoetanol. Em seguida, a amostra foi incubada à 54 °C, de um dia para o outro (mínimo de duas horas e máximo de 30 horas), sendo

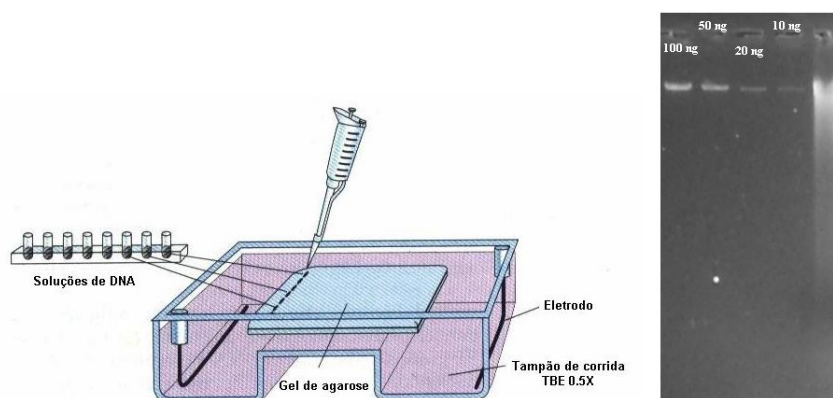
macerada com o auxílio de pistilos plásticos. Após esta etapa foi adicionado um volume de 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (MERCK) gelado e centrifugou-se por 5 min a 10000 rpm à 4 °C para a retirada de elementos com características apolares. Três fases são formadas: uma superior, aquosa, contendo moléculas polares e iônicas como os ácidos nucleicos e sais; outra, inferior, contendo o solvente orgânico, lipídeos, e 'debris' celulares; e uma fase intermediária, composta sobretudo de proteínas coaguladas. Transferiu-se a fase superior para um microtubo limpo e se adicionou, a seguir, igual volume de clorofórmio (MERCK) para a total retirada do excesso de proteína ainda existente. Depois de nova centrifugação (5 min/10.000 rpm/4 °C), a fase superior foi transferida para um microtubo limpo e adicionou-se 1 mL de isopropanol e 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3 M pH 5,3, para a retirada da água de solvatação do DNA, sendo as amostras acondicionadas de um dia para o outro no congelador (-20 °C), uma vez que a baixa temperatura diminui a solubilidade das moléculas, permitindo a precipitação do DNA. Após esta etapa, houve a retirada do isopropanol e acetato de sódio, por centrifugação (20 min /14.000 rpm/ 4 °C) formando um precipitado. As amostras foram secas ao ar livre, por inversão do tubo e lavadas com 1 mL de etanol 70% gelado (MERCK), esta etapa corresponde a re-hidratação do DNA para que não haja degradação. Antes da retirada do etanol 70%, fez-se uma centrifugação por 3 min a 10.000 rpm a 4°C. Na etapa final o DNA foi suspenso em solução de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase, para, então, ser armazenado em freezer a -20 °C.

### 3.4 Quantificação da extração de DNA

Para a quantificação do DNA extraído, cerca de 1-5  $\mu\text{L}$  de amostra DNA de *S. leucogaster* juntamente com tampão de carregamento de amostra (50 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol, 0,05 % xilenocianol) foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % (0,8 g de agarose - PHARMACIA, dissolvida em 100 mL de tampão TBE 0,5X: 0,45 M Tris-borato e 0,01 M EDTA – MERCK), em uma cuba horizontal (LIFE TECHNOLOGIES) a 5 V/cm, por 40 min. A visualização foi feita em um transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20), após 10 min de imersão em solução de brometo de etídio (MERCK) a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A quantificação é

feita por comparação com marcadores de concentração molecular conhecidos (10 ng/ $\mu$ L, 20 ng/ $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L e 100 ng/ $\mu$ L de DNA de bacteriófago lambda – GIBCO), e a partir da comparação da intensidade das bandas, obtêm-se uma estimativa da concentração de cada amostra extraída, como mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema da eletroforese em gel de agarose para a estimativa de quantificação de DNA.



Legenda: Na imagem à direita estão, em sequência, marcadores de concentração de 100 ng/ $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L, 20 ng/ $\mu$ L e 10 ng/ $\mu$ L de DNA de bacteriófago Lambda, e uma amostra de DNA genômico.

### 3.5 Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento

A amplificação da região controle do DNA mitocondrial foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR; MULLIS e FALOONA, 1987), utilizando-se os *primers* SIMCR-L160A (5'-ATCCACATTGCACATTTAAA-3'; STEEVES *et al.*, 2005a) e SdMCR-H750 (5'-GGGAACCAAAGAGGAAAACC-3'; STEEVES *et al.*, 2005a). Todas as amplificações foram feitas em reações de 15  $\mu$ L, contendo 0,5U/ $\mu$ L de DNA polimerase (*Tth*), 0,6  $\mu$ L dNTPs, 0,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, e 0,6  $\mu$ M de cada iniciador. O programa utilizado para a PCR consistiu em uma etapa inicial de desnaturação por 2 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de amplificação (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 54°C e 1 minuto a 72°C), e uma extensão final de 3 minutos a 72°C, conforme descrito em Steeves e colaboradores (2005a). Controles negativos foram incluídos em todas as amplificações. Foram amplificados fragmentos de cerca de 560 pares de bases (pb) do DNA mitocondrial.

O produto da PCR foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose 2 % (8g de agarose dissolvida em tampão TBE 0,5X), utilizando também o TBE 0,5X como tampão de corrida, para confirmação da amplificação dos fragmentos com tamanho esperado e da ausência de contaminação. São utilizados marcadores de tamanho conhecido em pares de bases (pb) para a identificação do fragmento amplificado.

A purificação e o seqüenciamento dos fragmentos amplificados pela PCR foram realizados em seqüenciador automático por meio de serviço terceirizado (MACROGEN Inc., <http://dna.macrogen.com/>).

### **3.6 Amplificação de fragmento do gene CHD para determinação do sexo**

A amplificação dos íntrons CHD-Z e CHD-W dos cromossomos sexuais foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os *primers* P2 (5'-TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT-3') e P8 (5'-CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG-3') (GRIFFITHS *et al.*, 1998). Todas as reações tiveram volume total de 10 µl, com a seguinte concentração final dos reagentes: 10 ng de DNA genômico, 1 µM de cada primer, 0,25 U de DNA polimerase (*Taq* BIOTOOLS), 1,4 µM de Tampão 10x com MgCl<sub>2</sub> e 0,4 µM de dNTP.

A termociclagem para a amplificação por PCR consistiu de uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundo (pareamento), 72°C por 45 segundos, e uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos. Todas as reações foram realizadas incluindo controle positivo e negativo (sem DNA genômico), a fim de testar contaminação e para garantir a fidelidade das amplificações da PCR.

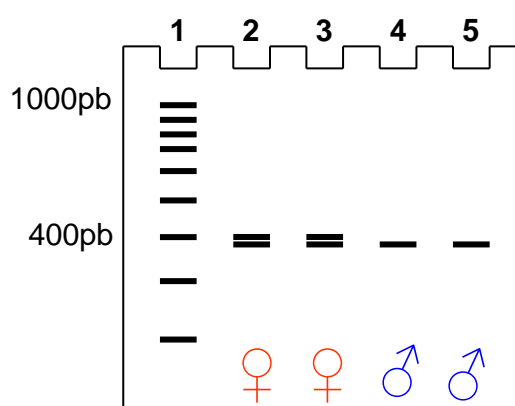
### **3.7 Visualização dos produtos amplificados após eletroforese em gel de 12% de poliacrilamida corado por prata**

Para cada 10 µl de produto amplificado foram adicionados a 2 µl de tampão de carregamento de amostra (30% de glicerol, 0,25 % de bromofenol e 0,25 % de



xilenocianol) e submetidos a uma eletroforese em cuba vertical com gel de 12 % de poliacrilamida (99:1 acrilamida:bis-acrilamida) em tampão TBE 1X (0,89 M Tris-borato e 0,02 M EDTA; SAMBROOK *et al.*, 1989), por três horas, a uma voltagem de 140 V. Isso permitiu a separação dos fragmentos gerados em amostras de fêmeas (ZW) e a visualização do fragmento gerado pelas amostras de machos (ZZ) (Figura 10). Após a eletroforese os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com Bassam e colaboradores (1991).

Figura 10 - Esquema da amplificação dos genes CHD-Z e CHD-W.



Legenda: Raia 1, marcador de tamanho de fragmento; raias 2 e 3, fêmeas (fragmento W, 400 pb e Z, 380 pb); raias 4 e 5, machos (fragmento Z, 380 pb).

Ao término da eletroforese, o gel de poliacrilamida foi submetido à coloração por nitrato de prata, que consiste na fixação em solução de ácido acético a 10 % durante 20 minutos; lavagem do gel, duas vezes, em água deionizada (Milli-Q) por 2 minutos e incubação por 30 minutos, sob agitação, em solução de coloração (que deve ser mantida protegida da luz), contendo para cada 600 mL: 0,84 g de nitrato de prata + 1260  $\mu$ L de formaldeído 34 % (adicionado imediatamente antes do uso). Após a coloração, o gel foi lavado novamente em água Milli-Q por 10 segundos e incubado em solução de revelação (que deve ser mantida sob refrigeração) contendo para cada 600 mL: 18 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro, 900  $\mu$ L de formaldeído 34 % e 120  $\mu$ L de tiosulfato de sódio (10 mg/mL) (os dois últimos adicionados apenas na hora do uso) (BASSAM *et al.*, 1991). As bandas aparecem quando o nitrato de prata, ligado por afinidade ao DNA, oxida em contato com o tiosulfato. Após o aparecimento das bandas, a revelação foi interrompida com solução de ácido acético 10 %. Em seguida, a solução foi retirada cuidadosamente e os géis

colocados em placas de vidro devidamente embrulhadas em papel celofane umedecido e postos para secar em temperatura ambiente.

### 3.8 Análise dos dados

#### 3.8.1 Systat

Após a identificação do sexo das amostras de tecido dos atobás marrons da Bacia de Campos, as proporções de machos e fêmeas e a diferença estatística entre elas testada através do teste do qui-quadrado utilizando o programa de análises estatísticas, Systat foram determinadas. Esse teste tem como princípio determinar se um conjunto de dados se adéqua estatisticamente a valores inferidos por um modelo específico, assim, foi estimado o valor esperado das frequências de machos e fêmeas a partir do número de amostras estudadas, com base na premissa de frequências iguais entre os sexos (ZAR, 1984).

#### 3.8.2 Seqman e Bioedit

As seqüências geradas foram alinhadas e editadas com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.1 (HALL, 1999). Além deste, o programa Seqman 7.1.0 também auxiliou na determinação de seqüências consenso. Os haplótipos mitocondriais foram definidos a partir da comparação com os já depositados em bancos de dados (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Neste, encontram-se depositados até o momento 118 haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster* do Atlântico, Pacífico, Índico e Caribe.

#### 3.8.3 Mega

As relações filogenéticas entre os haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster* (fragmentos de 480 pb) foram determinadas por

Máxima Verossimilhança (NEI e KUMAR, 2000), seguindo o modelo evolutivo de HKY 85 com distribuição gama e invariância utilizando 1.000 réplicas de *bootstrap*, implementado pelo programa MEGA versão 5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*; KUMAR *et al.*, 2004). O método de Máxima Verossimilhança requer um modelo probabilístico de evolução de caracteres e pode levar em consideração parâmetros com taxa de substituição entre pares de nucleotídeos em uma sequência de DNA, frequências de bases, proporção de sítos invariáveis e heterogeneidade de taxas de substituição entre sítos (NEI e KUMAR, 2000). O modelo de HKY 85 considera as diferenças entre as taxas de transição e transversão, assim como as desigualdades na frequências de bases. No entanto, outro método de construção de árvores filogenéticas - *Neighbor-Joining* (NJ; SAITOU e NEI, 1987) - e modelos de substituição de nucleotídeos (TN93+G+I) também foram testados. O critério de informação de Akaike (AIC) foi utilizado para testar se o modelo é adequado (AKAIKE, 1974).

#### 3.8.4 TCS

O programa TCS versão 1.21 foi usado para gerar a rede de haplótipos da região controle do DNAmít de *Sula leucogaster*. A rede haplotípica foi construída a partir dos preceitos de parcimônia implementados por Templeton e colaboradores (1992). Neste método, a rede é construída respeitando a probabilidade cumulativa (= 95 %) de que todas as diferenças entre cada duas seqüências sejam produto de substituições únicas (estado parcimonioso) e o haplótipo ancestral mais provável é identificado de acordo com a Teoria da Coalescência (CASTELLOE e TEMPLETON, 1994). As ambigüidades na rede são resolvidas de acordo com as regras de Crandall e Templeton (1993), segundo as quais: mutações raras devem aparecer num único indivíduo e os mutantes raros, por sua vez, se restringir a uma única população, exceto que existam altas taxas de fluxo gênico; haplótipos mais antigos devem apresentar maior freqüência e maior número de haplótipos descendentes, que diferem do original por poucas mutações; haplótipos mais antigos devem constituir topologias em forma de estrela com os mais novos; e haplótipos de uma mesma localidade devem manter-se próximos na rede.

### 3.8.5 Arlequin

As estatísticas sumárias (número de haplótipos; sítios polimórficos; diversidades haplotípicas e nucleotídicas) foram calculadas no programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). Nesse mesmo programa foi estimado o nível de estruturação genética entre as populações através do  $F_{ST}$ , que é uma estatística análoga à estatística  $F$  clássica de Wright, mas que leva em conta a distância entre os haplótipos. Esse programa também foi usado para estimar a diferença média entre pares de populações por meio de cálculo de distância genética simples (*uncorrected p distances*). Possíveis flutuações demográficas ocorridas, como gargalos (*bottlenecks*) e expansões, foram analisadas por meio de testes de neutralidade,  $D$  de Tajima e  $F_S$  de Fu, que assinalam valores significativamente negativos para esses eventos, utilizando o Arlequin 3.5. Também com este programa avaliamos a estrutura genética das supostas populações através da análise de variância molecular ou AMOVA (estatística  $\Phi$ ; EXCOFFIER *et al.*, 1992) com 10.000 permutações para os valores associados de  $P$ . A partir dos dados de  $F_{ST}$  correlacionamos matrizes de distâncias genéticas e geográficas através do teste de Mantel (Mantel, 1967) com 1.000 permutações. E foi testado a hipótese de expansão populacional através de *Mismatch Distribution* (SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999).

Os valores de  $F_{ST}$  par a par, são determinados a partir da permutação dos haplótipos entre pares de populações e podem ser utilizados para estimar as distâncias genéticas a curto prazo entre populações (WRIGHT, 1951 e 1965). O valor associado de  $P$  consiste na proporção de permutações que conduzem a valores de  $F_{ST}$  maiores ou iguais aos observados. Esta análise trabalha com a hipótese nula de que não existe diferenciação entre as populações (EXCOFFIER *et al.*, 2006). Sendo assim, valores de  $F_{ST}$  significativos ( $P < 0,05$ ) conduzem à rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que há diferenças significativas entre as populações analisadas. Já valores de  $F_{ST}$  não significativos ( $P > 0,05$ ) corroboram a hipótese nula, indicando que não há diferenças significativas entre elas. No entanto esta análise apresenta algumas desvantagens: (1) considera apenas frequências dos haplótipos, (2) não fornece modelo de estruturação, (3) não detecta subdivisão populacional quando há uma baixa diferenciação genética e (4) se baseia em premissa não realistas, onde o modelo assume inúmeras populações, todas com

tamanho grande e mesma taxa de migração, sendo a migração simétrica e totalmente aleatória, e ausência de seleção ou mutação. Embora as limitações do  $F_{ST}$  sejam reconhecidas ele ainda é considerado um bom estimador de estruturação (WHITLOCK e MCCAULEY, 1999; NEIGEL, 2002).

Outra maneira para analisar a diferenciação das populações é o teste exato, que trabalha com a hipótese nula de panmixia (não diferenciação) e a testa em uma distribuição ao acaso de  $k$  diferentes haplótipos ou genótipos entre  $r$  populações (EXCOFFIER *et al.*, 2006). Este teste baseia-se nos valores de  $p$ , onde estes sendo maiores que 0,05, a hipótese nula é aceita, ou seja, a população está em panmixia. E valores menores que 0,05, a hipótese nula é rejeitada, sendo assim, a população se encontra estruturada.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA, EXCOFFIER *et al.*, 1992) é semelhante a outras abordagens essencialmente com base na análise de variância das frequências gênicas, que leva em conta o número de mutações proposto entre haplótipos e testa a estrutura genética das populações através da determinação dos valores de estatística  $\Phi$ :  $\Phi_{CT}$  (responde pela variação entre grupos),  $\Phi_{SC}$  (pela variação entre populações dentro de grupos) e  $\Phi_{ST}$  (pela variação dentro de populações). Através da permutação de haplótipos, indivíduos ou populações, entre indivíduos, populações ou grupos de populações, é testada a significância dos índices de fixação (EXCOFFIER *et al.*, 2006). Os valores mais elevados e significativos ( $P < 0,05$ ) de  $\Phi_{CT}$  (equivalente ao  $F_{ST}$  neste caso) demonstram a melhor forma de estruturação das populações, ou seja, a diferenciação entre elas. Valores não significativos ( $P > 0,05$ ) indicam que não existe diferenciação entre as populações ou que a estrutura proposta para elas *a priori* não representa adequadamente sua estruturação.

A existência de fluxo gênico pode ser avaliada por valores de  $Nm$ , onde os valores são calculados a partir dos valores de diferenciação populacional usando frequências alélicas (EXCOFFIER *et al.*, 2006). Portanto, valores muito elevados de  $Nm$  permitem inferir que as populações testadas não se encontram estruturadas (não há diferenciação entre as populações), já valores menores ( $Nm > 1$ ) indicam que as populações se encontram estruturadas.

Para correlacionar a distância genética e distância geográfica das populações de *Sula leucogaster* foi utilizado o teste de Mantel. Este teste tem como premissa

avaliar a significância da correlação entre duas ou mais matrizes através de permutação, definindo o coeficiente de correlação entre os elementos dessas matrizes (EXCOFFIER *et al.*, 2006). As distâncias geográficas foram estimadas em quilômetros com o auxílio do programa *Google Earth* 2010. Os dados genéticos e geográficos foram compilados em gráficos através do *Microsoft Office Excel* 2003.

Para descrever a distribuição de diferenças nucleotídicas entre pares de seqüências de DNA, neste caso de haplótipos de DNA mitocondrial, baseado no modelo de expansão populacional súbita foi utilizada a análise de Mismatch Distributions (ROGERS e HARPENDING, 1992; HARPENDING *et al.*, 1998; SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999). Quando as populações permanecem em equilíbrio demográfico por um longo tempo apresentam distribuições caóticas e irregulares (multimodais), enquanto que aquelas que passaram por expansões demográficas recentes, resultado de efeito gargalo (*bottlenecks*) ou de efeito fundador, mostram distribuições homogêneas (unimodais). Neste caso, valores de  $P$  maiores que 0,05 conduzem à não rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que a distribuição das diferenças é compatível com a hipótese de expansão populacional súbita. Além disso, valores de *Sum of Squared Deviation (SSD)* e *Harpending's Raggedness Index (HRI)* mais baixos indicam expansão, enquanto que mais altos indicam populações estáveis.

Os testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) foram utilizados para avaliar se as populações estudadas estão sofrendo gargalos ou expansão súbita. Assim, caso exista influência desses fatores na estrutura genética das populações espera-se valores negativos de  $D$  e  $F_s$ . No entanto o teste Fu parece ser mais sensível que o teste  $D$  (HARTL e CLARK, 1997).

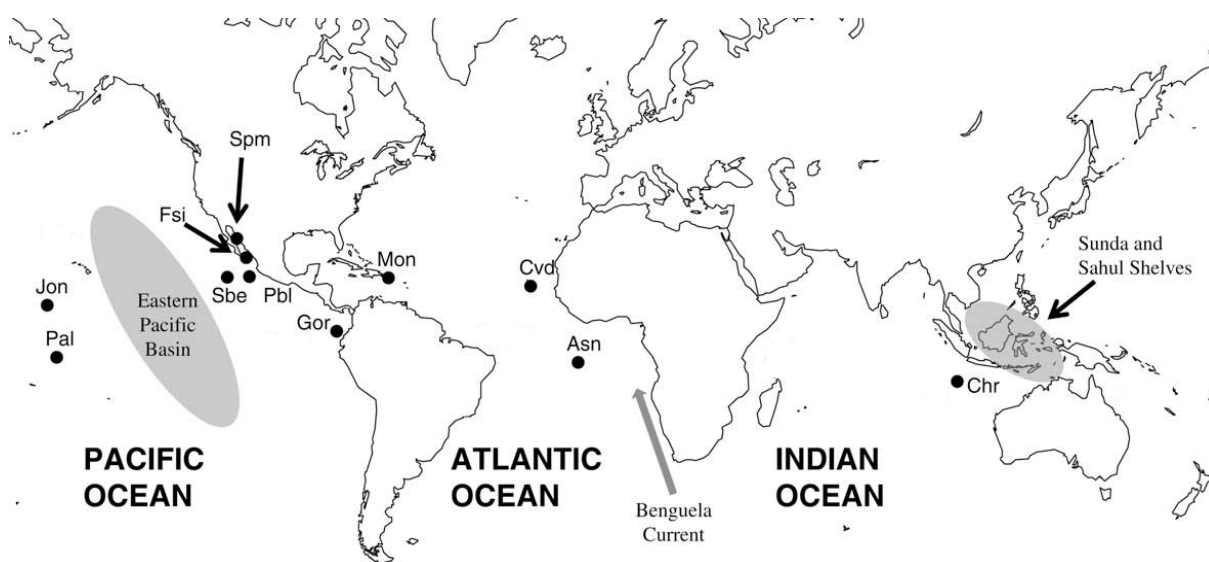
### 3.9 Dados para comparações

No presente estudo, foi utilizado somente um marcador mitocondrial para a avaliação da diversidade, estruturação e filogeografia de *Sula leucogaster* na Baía de Campos. Apesar de tais marcadores conterem informação limitada - fornecendo dados apenas sobre as linhagens maternas - e a duplicação para alguns genes em algumas espécies de aves marinhas (inclusive para *Sula leucogaster*) (ex: ABBOTT

*et al.*, 2005; MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010b); o conhecimento da evolução em concerto da região controle do DNA mitocondrial podem ser importantes, pois muitos genes adjacentes à esta região (por exemplo, o citocromo b, ND6, 12S rRNA) são utilizados na genética de populações e na pesquisa filogenética (YABSLEY *et al.*, 2006; MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010a e b). Além disso, o padrão de evolução em torno de seqüências da região controle duplicada podem fornecer informações sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela evolução em concerto do DNA mitocondrial (ABBOTT *et al.*, 2005).

Para determinar a relação entre as populações de atobá marrom provenientes da Bacia de Campos e outras localidades foram utilizados os dados gerados por MORRIS-POCOCK (2010) encontrados no genbank (GU059603.1 à GU059720,1), e inclui áreas no Oceano Pacífico, Atlântico, Índico e Caribe (Figura 11). As colônias amostradas dentro das localidades citadas podem ser visualizadas na Tabela 1. Amostras das colônias de Isla de San Benedicto, Piedra Blanca e San Pedro Mártir não foram usadas nas análises de diversidade gênica e estruturação devido ao baixo número amostral, sendo incluídas somente nas análises filogenéticas.

Figura 11 – Mapa de área de amostragem de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).



Fonte: Reproduzido de MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010.

Tabela 1 – Locais de amostragem, abreviatura e número de indivíduos amostrados por Morris-Pocock e colaboradores (2010).

| Colônia                 | Localização Geográfica | Abreviações | Número de amostras |
|-------------------------|------------------------|-------------|--------------------|
| Isla Monito             | Caribe                 | Mon         | 28                 |
| Cabo Verde              | Atlântico              | Cvd         | 25                 |
| Ascensão                | Atlântico              | Asn         | 23                 |
| Ilhas Christmas         | Índico                 | Xch         | 29                 |
| Atol de Palmira         | Pacífico Central       | Pal         | 28                 |
| Atol de Johnston        | Pacífico Central       | Jon         | 30                 |
| Isla Gorgona            | Pacífico Oriental      | Gor         | 30                 |
| Isla de San Benedicto   | Pacífico Oriental      | Sbe         | 8                  |
| Piedra Blanca           | Pacífico Oriental      | Pbl         | 6                  |
| Farallón de San Ignacio | Golfo da Califórnia    | Fsi         | 28                 |
| San Pedro Mártir        | Golfo da Califórnia    | Spm         | 7                  |
| Total                   |                        |             | 242                |

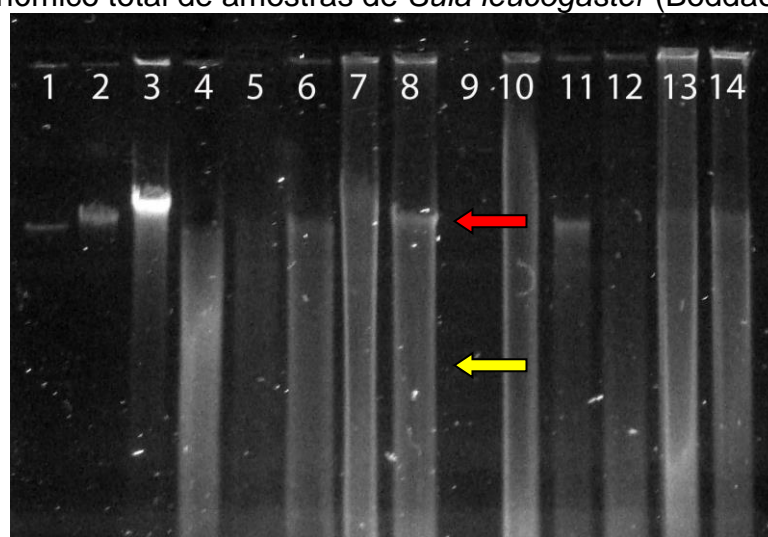


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Purificação de DNA gênomico e amplificação por PCR

Ao todo, foram coletadas 91 amostras de tecido de *Sula leucogaster* encontradas mortas ao longo da litoral da Baía de Campos. Do número total de amostras de aves encalhadas obtidas, somente em 68 houve sucesso na extração de DNA genômico com qualidade suficiente para ser utilizado na PCR. A dificuldade de se obter DNA genômico de alto peso molecular e de qualidade se deve a degradação dos tecidos coletados, devido à decomposição pós-morte; como é possível ver na figura 12. Também devido à alta degradação do DNA houve dificuldade na amplificação por PCR. Das 68 amostras foi possível a amplificação da região controle do DNA mitocondrial de 61 amostras, gerando fragmentos de 560 pares de bases (pb) (Figura 13 a). Para a identificação do sexo, a amplificação de fragmentos de íntrons dos genes CHD-Z e CHD-W geraram fragmentos de 400 e 380 pb, respectivamente em 60 amostras (Figura 13 b). Todas as amostras que tiveram a região controle do DNA mitocondrial amplificada e a identificação do sexo podem ser visualizadas na tabela 2.

Figura 12 - Gel de agarose 0,8 % apresentando exemplo de quantificação do DNA genômico total de amostras de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).



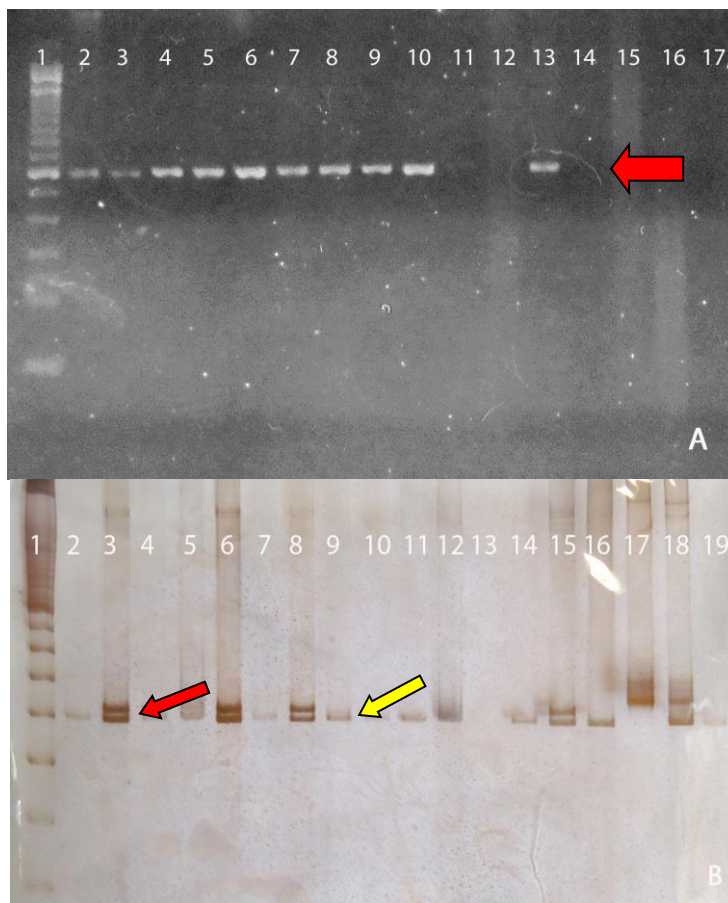
Legenda: Raias: (1) - padrão de concentração de DNA de bacteriófago lambda 10 ng; (2) - padrão de concentração de DNA de bacteriófago lambda 50 ng; (3-14) - DNA de diferentes amostras de *Sula leucogaster*.

Nota: A seta vermelha indica o DNA genômico de alto peso molelular e a seta amarela indica arrasto de degradação do DNA.

## 4.2 Análise da proporção sexual

Das 91 amostras de *Sula leucogaster* encalhados na baía de Campos foi possível fazer a determinação do sexo de somente 60 amostras, onde estas não indicaram diferentes proporções entre fêmeas (47 %) e machos (52 %). Os outros trinta e um indivíduos não puderam ser sexualmente identificados, devido ao avançado estado de decomposição. Conseqüentemente, o teste do qui quadrado demonstrou que não houve diferenças nas proporções dos sexos de *Sula leucogaster* para as amostras da Baía de Campos Sul ( $\chi^2 = 0.153$ ;  $df = 1$ ;  $P \approx 0.696$ ).

Figura 13 - Sexos de *Sula leucogaster* para as amostras



Legenda: (a) Gel de agarose 2 % apresentando exemplo de amplificação da região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783). Raias: (1) marcador de tamanho de fragmento *Gene Ruler* 100pb DNA *ladder*: 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 e 80 pb; (2-16) produtos amplificados de diferentes amostras de *Sula leucogaster* (17) controle negativo da PCR. A seta vermelha indica produto da PCR onde a banda corresponde a cerca de 500 pb. (b) Gel de acrilamida 12% apresentando exemplo de amplificação dos íntrons dos genes CHD-Z e CHD-W. Raias (1) marcador de tamanho de fragmento *Gene Ruler* e raias (2-19) produto de amplificação para identificação sexual. A seta vermelha indica o padrão para fêmeas e a seta amarela o padrão para macho.

Tabela 2 – Número de tombo UERJ, identificação do sexo para 60 amostras e identificação haplotípica para 61 amostras de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).

| Amostras de <i>Sula leucogaster</i> - GEMM-Lagos / Projeto Habitats |       |           | Amostras de <i>Sula leucogaster</i> - GEMM-Lagos / Projeto Habitats |       |           |
|---|-------|-----------|---|-------|-----------|
| Amostras de encalhe   | sexo  | haplótipo | Amostras de encalhe   | sexo  | haplótipo |
| UERJ/SL 1   | macho |           | UERJ/SL 47  | fêmea | BC_2      |
| UERJ/SL 2   | fêmea | BC_1      | UERJ/SL 48  | macho | BC_7      |
| UERJ/SL 3   | fêmea | BC_1      | UERJ/SL 49  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 4   | fêmea | BC_26     | UERJ/SL 50  | macho | BC_1      |
| UERJ/SL 5   | fêmea |           | UERJ/SL 51  |       |           |
| UERJ/SL 6   | fêmea | BC_19     | UERJ/SL 52  | fêmea | BC_2      |
| UERJ/SL 7   | fêmea | BC_2      | UERJ/SL 53  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 8   | fêmea | BC_20     | UERJ/SL 54  |       | BC_8      |
| UERJ/SL 9   | macho |           | UERJ/SL 55  | fêmea |           |
| UERJ/SL 10  | macho |           | UERJ/SL 56  | fêmea | BC_2      |
| UERJ/SL 11  |       |           | UERJ/SL 57  | fêmea | BC_1      |
| UERJ/SL 12  |       |           | UERJ/SL 58  |       | BC_3      |
| UERJ/SL 13  | macho |           | UERJ/SL 59  | macho |           |
| UERJ/SL 14  | fêmea |           | UERJ/SL 60  | fêmea |           |
| UERJ/SL 15  | fêmea |           | UERJ/SL 61  | fêmea | BC_24     |
| UERJ/SL 16  |       |           | UERJ/SL 62  | macho | BC_18     |
| UERJ/SL 17  | fêmea | BC_23     | UERJ/SL 63  | fêmea | BC_11     |
| UERJ/SL 18  | macho | BC_4      | UERJ/SL 64  |       | BC_2      |
| UERJ/SL 19  | macho | BC_3      | UERJ/SL 65  |       |           |
| UERJ/SL 20  | macho | BC_02     | UERJ/SL 66  |       |           |
| UERJ/SL 21  | macho | BC_22     | UERJ/SL 67  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 22  |       |           | UERJ/SL 68  | macho | BC_9      |
| UERJ/SL 23  |       |           | UERJ/SL 69  | macho | BC_4      |
| UERJ/SL 24  |       |           | UERJ/SL 70  | macho |           |
| UERJ/SL 25  |       |           | UERJ/SL 71  | macho |           |
| UERJ/SL 26  | macho | BC_13     | UERJ/SL 72  |       |           |
| UERJ/SL 27  |       |           | UERJ/SL 73  |       |           |
| UERJ/SL 28  | fêmea | BC_14     | UERJ/SL 74  |       |           |
| UERJ/SL 29  |       | BC_1      | UERJ/SL 75  |       |           |
| UERJ/SL 30  |       | BC_4      | UERJ/SL 76  |       |           |
| UERJ/SL 31  |       | BC_4      | UERJ/SL 77  | macho | BC_6      |
| UERJ/SL 32  | fêmea | BC_7      | UERJ/SL 78  |       |           |
| UERJ/SL 33  |       |           | UERJ/SL 79  | fêmea | BC_10     |
| UERJ/SL 34  | macho | BC_1      | UERJ/SL 80  | fêmea | BC_11     |
| UERJ/SL 35  | fêmea | BC_11     | UERJ/SL 81  |       | BC_12     |
| UERJ/SL 36  | fêmea | BC_15     | UERJ/SL 82  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 37  | fêmea | BC_5      | UERJ/SL 83  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 38  | macho | BC_16     | UERJ/SL 84  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 39  |       |           | UERJ/SL 85  |       |           |
| UERJ/SL 40  | fêmea |           | UERJ/SL 86  | macho |           |
| UERJ/SL 41  | fêmea | BC_2      | UERJ/SL 87  | fêmea | BC_2      |
| UERJ/SL 42  |       |           | UERJ/SL 88  | macho | BC_2      |
| UERJ/SL 43  | macho | BC_6      | UERJ/SL 89  |       |           |
| UERJ/SL 44  | macho | BC_2      | UERJ/SL 90  |       |           |
| UERJ/SL 45  |       |           | UERJ/SL 91  |       |           |
| UERJ/SL 46  | macho | BC_17     |   |       |           |

### 4.3 Aparente heteroplasmia

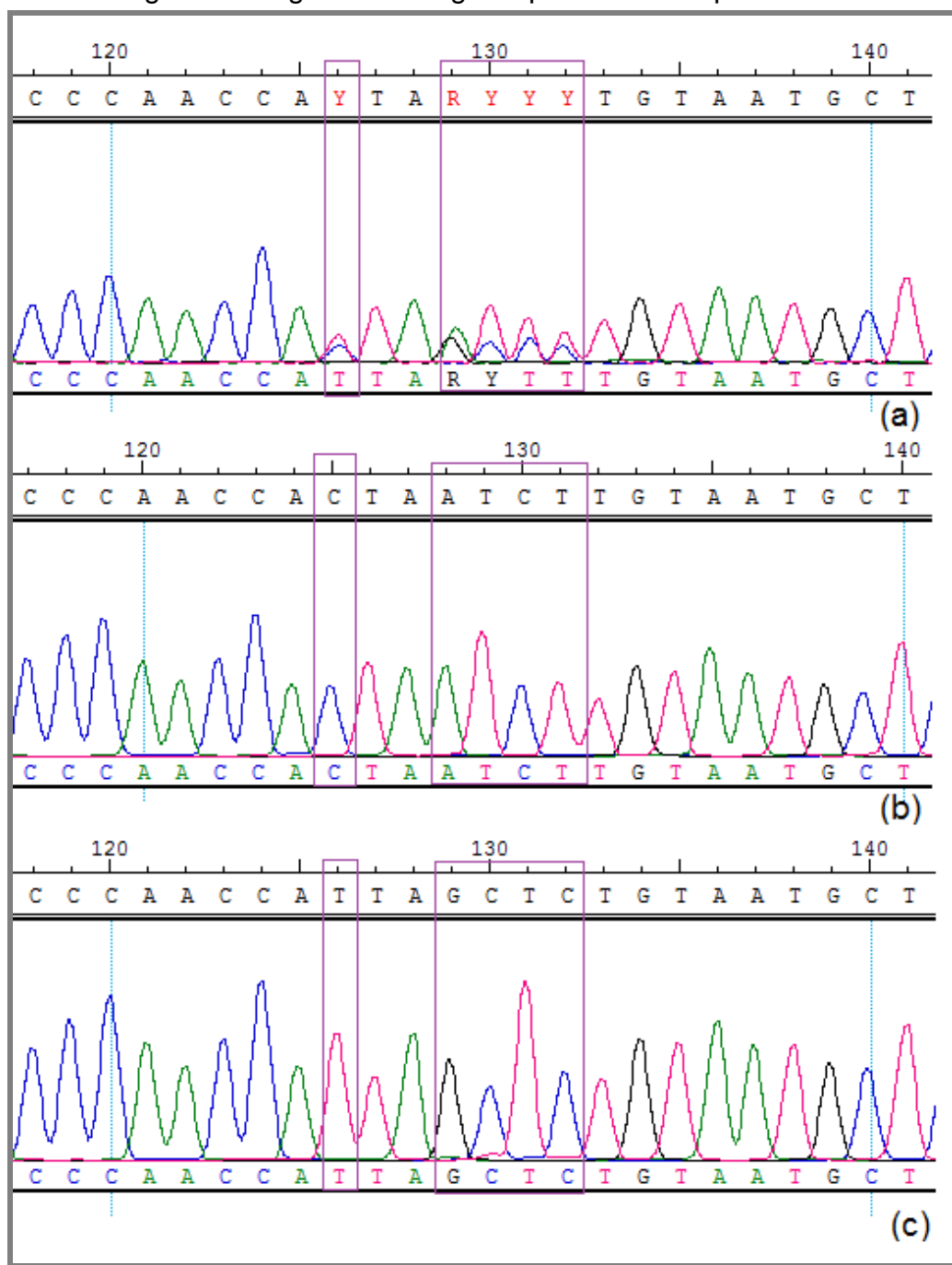
Foi possível visualizar no eletroferograma do seqüenciamento que nove amostras possuem regiões ambíguas (ou seja, locais onde duas bases estavam presentes no mesmo local), estas ambigüidades estavam presentes em ambas as direções no seqüenciamento. Esse fato pode sugerir uma heteroplasmia para *Sula leucogaster*, como já foi documentado no estudo de Morris e colaboradores (2010). No entanto, outras metodologias precisariam ser aplicadas para validar a existência de heteroplasmia para essas amostras.

Embora não se possa afirmar a heteroplasmia verdadeira para amostras de *Sula leucogaster* da Bacia de Campos foi possível encontrar, para seis seqüências que possuem as mesmas regiões ambíguas, as respectivas seqüências idênticas e puras para a região com ambigüidade (Figura 14). Este fato reforça uma possível heteroplasmia verdadeira. Entretanto, para quatro seqüências ambíguas não foram encontradas as seqüências puras. Na Tabela 3 é possível visualizar a posição e quantidades de bases duplas numa mesma região encontradas nas amostras da Bacia de Campos. Com a finalidade de não prejudicar a interpretação dos dados gerados, todas as seqüências ambíguas foram retiradas das análises de diversidade, composição e estruturação genética.

### 4.4 Composição genética das populações de *Sula leucogaster*

A identificação dos haplótipos de DNA mitocondrial das 61 amostras analisadas da Bacia de Campos foi baseada em fragmento de 489 pb (região mais informativa dos 560 pb obtidos), e foram gerados 26 haplótipos que podem ser observados na Tabela 4, com suas respectivas freqüências para região estudada. Os sítios polimórficos que diferenciam cada haplótipo e a posição destes sítios, considerando fragmentos de 480 pb, constam na Tabela 5. Os haplótipos encontrados são exclusivos da Bacia de Campos, ou seja, estes não são encontrados em nenhuma outra localidade, comparando com dados gerados por Morris-Pocock e colaboradores (2010).

Figura 14 – Visualização do eletroferograma do seqüenciamento destacando as regiões ambíguas e as regiões puras com as possíveis substituições



Legenda: Sendo (a) - seqüência ambígua; (b) seqüência pura 1; (c) - seqüência pura 2.

Tabela 3 – Regiões com as referentes posições e nucleotídeos de ambigüidades nas seqüências de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) geradas a partir de amostras coletadas na Bacia de Campos, considerando 480 pares de bases.

| Amostras   | Posição na sequencia | Nucleotídeos ambíguos |
|------------|----------------------|-----------------------|
| UERJ/SI01  | 67                   | C/T                   |
|            | 70                   | G/A                   |
|            | 71                   | C/T                   |
|            | 72                   | C/T                   |
| UERJ/SI12  | 67                   | C/T                   |
|            | 70                   | G/A                   |
|            | 71                   | C/T                   |
|            | 72                   | C/T                   |
| UERJ/SI14  | 67                   | C/T                   |
|            | 70                   | G/A                   |
|            | 71                   | C/T                   |
|            | 72                   | C/T                   |
| UERJ/SI 15 | 67                   | C/T                   |
|            | 70                   | G/A                   |
|            | 71                   | C/T                   |
|            | 72                   | C/T                   |
| UERJ/SI 24 | 186                  | A/G                   |
|            | 207                  | A/G                   |
| UERJ/SI40  | 133                  | C/T                   |
|            | 159                  | C/T                   |
| UERJ/SI60  | 67                   | C/T                   |
|            | 70                   | G/A                   |
|            | 71                   | C/T                   |
|            | 72                   | C/T                   |
| UERJ/SI70  | 272                  | C/T                   |
| UERJ/SI71  | 207                  | A/G                   |

Figura 15 - Representatividade dos haplótipos na Bacia de Campos, RJ (BC) e suas respectivas freqüências em 61 amostras de carcaça de *Sula leucogaster*.

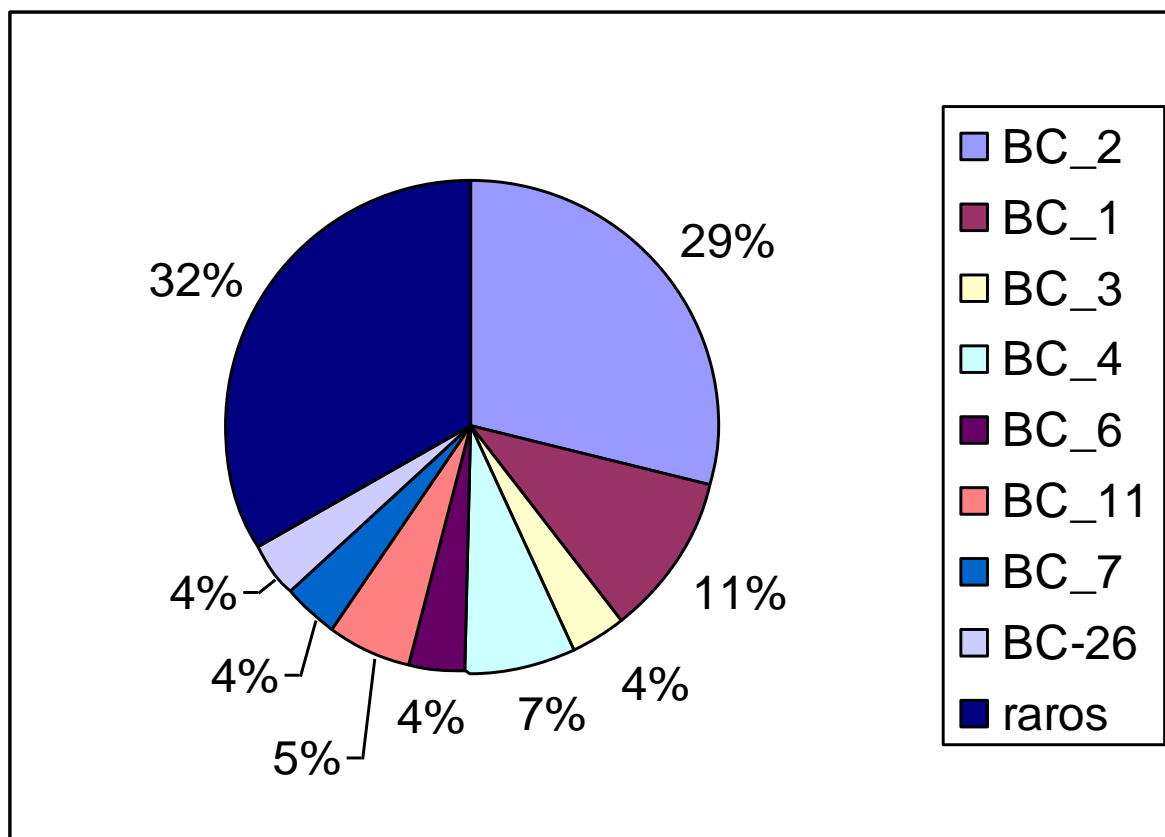


Tabela 4 - Posição dos sítios polimórficos dos vinte e quatro haplótipos (excluindo haplótipos com heteroplasmia) da região controle do DNA mitocondrial encontrados para as amostras de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) da Baía de Campos (RJ).

| Haplótipos | Posição dos sítios polimórficos |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|            | 1                               | 4 | 6 | 7 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 |
| BC-1       | A                               | C | C | A | T | C | T | T | G | T | A | C | C | C | T | A | T | C | T | T | A | T | A | C | T | G |   |
| BC-2       | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| BC-3       | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-4       | .                               | . | T | G | C | T | C | . | A | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-5       | G                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . |
| BC-6       | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-7       | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | T | T | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . |
| BC-8       | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . |
| BC-9       | .                               | . | . | . | . | . | . | C | A | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-10      | .                               | . | T | G | C | T | C | . | A | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | C | . | . |
| BC-11      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| BC-12      | .                               | T | T | G | C | T | C | . | A | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-13      | .                               | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | A | . |
| BC-14      | .                               | . | T | G | C | T | C | . | A | C | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-15      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | C | G | . | . | . | . |
| BC-16      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | C | T | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-17      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . |
| BC-18      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . |
| BC-19      | .                               | . | T | G | C | T | C | . | A | . | . | . | . | . | . | . | C | . | C | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-20      | .                               | . | . | . | C | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-22      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | T | . | T | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |
| BC-23      | .                               | . | T | G | C | T | C | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | C | . | . | . | . | . |
| BC-24      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| BC-26      | .                               | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . |



Os índices de diversidade foram estimados para as populações da Bacia de Campos considerando-se o fragmento de 489 pb. Para gerar esses dados além da retirada dos haplótipos com possível heteroplasmia, dois haplótipos foram excluídos dessas análises por não completarem 489 pb, o que poderia comprometer a leitura dos dados gerados. Com o intuito de comparar as populações de *Sula leucogaster* da localidade amostrada com dados já existentes para o Oceano Atlântico (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010), os índices de diversidade foram estimados para as três áreas (Tabela 6). Em todos os casos, os índices de diversidade das populações do Atlântico são baixos. Os índices de diversidade também foram gerados comparando machos e fêmeas das amostras da Bacia de Campos (Tabela 7). Os dados não mostram variação expressiva entre os índices.

Tabela 5 – Índices de diversidade para as populações de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) do oceano Atlântico, considerando fragmento de DNA mitocondrial de 489 pares de bases.

| Populações         | Índices de Diversidade |     |    |    |                      |                          |                          |
|--------------------|------------------------|-----|----|----|----------------------|--------------------------|--------------------------|
|                    | N                      | pb  | S  | H  | <i>h</i>             | $\pi$                    | <i>k</i>                 |
| Bacia de Campos/RJ | 50                     | 489 | 25 | 22 | 0.8800 +/-<br>0.0374 | 0.007931 +/-<br>0.004494 | 3.878367 +/-<br>1.980095 |
| Cabo Verde         | 25                     | 489 | 10 | 7  | 0.8600 +/-<br>0.0361 | 0.004867 +/-<br>0.003053 | 2.380000 +/-<br>1.339856 |
| Ascensão           | 23                     | 489 | 14 | 9  | 0.8538 +/-<br>0.0442 | 0.009522 +/-<br>0.005402 | 4.656126 +/-<br>2.368535 |

Legenda: Onde: N = número amostral, pb = tamanho do fragmento utilizável em pares de bases, S = número de sítios variáveis, H = número de haplótipos, *h* = diversidade haplotípica,  $\pi$  = diversidade nucleotídica e *k* = número médio de diferenças pareadas.

Tabela 6 – Índices de diversidade para a população de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) da Bacia de Campo/Rio de Janeiro, separados por gêneros considerando fragmento de DNA mitocondrial de 489 pares de bases.

| Populações | Índices de Diversidade |     |    |    |                      |                          |                          |
|------------|------------------------|-----|----|----|----------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | N                      | pb  | S  | H  | <i>h</i>             | $\pi$                    | <i>k</i>                 |
| BC/fêmeas  | 20                     | 489 | 18 | 11 | 0.8895 +/-<br>0.0522 | 0.008492 +/-<br>0.004923 | 4.152632 +/-<br>2.155523 |
| BC/machos  | 23                     | 489 | 18 | 13 | 0.8775 +/-<br>0.0607 | 0.006369 +/-<br>0.003824 | 3.114625 +/-<br>1.676830 |

Legenda: Onde: N = número amostral, pb = tamanho do fragmento utilizável em pares de bases, S = número de sítios variáveis, H = número de haplótipos, *h* = diversidade haplotípica,  $\pi$  = diversidade nucleotídica e *k* = número médio de diferenças pareadas.

Com o objetivo de comparar a região da Bacia de Campos com outras localidades do mundo, foram considerados os dados gerados por Morris- Pocock e colaboradores (2010) para o Oceano Pacífico, Oceano Índico e Caribe. Na Tabela 8, estão apresentados os índices de diversidade. Comparativamente, as colônias de *Sula leucogaster* dos Oceanos Índico e Pacífico Central apresentam número de sítios polimórficos e médio de diferenças pareadas mais elevados do que as demais colônias.

Tabela 7 – Índices de diversidade para as populações de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) em colônias do Oceano Pacífico, Índico e Mar do Caribe, considerando fragmento de DNA mitocondrial de 489 pares de bases.

| Populações                  | Índices de Diversidade |     |    |    |                      |                          |                           |
|-----------------------------|------------------------|-----|----|----|----------------------|--------------------------|---------------------------|
|                             | N                      | pb  | S  | H  | <i>h</i>             | $\pi$                    | <i>k</i>                  |
| Bacia de Campos/RJ          | 50                     | 489 | 25 | 22 | 0.8800 +/-<br>0.0374 | 0.007931 +/-<br>0.004494 | 3.878367 +/-<br>1.980095  |
| Xch/ Índico                 | 29                     | 489 | 44 | 25 | 0.9877 +/-<br>0.0133 | 0.022011 +/-<br>0.011483 | 10.741379 +/-<br>5.034492 |
| Mon/Caribe                  | 28                     | 489 | 19 | 16 | 0.9339 +/-<br>0.0279 | 0.010782 +/-<br>0.005977 | 5.283069 +/-<br>2.630610  |
| Pal/ Pacífico Central       | 28                     | 489 | 68 | 7  | 0.6614 +/-<br>0.0932 | 0.017185 +/-<br>0.009127 | 8.420635 +/-<br>4.016967  |
| Fsi/ Golfo da<br>Califórnia | 28                     | 489 | 23 | 19 | 0.9206 +/-<br>0.0440 | 0.007013 +/-<br>0.004112 | 3.436508 +/-<br>1.809683  |
| Gor/ Pacífico Oriental      | 28                     | 489 | 19 | 8  | 0.6614 +/-<br>0.0936 | 0.006943 +/-<br>0.004077 | 3.402116 +/-<br>1.794315  |

Legenda: Onde: N = número amostral, pb = tamanho do fragmento utilizável em pares de bases, S = número de sítios variáveis, H = número de haplótipos, *h* = diversidade haplotípica,  $\pi$  = diversidade nucleotídica e *k* = número médio de diferenças pareadas.

#### 4.5 Estrutura genética das colônias de *Sula leucogaster*

Para avaliar a estrutura das colônias de *Sula leucogaster* foram realizados três testes. O primeiro consistiu na determinação dos índices de fixação ( $F_{ST}$  par a par, Tabela 9), o segundo, o teste exato de não diferenciação entre populações (valores de *p*, Tabela 10) e o terceiro, a análise de variância molecular (AMOVA) entre diferentes grupos de supostas populações (Tabela 11).

Tabela 8 – Diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as nove localidades do Atlântico, Pacífico, Caribe e Índico (diagonal inferior) e os valores associados de  $P$  (diagonal superior).

| $F_{ST}$ e $P$ | BC      | Asn     | Cvd     | Mon     | Xch     | Fsi     | Gor     | Pal     | Jon     |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| BC             |         | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| Asn            | 0,12507 |         | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| Cvd            | 0,12234 | 0,14309 |         | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| Mon            | 0,08767 | 0,10548 | 0,10270 |         | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| Xch            | 0,06158 | 0,07809 | 0,07546 | 0,03917 |         | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| Fsi            | 0,09397 | 0,11219 | 0,10937 | 0,07275 | 0,04577 |         | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| Gor            | 0,19412 | 0,22432 | 0,22032 | 0,18232 | 0,15496 | 0,18890 |         | 0,00000 | 0,00000 |
| Pal            | 0,21178 | 0,24542 | 0,24105 | 0,20238 | 0,17478 | 0,20899 | 0,31731 |         | 0,00000 |
| Jon            | 0,14621 | 0,16923 | 0,16594 | 0,12889 | 0,10181 | 0,13547 | 0,24368 | 0,26389 |         |

Nota: Os valores seguintes aos de  $P$  correspondem ao desvio padrão. (\*)  $P < 0,05$ .

Tabela 9 – Valores de  $p$  do teste exato de não diferenciação entre populações, considerando nove localidades de amostragem de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).

| $P$ | BC      | Asn     | Cvd     | Mon     | Xch     | Fsi     | Gor     | Pal     | Jon |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| BC  |         |         |         |         |         |         |         |         |     |
| Asn | 0,00000 |         |         |         |         |         |         |         |     |
| Cvd | 0,00000 | 0,00000 |         |         |         |         |         |         |     |
| Mon | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |         |         |         |         |         |     |
| Xch | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |         |         |         |         |     |
| Fsi | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |         |         |         |     |
| Gor | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |         |         |     |
| Pal | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |         |     |
| Jon | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |     |

Nota: Os valores seguintes ao principal correspondem ao desvio padrão. (\*)  $P < 0,05$ .

Tabela 10 – Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as três localidades de sítios reprodutivos de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) no Oceano Atlântico.

| Populações     | Variação | %     | estatística $\Phi$     | <i>P-value</i>      |
|----------------|----------|-------|------------------------|---------------------|
| 1_Cvd X BC+Asn | AG       | 0,22  | $\Phi_{CT} = 0,00221$  | 0,66911 +/- 0,00497 |
|                | AP/WG    | 12,56 | $\Phi_{SC} = 0,12583$  | 0,00000 +/- 0,00000 |
|                | WP       | 87,22 | $\Phi_{ST} = 0,12777$  | 0,00000 +/- 0,00000 |
| 2_Asn X BC+Cvd | AG       | 0,75  | $\Phi_{CT} = -0,00754$ | 0,33634 +/- 0,00495 |
|                | AP/WG    | 12,23 | $\Phi_{SC} = 0,12325$  | 0,00000 +/- 0,00000 |
|                | WP       | 87,01 | $\Phi_{ST} = 0,12986$  | 0,00000 +/- 0,00000 |
| 3_BC X Asn+Cdv | AG       | -1,75 | $\Phi_{CT} = -0,01748$ | 1,00000 +/- 0,00000 |
|                | AP/WG    | 14,20 | $\Phi_{SC} = 0,13953$  | 0,00000 +/- 0,00000 |
|                | WP       | 87,55 | $\Phi_{ST} = 0,12449$  | 0,00000 +/- 0,00000 |

Legenda: Populações: BC = Baía de Campos, Asn = Ascensão e Cvd = Cabo Verde; Componentes da variação e respectivos valores de estatística  $\Phi$ : AG = entre grupos ( $\Phi_{CT}$ ), AP/WG = entre populações / dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ ) e WP = dentro de populações ( $\Phi_{ST}$ ). Onde: % = porcentagem de variação e *P-value* = valor associado de *P*.

Para realizar a análise de AMOVA, os cenários foram idealizados a partir dos dados filogenéticos, Então foram testados primeiramente os agrupamentos com dados do Oceano Atlântico. Com o objetivo de averiguar a existência de estruturação entre as localidades amostradas em outros oceanos, quando os dados da Baía de Campos estão presentes, tais haplótipos foram agrupados de acordo com dados filogenéticos a cada região amostrada no mundo (dados gerados por Morris-Pocock e colaboradores, 2010), dividindo-se em cinco grupos: Atlântico, Pacífico Oriental, Pacífico Central, Mar do Caribe e Índico (Tabela 12),

Tabela 11 - Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as nove localidades de sítios reprodutivos de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) nos oceanos Índico, Pacífico, Atlântico e Mar do Caribe

| Populações  | Variação | %     | $\Phi$ statistics    | P-value                                 |
|---|----------|-------|----------------------|---|
| 1_Xch+BC X Cvd + Asn X Mon X Fsi<br>+Gor X Jon +Pal     | AG       | -0,74 | $\Phi$ CT = -0,00738 | 0,63475+-0,00503<br>0,00000 +/- 0,00000 |
|   | AP/WG    | 15,97 | $\Phi$ SC = 0,15854  | 0,00000 +/- 0,00000                     |
|   | WP       | 84,77 | $\Phi$ ST = 0,15234  |   |
| 2_Xch X BC +Cvd + Asn X Mon X<br>Fsi +Gor X Jon +Pal    | AG       | -2,91 | $\Phi$ CT = -0,02915 | 0,90030+-0,00290<br>0,00000 +/- 0,00000 |
|   | AP/WG    | 17,86 | $\Phi$ SC = 0,17359  | 0,00000 +/- 0,00000                     |
|   | WP       | 85,05 | $\Phi$ ST = 0,14950  |   |
| 3_Xch X Cvd + Asn X Mon + BC X<br>Fsi +Gor X Jon +Pal   | AG       | -1,70 | $\Phi$ CT = -0,01704 | 0,87416+-0,00312<br>0,00000 +/- 0,00000 |
|   | AP/WG    | 16,85 | $\Phi$ SC = 0,16564  | 0,00000 +/- 0,00000                     |
|   | WP       | 84,86 | $\Phi$ ST = 0,15142  |   |
| 4_Xch X Cvd + Asn X Mon X Fsi +<br>Gor + BC X Jon + Pal | AG       | -3,47 | $\Phi$ CT = -0,03468 | 0,95040+-0,00195<br>0,00000 +/- 0,00000 |
|   | AP/WG    | 18,31 | $\Phi$ SC = 0,17692  | 0,00000 +/- 0,00000                     |
|   | WP       | 85,16 | $\Phi$ ST = 0,14838  |   |
| 5_Xch X Cvd + Asn X Mon X Fsi +<br>Gor X Jon + Pal + BC | AG       | -4,29 | $\Phi$ CT = -0,04286 | 0,99050+-0,00098<br>0,00000 +/- 0,00000 |
|   | AP/WG    | 19,01 | $\Phi$ SC = 0,18232  | 0,00000 +/- 0,00000                     |
|   | WP       | 85,27 | $\Phi$ ST = 0,14728  |   |

Legenda: Populações: BC = Bacia de Campos, Asn = Ascensão e Cvd = Cabo Verde; Pal=Atol de Palmira, Gor = Isla Gorgona, Mon = Isla Monito, Fsi = Farallón de San Ignacio e Jon = Atol de Johnston, Componentes da variação e respectivos valores de estatística  $\Phi$ : AG = entre grupos ( $\Phi$ CT), AP/WG = entre populações / dentro de grupos ( $\Phi$ SC) e WP = dentro de populações ( $\Phi$ ST), Onde: % = porcentagem de variação e P-value = valor associado de P.

Além disso, foi estimado o número efetivo de fêmeas migrantes por geração ( $N_m$ ) entre as nove colônias, onde alguns valores são maiores que 1, assim evidenciando algum fluxo gênico materno entre estas populações (Tabela 13).

Tabela 12 – Número de migrantes por geração ( $N_m$ ) entre as populações de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).

| $N_m$ | BC      | Asn     | Cvd     | Mon      | Fsi      | Gor     | Pal     | Jon     | Xch |
|-------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|-----|
| BC    |         |         |         |          |          |         |         |         |     |
| Asn   | 3,28238 |         |         |          |          |         |         |         |     |
| Cvd   | 3,36457 | 2,99422 |         |          |          |         |         |         |     |
| Mon   | 4,80834 | 4,24040 | 4,36851 |          |          |         |         |         |     |
| Fsi   | 4,47191 | 3,95684 | 4,07166 | 6,37273  |          |         |         |         |     |
| Gor   | 1,96626 | 1,72901 | 1,76945 | 2,24238  | 2,14684  |         |         |         |     |
| Pal   | 1,76281 | 1,53734 | 1,57426 | 1,97059  | 1,89241  | 1,07572 |         |         |     |
| Jon   | 2,75514 | 2,45449 | 2,51307 | 1,97059  | 3,19082  | 1,55189 | 1,39476 |         |     |
| Xch   | 6,86476 | 5,90318 | 6,12645 | 12,26330 | 10,42367 | 2,72663 | 2,36070 | 4,41096 |     |

Legenda: Populações: BC = Bacia de Campos, Asn = Ascensão e Cvd = Cabo Verde; Pal=Atol de Palmira, Gor = Isla Gorgona, Mon = Isla Monito, Fsi = Farallón de San Ignacio e Jon = Atol de Johnston.

Os valores de  $F_{ST}$  par a par significativos ( $P < 0,05$ ) verificados entre Bacia de Campos e dados gerados por Morris-Pocock e colaboradores (2010), demonstram que há diferenças significativas entre as populações amostradas, sugerindo a existência de estoque de *Sula leucogaster* no litoral do Rio de Janeiro, como pode ser visualizado na Tabela 9. O mesmo é indicado pelos valores significativos de  $p$  ( $< 0,05$ ) do teste exato (Tabela 10). No entanto não é possível avaliar a estruturação pela AMOVA em função dos valores de  $\Phi_{CT}$  não significativos e pelos elevados valores de  $N_m$  (Tabelas 11, 12 e 13) entre essas populações.

#### 4,6 Relações filogenéticas e filogeográficas entre os haplótipos de *Sula leucogaster*

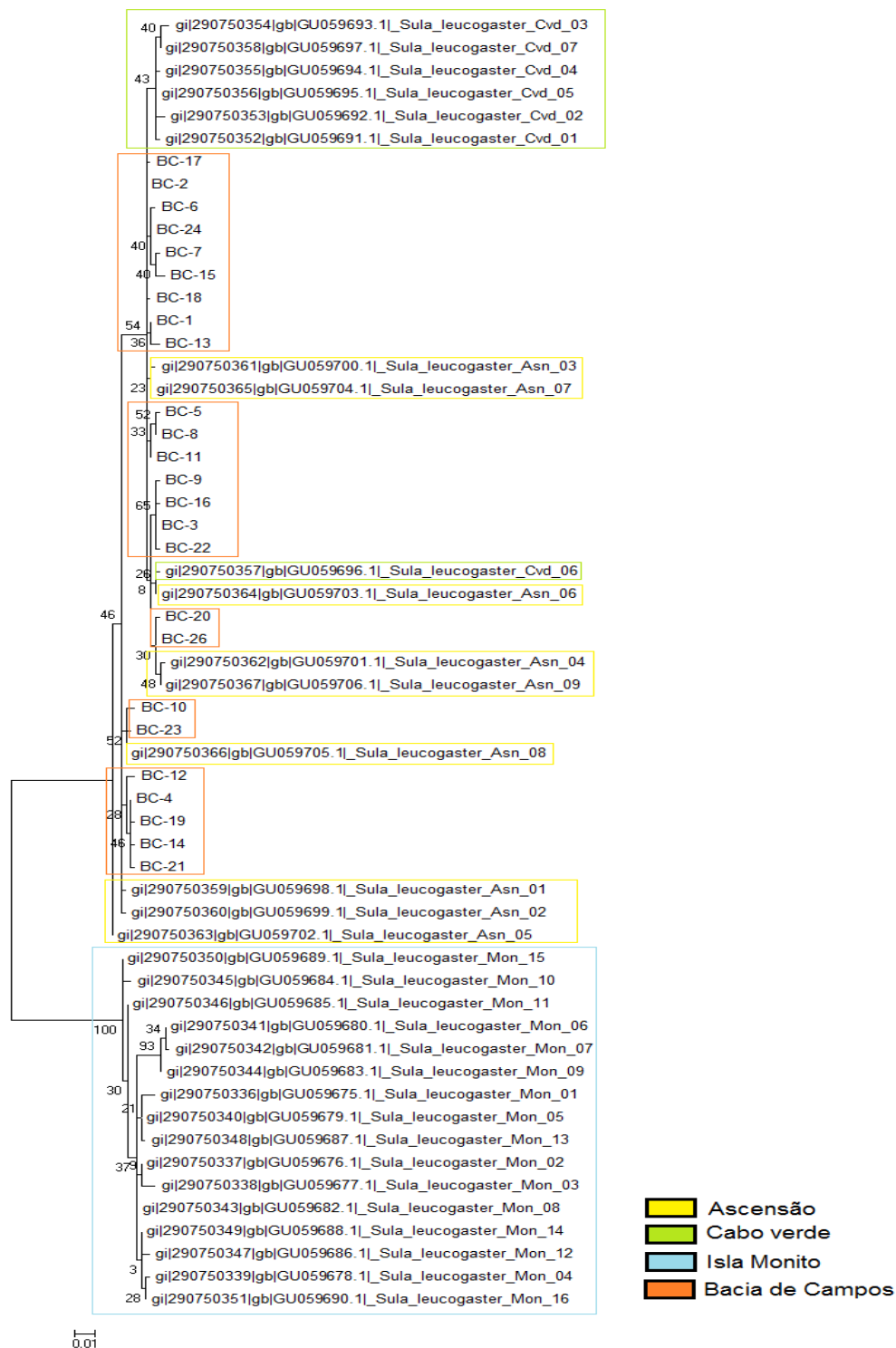
As relações filogenéticas entre os haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de carcaças de *Sula leucogaster* do Oceano Atlântico e Mar do Caribe encontradas ao longo das praias da Bacia de Campos e outras seqüências disponíveis no *GenBank*, foram determinadas por uma árvore de Máxima Verossimilhança seguindo o modelo de HKY85 (HASEGAWA *et al*, 1985) com taxa de distribuição gama e invariância, e podem ser observadas na Figura 15. É possível notar que Bacia de Campos se encontra no grupo do Atlântico, onde haplótipos de Cabo Verde (Cvd) se agrupam no clado com exceção de um haplótipo (Cvd\_06), enquanto Bacia de Campos e Ascensão não formam grupos distintos. A árvore filogenética também mostra Mar do Caribe (Isla Monito) e Atlântico (BC, Cvd, Asn) constituindo grupos monofilético com o suporte de 100 de *bootstrap*.

Uma árvore de *Neighbor-Joining*, seguindo o modelo de Tamura e Nei (1993) também foi testada, entretanto, houve congruência entre as topologias geradas.

Também foi determinada a rede parcimoniosa entre os haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster* do Oceano Atlântico. É possível notar na rede haplotípica que nas populações da Bacia de Campos e Ascensão há uma separação em dois grupos com três vias mutacionais hipotéticas e Cabo Verde forma um grupo isolado do restante das localidades com exceção do haplótipo Cvd\_06.



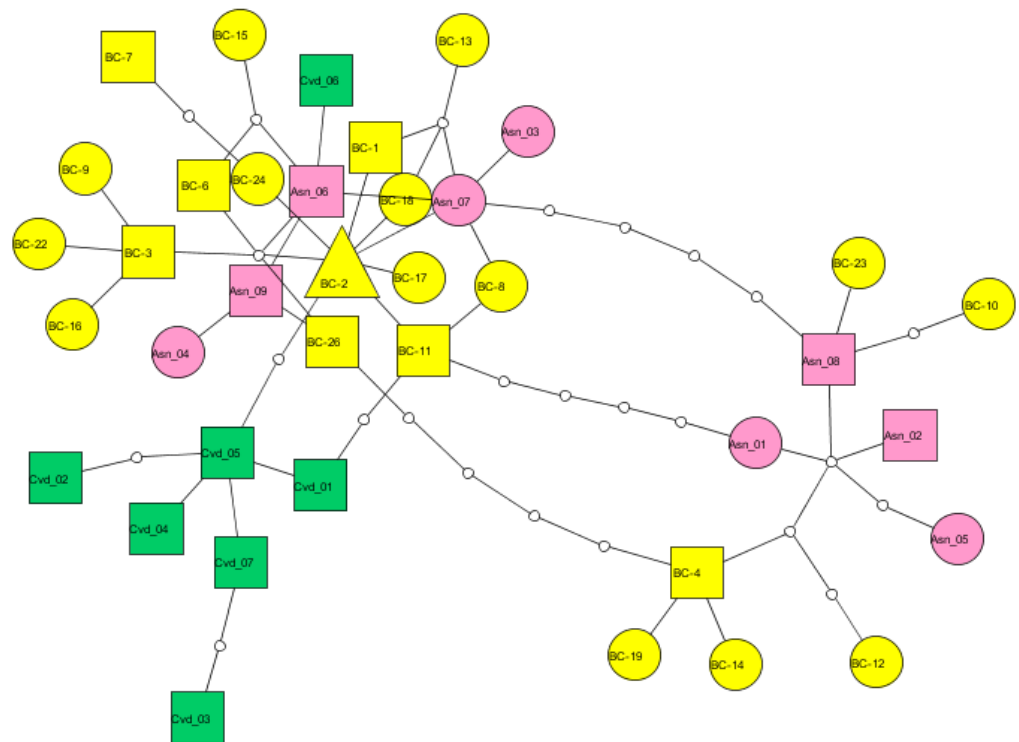
Figura 16 – Árvore de Máxima Verossimilhança produzida a partir do alinhamento de seqüências de 489 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial de colônias de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) da Baía de Campos e seqüências do *GenBank*.



Nota: Onde: Os valores de *bootstrap* estão indicados nos ramos da árvore.

Figura 17 – Rede parcimoniosa de haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster* encontrados para as regiões

da Baía de Campos (BC), Cabo Verde (Cvd) e Ascensão (Asn)



Legenda: A cor amarela representam haplótipos da BC, o verde representam os haplótipos de CVD e o rosa, Asn, Os círculos brancos representam haplótipos intermediários hipotéticos. A forma triangular refere-se ao haplótipo com mais de oito representantes, a forma quadrada aos haplótipos que possuem de oito à dois representantes e os círculos aos haplótipos com apenas um representante.

As análises de demografia histórica da população da Baía de Campos foram geradas por meio do *Mismatch Distribution* (Figura 17). Os valores do teste de *goodness-of-fit* para esta populações podem ser observados na Tabela 14. Também foram realizados os testes de neutralidade de Tajima (estimando-se o valor de  $D$ ) e de Fu (estimando-se o valor de  $F_s$ ), cujos resultados podem ser observados na Tabela 14, para complementar os dados de *Mismatch Distribution* e detectar expansão populacional.

Figura 18 - *Mismatch Distribution* de seqüências de região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) para localidade da Baía de Campos no litoral brasileiro, seguindo o modelo de expansão súbita.

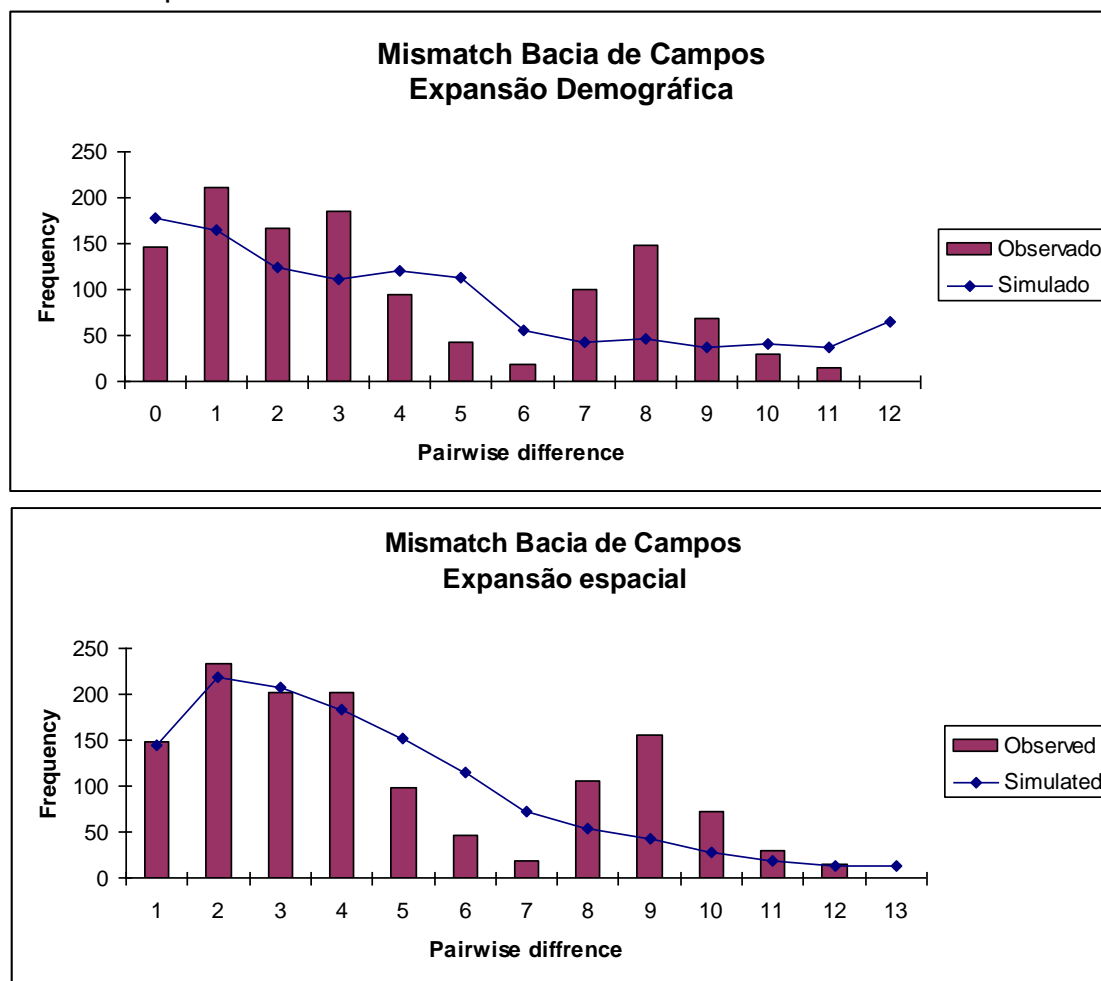


Tabela 13 – Valores do teste de *goodness-of-fit* de *Mismatch Distribution* e valores de  $D$  e  $F_s$ , referentes aos testes de neutralidade de Tajima e  $F_u$ , considerando modelos de expansão demográfica, para a localidade da Baía de Campos de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783).

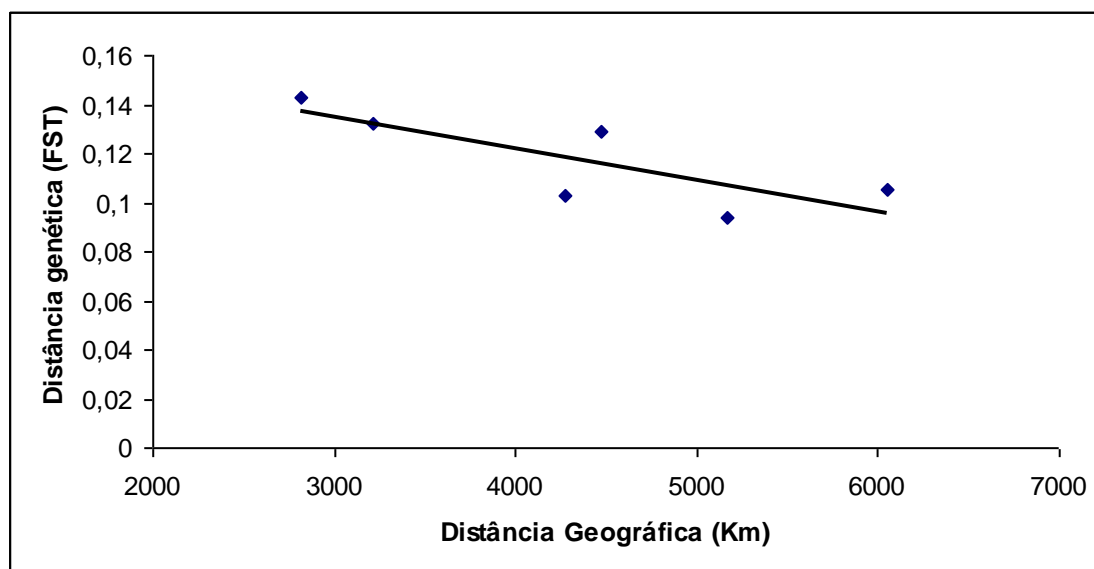
| Pop | Expansão demográfica |                  |            |                  | $D$<br>(Tajima) | $P$ -value<br>( $D$ ) | $F_s$ ( $F_u$ ) | $P$ -value<br>( $F_u$ ) |
|-----|----------------------|------------------|------------|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|
|     | $SSD$                | $P$<br>( $SSD$ ) | $HRI$      | $P$<br>( $HRI$ ) |                 |                       |                 |                         |
| BC  | 0,01657744           | 0,65000          | 0,02363215 | 0,80000          | 0,99770         | 0,16300               | 9,79996         | 0,00300                 |

Legenda: Onde:  $SSD$  = Sum of Squared Deviation,  $HRI$  = Harpending's Raggedness Index.

A distribuição multimodal de *Mismatch Distribution* (Figura 17), assim como os altos valores de *SSD* do teste de *goodness-of-fit* e o valor negativo e não significativo de *D* (Tajima) do teste de neutralidade (Tabela 14) sugerem que a população da Bacia de Campos está em equilíbrio demográfico. Entretanto o valor negativo e significativo de *F<sub>s</sub>* (*F<sub>u</sub>*) sugere uma recente expansão demográfica para a Bacia de Campos.

Para avaliar a existência de uma correlação entre as distâncias genéticas (*F<sub>ST</sub>* par a par) e geográficas (em Km) foi realizado o teste de Mantel. Os dados genéticos e geográficos do Atlântico foram compilados no gráfico juntamente com dados do Mar do Caribe (Figura 18). Sendo Ascensão a localidade mais próximas do local onde as amostras trabalhadas neste trabalho foram coletadas. Os dados da Isla Monito foram utilizados devido a uma possível migração levando em conta a proximidade geográfica com as outras regiões (Figura 11). O valor não significativo de *P* indica a inexistência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas.

Figura 19 – Regressão linear entre distância genética (*F<sub>ST</sub>*) e geográfica (em Km) considerando as quatro colônias de *Sula leucogaster* (Boddaert, 1783) no Atlântico e Mar do Caribe.



Nota: A linha de tendência reflete a extrapolação do comportamento dos pontos ( $r = 0,623462$ ;  $P_{Mantel} = 0,950000$ ).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Composição genética das populações de *Sula leucogaster*

As análises dos 489 pb da região controle do DNAmít de atobás oriundos da Bacia de Campos revelou a ocorrência de novos haplótipos, onde a maioria são raros e somente um possui frequência expressiva, o que já era esperado, pois o mesmo foi observado em populações de outras localidades (Tabela 6, MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010). Entretanto, o resultado de diversidade nucleotídica mostra uma baixa variabilidade genética na população da Bacia de Campos, sendo o mesmo encontrado para amostras de outras localidades (Tabela 6 e 8). A situação não muda quando comparamos a diversidade entre machos e fêmeas (Tabela 7). No trabalho de Baumgarten (2003) também foi encontrada baixa diversidade nucleotídica em atobás oriundos de colônias reprodutivas das Ilhas Moleques do Sul (SC), do Atol das Rocas (RN) e do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Em estudos com espécies que vivem simpatricamente com *Sula leucogaster* observou-se uma variabilidade genética maior (BAUMGARTEN, 2003; MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010).

A alta diversidade haplotípica na população da Bacia de Campos pode ser explicada pelos haplótipos raros se diferenciarem por poucos nucleotídeos, o que conseqüentemente explica a baixa diversidade nucleotídica. Isto demonstra que em decorrência da divisão de uma população em subpopulações isoladas, existe a perda da variabilidade genética. A formação de pequenos demes, com um tamanho reduzido da população, faz com que as frequências dos alelos sejam diferentes quando comparadas às da população maior. Além disso, em cada subpopulação devem ser aumentadas, ou mesmo fixadas, as frequências de determinados alelos pela ação da deriva genética (HARTL e CLARK, 1997).

A população da Bacia de Campos possui valores de diversidade mais próximos dos índices da ilha de Ascensão, quando consideramos somente populações do Atlântico. Portanto, dentre as três localidades do Atlântico, Cabo Verde é a que apresenta menor variabilidade genética (também quando comparadas a outras colônias - Tabela 6 e 8). Em outras bacias oceânicas a colônia que possui maior variabilidade haplotípica é a do Oceano Índico, contendo quase todos os

haplótipos raros (com exceção de quatro haplótipos que se repetem), e também a maior variabilidade nucleotídica, conseqüentemente tem o maior número de sítios variáveis. A colônia menos variável é a do Pacífico Oriental, apresentando os menores valores nos índices de diversidade, com poucos haplótipos raros e baixa diversidade nucleotídica.

No estudo de Baumgarten (2003) foi observado o mesmo padrão de baixa variabilidade para *Sula leucogaster*, entretanto as populações são mais próximas geograficamente do que as analisadas no presente estudo. Tal fato foi atribuído a um efeito gargalo onde a recuperação e os danos vão estar estreitamente ligados aos hábitos da espécie. Além disso, muitos trabalhos documentam uma recente divergência nas populações de *Sula leucogaster* (e.g: STEEVES *et al.*, 2003; MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010. MORRIS-POCOCK *et al.*, 2011).

O comportamento filopátrico da espécie em questão pode influenciar a variabilidade genética de suas populações, já que há pouca migração de indivíduos entre as colônias reprodutivas (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010). Este comportamento é compartilhado entre outras aves marinhas e táxons marinhos (por exemplo, albatrozes, MILOT *et al.*, 2008; tartarugas marinhas, BOWEN e KARL, 2007), e divergência através de isolamento na ausência de fluxo gênico pode ser um evento comum em animais pelágicos na região tropical.

Com os resultados obtidos neste estudo podemos sugerir que a populações de atobá marrom da Bacia de Campos possuem baixa variabilidade genética devido a um efeito gargalo ou a uma seleção balanceadora, entretanto para tal afirmação seria necessário realizar o mesmo estudo com outras populações de *Sula leucogaster*.

## 5.2 Estrutura genética das populações de *Sula leucogaster*

Os valores significativos ( $p < 0,05$ ) dos testes de diferenciação estimados a partir do índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre pares de populações de *Sula leucogaster* da Bacia de Campos (Tabela 09) sugerem uma estruturação na colônia reprodutiva desta localidade. Desta forma, a população do Rio de Janeiro parece constituir um estoque genético diferente do de estoques encontrados em outras colônias.

O mesmo ocorre com o valor  $p$  do teste exato (Tabela 10) conduzindo à rejeição da hipótese nula (de não diferenciação) da colônia da Bacia de Campos. O valor de  $\Phi_{ST}$  revela haver estruturação genética entre as populações de *Sula leucogaster* de colônias reprodutivas, sendo as diferenças intra-populacionais responsáveis pela maior porcentagem de variação. No entanto, os valores de  $\Phi_{CT}$  da AMOVA não significativos (Tabela 11 e 12) não permitem indicar a forma mais adequada de estruturação entre as populações brasileiras de *Sula leucogaster*.

O elevado número efetivo de fêmeas migrantes ( $N_m$ ; Tabela 13) calculado a partir dos valores de  $F_{ST}$  entre as colônias reprodutivas de nove localidades, por sua vez, indica a não estruturação entre estas, corroborando os dados de  $\Phi_{CT}$  da AMOVA. Segundo Wright (1951), quando um ou mais indivíduos migram por geração, os efeitos da migração já seriam suficientes para contrapor os efeitos da deriva e, portanto, para impedir a divergência entre populações. No entanto, é importante mencionar que a estimativa do  $N_m$  a partir do  $F_{ST}$  apresenta limitações, uma vez que se apóia em premissas não realistas.

Na ambigüidade de alguns resultados apresentados consiste também uma fragilidade. A AMOVA considera apenas a frequência dos haplótipos de cada população e o número de diferenças de nucleotídeos entre cada par de haplótipos da análise. Como já mencionado, a maioria dos haplótipos da população da Bacia de Campos e das populações usados para comparação nesse estudo, são raros e com poucos sítios variáveis, o que explicaria a impossibilidade de avaliar a estruturação pela AMOVA em função dos valores de  $\Phi_{CT}$  não significativos.

Considerando outros estudos onde foi observada forte estruturação nas populações de atobá-marrom (por exemplo, BAUMGARTEN, 2003; STEEVES *et al.*, 2003; MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010, 2011) os resultados significativos de  $F_{ST}$  ( $p < 0,05$ ) e teste exato para estruturação, entendemos que a colônia reprodutiva de *Sula leucogaster* da Bacia de Campos constitui um estoque genético populacional. Populações com estruturação podem ser vistas em diversas espécies da família Sulidae, tais como: *Sula sula* (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010, 2011), *Sula dactylatra* (BAUMGARTEN, 2003; STEEVES *et al.*, 2005b) e *Sula granti* (LEVIN e PARKER, 2012). Mas, vale ressaltar, que quando comparada com as espécies citadas, *Sula leucogaster* é a espécie que apresenta a maior estruturação mesmo entre

populações geograficamente próximas e sem nenhuma barreira evidente; o que não é evidenciado para as demais espécies.

A estruturação genética de aves marinhas tem sido atribuída ao comportamento filopátrico (BAUMGARTEN, 2003; STEEVES *et al.*, 2005b, b; MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010, 2011), entretanto, o que mais intriga nos estudos relacionados a *S. leucogaster* é a alta estruturação em populações, por vezes, muito próximas. No estudo de Morris-Pocock e colaboradores (2010) foram encontradas evidências de divergência genética mesmo em pequenas escalas espaciais. Colônias dentro do Golfo do Califórnia (San Pedro Mártir e Farallón de San Ignacio) e as colônias fora do Golfo da Califórnia (Isla San Benedicto, Piedra Blanca, e Isla Gorgona) divergiram, pelo menos, há 130.000 anos e não parecem trocar quaisquer genes, mas são separadas por uma distância de apenas 500 km. Para colônias do Brasil esse padrão de estruturação permanece. De acordo com Baumgarten (2003), análises genéticas (DNA *fingerprinting* e DNAmIt) e morfológicas de *S. leucogaster* demonstram que a população São Pedro e São Paulo é distinta das populações de Fernando de Noronha / Atol das Rocas e Abrolhos.

Recursos marinhos são cada vez mais considerados como barreiras importantes para o fluxo de genes em aves marinhas e é o que pode estar levando a estruturação das colônias dentro e fora do Golfo da Califórnia. Águas do Golfo da Califórnia diferem na salinidade e na temperatura média da superfície do mar das águas de fora do Golfo (SANDOVAL-CASTILLO *et al.*, 2004). De fato, essas diferenças oceanográficas e correntes no Golfo do sul da Califórnia também podem restringir o fluxo gênico neste taxon e em outras espécies marinhas (por exemplo, STEPIEN *et al.*, 2001).

As variações geográficas também podem atuar na pressão de seleção (natural ou sexual) restringindo o fluxo de genes se imigrantes ou seus descendentes são relativamente pouco adaptados em novos ambientes. Muitos caracteres morfológicos que diferem entre populações regionais de atobá marrom são conhecidos por serem importantes sinais sexuais em aves marinhas (PIEROTTI, 1990). Há evidências de tal fato na divergência das colônias de atobás marrons de São Pedro e São Paulo e colônias de Fernando de Noronha / Atol das Rocas e Abrolhos, onde a seleção pode estar atuando principalmente no tamanho dos indivíduos (BAUMGARTEN, 2003).



Outro fator de grande importância que pode influenciar o tipo de estruturação genética dessas populações de *Sula leucogaster* é a preferência por habitat. A espécie foco deste estudo tem preferência por habitat costeiros / litorâneos tal fato pode agir como uma barreira ecológica para o fluxo de genes entre colônias geograficamente próximas. Com a especialização do habitat, a migração de indivíduos para outras áreas reprodutivas se torna difícil (MATTHIOPOULOS *et al.*, 2005).

Estudos indicam que o mar aberto e a filopatria colonial elevada, não são barreiras para a dispersão eficaz, e, portanto, deriva genética não é uma questão crítica mesmo em grandes escalas espaciais (MILOT *et al.*, 2008; BARLOW *et al.*, 2011). No estudo de Milot e colaboradores (2008) foram encontradas evidências de taxas de dispersão muito baixas entre populações de *Diomedea exulans* (albatroz real), e também que a população quase não tinha estruturação genética. Isto indica que mesmo uma taxa de dispersão muito baixa, por exemplo, um indivíduo por estação reprodutiva pode ser suficiente para manter o fluxo genético entre diferentes colônias. Por outro lado, um estudo com *Pterodroma cookii* revelou que uma diferença fenológica causada pela especialização de habitat diferente durante a temporada não reprodutiva pode restringir o fluxo de genes e levar a diferenciação genética dentro de uma mesma população (RAYNER *et al.*, 2011).

Padrões parecidos de estruturação com *Sula leucogaster* são encontrados para *Sula dactylatra*, onde não só barreiras físicas influenciam a divergência das colônias. Dadas as ausências de barreiras físicas dentro de bacias oceânicas, barreiras não físicas podem estar atuando no fluxo gênico (STEEVES *et al.*, 2005a). Alguns estudos indicam que esta espécie tem comportamento filopátrico e o padrão de morfometria, embora limitado a um pequeno número de aves, indica uma variação morfológica geográfica (NELSON, 1978; O'BRIEN e DAVIES, 1990; ANDERSON 1993; PITMAN e JEHL 1998). No entanto, barreiras não físicas para esta espécie não são muito claras, visto o pouco conhecimento da ecologia da mesma (STEEVES *et al.*, 2005 a).

Para outra espécie de *Sula* a estruturação parece estar ligada à barreiras físicas. No estudo de Morris-Pocock e colaboradores (2010), a principal influência para as divergências entre colônias de *Sula sula* seriam as barreiras físicas. O Istmo do Panamá atua como uma barreira de fluxo gênico entre os Oceanos Pacífico e Atlântico, e Sunda/Prateleiras de Sahul formam barreiras entre os Oceanos Índico e

Pacífico. Para esta espécie foi evidenciado fluxo gênico dentro das bacias oceânicas, tal fato foi atribuído ao hábito pelágico dessas espécies, sendo possível a dispersão em grandes distâncias.

Em contrastes com os padrões de estruturação apresentados, existem espécies de *Sula* que encontram-se em panmixia. Espécies como: *Sula variegata* e *Sula nebouxii* não apresentam diferenciação entre populações geograficamente distantes, tal fato foi atribuído ao ambiente de forrageamento, já que essas aves ocupam uma região fria do hemisfério norte. A especialização de áreas de forrageamento, instabilidade ambiental e ectoparasitismo (impulsionando a migração), a grande disponibilidade de locais adequados para reprodução e a alta capacidade de dispersão teriam forte influência na homogeneização nas populações de ambas as espécies (TAYLOR *et al.*, 2011a e b). Ou seja, a alta fragmentação em subpopulações, ambientes estáveis e a distribuição pantropical nos leva a sugerir que exista pouca necessidade de dispersão no ambientes que *Sula leucogaster* ocupa, sendo assim o pequeno tamanho populacional efetivo em uma colônia pode levar à uma potencial deriva e ao desenvolvimento de populações de alta diferenciação.

A dispersão está ligada às trajetórias demográficas e evolutivas de uma população (BOHONAK, 1999; ROSS, 2001). Ela evolui sob o efeito de múltiplas forças que interagindo são modificadas por um efeito de retorno de taxas de dispersão (por exemplo, GANDON e MICHALAKIS, 2001). Entre estas forças, pode haver endogamia, heterogeneidade, evasão espacial e temporal dos recursos, a competição entre parentes e entre espécies que ocupam o mesmo nicho, seleção de parceiros e recursos, e custos do *fitness* não ocorridos pela dispersão em si (CLOBERT *et al.*, 2001). Em aves marinhas pelágicas, a aparente contradição na relutância para a dispersão tem levantado inúmeras questões importantes que envolvem a reprodução filopátrica e dispersão, os benefícios da filopatria e colonialidade, as barreiras potenciais (físicas e não-físicas) a dispersão, e as colônias de persistência que são fundamentais para a nossa compreensão da evolução em aves marinhas.

### 5.3 Relações filogenéticas e filogeográficas entre os haplótipos

Visto o hábito costeiro dessa espécie, os haplótipos da Bacia de Campos poderiam ser agrupados aos haplótipos do Mar do Caribe, ou seja, seriam mais prováveis relações entre estas duas localidades, do que com localidades onde os indivíduos teriam que atravessar o mar aberto, no entanto, não é isso que ocorre. Na árvore de Máxima Verossimilhança de haplótipos seguindo o modelo de HKY85 (HASEGAWA *et al.*, 1985), apesar de ter sido encontrada uma diferenciação significativa entre Bacia de Campos, Cabo Verde e Ascensão, os haplótipos de tais colônias não são mutuamente monofiléticos (Figura 15).

A árvore indica uma forte relação entre os haplótipos da Bacia de Campos (BC) e de Ascensão (Asn). Os haplótipos de Cabo Verde aparecem em um ramo isolado com exceção do haplótipo Cvd\_06 que se agrupa com os haplótipos de BC e Asn; e indica que tais haplótipos são os mais derivados. Com relação aos haplótipos do Mar do Caribe, a árvore mostra que estes estão separados em um ramo distinto. Tal fato também foi evidenciado no trabalho de Morris-Pocock e colaboradores (2010). Isto pode indicar que as condições oceanográficas do Mar do Caribe são muito diferentes das encontradas em todo o Oceano Atlântico, visto que para esta espécie foi viável a dispersão atravessando o mar aberto. No Golfo da Califórnia encontramos a mesma situação, onde as condições oceanográficas do Golfo da Califórnia são diferentes a ponto de impedir o fluxo gênico com o Pacífico mesmo em pequenas distâncias (SANDOVAL-CASTILLO *et al.*, 2004).

A pouca (ou quase nenhuma) diferenciação em ramos distintos de haplótipos da Bacia de Campos e de Ascensão sugerem que uma população ancestral com alta diversidade originou essas duas populações. A presença de um haplótipo de Cabo Verde agrupando com o ramo da Bacia de Campos/Ascensão pode indicar um contato secundário relativamente recente ou raro das duas linhagens. Situação parecida ocorreu para um haplótipo do Pacífico (Atol de Palmira), onde este foi agrupado com haplótipos do Índico (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2010 a). Provavelmente este contato secundário foi mediado por indivíduos juvenis, pois de acordo com Nelson (1980), atobás jovens viajam consideráveis distâncias chegando a ser recapturados a 6.000 km do seu local de nascimento no primeiro ano de vida. De fato, não conseguimos precisar o tempo de divergência entre as localidades do Atlântico, porém o tempo de divergência entre Mar do Caribe e Atlântico (dados a

partir de análise de microssatélites) é o mais recente (190.000 anos atrás) comparando com outras localidades (MORRIS-POCOCK *et al.*, 2011).

É possível visualizar a mesma estruturação da árvore filogenética na rede haplotípica, porém é interessante observar que além dos haplótipos da Bacia de Campos e Ascensão não formarem grupos distintos para cada localidade, tais haplótipos formam dois grupos separados por três vias mutacionais hipotéticas, evidenciando que estas populações podem ter sofrido dois eventos de expansão distintos podendo ter partido do haplótipo BC\_04 ou Asn\_08, já que o haplótipo Asn\_01 é raro e seria pouco provável a divergência a partir dele.

A partir da correlação entre os resultados do teste de *goodness-of-fit* de *Mismatch Distribution* (Figura 17) das populações do Atlântico e Mar do Caribe de *Sula leucogaster* e dos testes de neutralidade de Tajima e Fu (Tabela 14), observa-se que os valores baixos de *SSD* (*Mismatch Distribution*) e o gráfico multimodal conduz à rejeição da hipótese de expansão demográfica súbita atribuída às populações, corroborado pelos valores negativos e não significativos de *D* (teste de neutralidade). Os resultados tornam-se ambíguos se considerados os demais valores de Fu, sendo este negativo e significativo para expansão. No entanto tal resultado pode estar relacionado com a grande quantidade de haplótipos raros, já que este teste é sensível a essa situação (FU, 1997). O teste de Mantel (Figura 18) indica a inexistência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas entre as colônias de *Sula leucogaster* do Atlântico e do Mar do Caribe. Tais dados corroboram com a hipótese de que estas populações estão em equilíbrio por um tempo considerável.

Embora a hipótese de expansão súbita seja rejeitada, os gráficos da *Mismatch Distribution* possuem dois picos (Figura 17) o que corrobora a possibilidade da população da Bacia de Campos ter sofrido dois eventos de expansão, também evidenciados na rede haplotípica. Quando os haplótipos Asn e BC do grupo menor (Figura 16) são retirados da análise, os gráficos de *Mismatch Distribution* mostram-se unimodais, porém não são corroborados por valores significativos de *SSD* e *D* de Tajima.

No entanto, as deficiências gerais de análises baseadas no DNAmít são bem conhecidas (EDWARDS *et al.*, 2005) e o uso de DNAmít sozinho limita o alcance de nossas conclusões. Além do levantamento apenas do fluxo gênico mediado por fêmeas, a alta taxa de mutação da região controle do DNAmít nos impede de estimar

as relações evolutivas entre a população da Bacia de Campos e as principais populações globais. A ocorrência de heteroplasmia nessa espécie também é um fator que dificulta a resolução das análises devido a uma perda amostral, pois não é possível determinar haplótipos que detém ambigüidade de nucleotídeo.

Uma análise, mais detalhada sobre dados das distribuições de forrageamento e movimentos para a reprodução de aves marinhas (como de telemetria por satélite; por exemplo, WEIMERSKIRCH *et al.*, 2005, 2008) e / ou estudos de filogeografia comparativa de outras espécies de aves marinhas serão necessários para testar a hipótese de preferência de habitat em uma forma mais explícita. Sugerimos ainda que a complementação deste trabalho deva incluir vários marcadores nucleares desvinculados (como introns / polimorfismos de nucleotídeo único, BACKSTROM *et al.*, 2008) para estimar a divergência com mais precisão dentro de cada espécie e avaliar tanto o fluxo gênico masculino quanto o feminino.

Também seria muito interessante analisar outras colônias reprodutivas ao longo da costa brasileira para determinar claramente a estruturação dessa espécie e comparar com outras bacias oceânicas. Além disso, a coleta de dados morfométricos seria muito importante para confrontá-los com dados genéticos.

#### **5.4 Implicações para conservação**

Considerando que a população da Bacia de Campos de *Sula leucogaster* possui composição genética distinta das demais, os estoques brasileiros devem ser cuidadosamente enfocados em planos de conservação da espécie em âmbito mundial. Cada colônia reprodutiva compreende uma unidade demográfica independente, já que a espécie apresenta comportamento filopátrico e, por conseqüência, isso explica a importância da proteção de todos os habitats que esta espécie ocupa.

A baixa variabilidade em tal estoque é de grande preocupação e reforçaria ainda mais a importância de estabelecer áreas de manejo na região da Bacia de Campos, visto os perigos de grandes impactos ambientais devido a exploração de petróleo, além da interação dessas aves com a pesca e contaminantes em geral.

## 6. CONCLUSÕES

- De acordo com os índices de diversidade, a população da Bacia de Campos apresenta alta diversidade haplotípica. Aliado a baixa variabilidade genética tal fato é típico de populações que são subdivididas. Estas podem estar sofrendo efeito gargalo ou seleção purificadora, corroborado com os índices de diversidade e o valor significativo e negativo do teste  $F_u$ , sendo este o mais sensível para tal relação evolutiva. Esta baixa variabilidade genética também pode ser vista em populações de outras Bacias Oceânicas.
- A proporção de carcaças de machos e fêmeas é igual para ambos os sexos, o que é esperado na natureza. Ambos os gêneros apresentam variabilidade genética relativamente semelhantes.
- De acordo com os dados de estruturação, a população da Bacia de Campos pode ser considerada um estoque genético de *Sula leucogaster*. E quando comparada com outras bacias oceânicas fica evidente uma estruturação entre estas populações.
- Os dados filogenéticos indicam um contato secundário recente entre as colônias da Bacia de Campos e de Ascensão, onde estes não formam um grupo monofilético.
- O comportamento filopátrico e a preferência do hábito costeiro provavelmente influenciam no tipo de estruturação e relações evolutivas que esta espécie apresenta.
- As variações oceanográficas também têm grande importância na estruturação genética dessa espécie. Visto que, não havendo barreiras geográficas evidentes entre Oceano Atlântico e Mar do Caribe aliado ao hábito costeiro do atobá marrom, seria possível uma relação entre as localidades da Bacia de Campos e da Isla Monito. No entanto os dados filogenéticos mostram a população do Mar do Caribe formando um grupo monofilético muito bem suportado estatisticamente.
- O DNA mitocondrial não se mostrou a melhor opção para evidenciar com clareza o tipo de estruturação e a relação evolutiva das colônias de *Sula leucogaster*, devido a região controle do DNAmít ser muito variável. Além disso, a presença da heteroplasmia nessa espécie torna difícil a identificação dos haplótipos. Sendo assim, a melhor opção para investigar as relações evolutivas de *Sula leucogaster* seria a utilização de marcadores nucleares.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT C.L., DOUBLE M.C., TRUEMAN J.W., ROBINSON A., COCKBURN A., 2005. An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses*. *Molecular Ecology*. 14: 3605–3613.
- ALMEIDA M. G.; REZENDE C. E.; SOUZA, C. M. M.; 2007. *Geochimica Brasiliensis*, 21: 111.
- AKAIKE H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- ALVES V.S., SOARES A.B.A., COUTO G.S., EFE M.A. e RIBEIRO A.B.B., 1997. Aves do Arquipélago de Abrolhos, Bahia, Brasil. *Ararajuba* (5) 2: 209-218.
- ALVES V.S., SOARES A.B.A., COUTO G.S., EFE M.A., RIBEIRO A.B.B., 2004. Aves marinhas de Abrolhos – Bahia, Brasil. In: Branco, J.O. (Ed.), *Aves Marinhas e Insulares Brasileiras: Biologia e Conservação*. Editora da Univali, Itajaí.
- ANDERSON, D.J., 1993. Masked Booby (*Sula dactylatra*). *The Birds of North America*, Nº 73. Philadelphia, The Birds of North America. 16 p.
- AVISE J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York, Chapman & Hall. xiv+511p.
- AVISE J.C., 2000. Phylogeography. The history and formation of species. *Trends in Ecology and Evolution* 15(9): 384-385.
- AVISE J.C., ARNOLD J., BALL R.M., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J.E., REEB C.A., SAUNDERS N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- AZEVEDO F. A. *Toxicologia do Mercúrio*, 1ª ed., Rima: São Carlos, 2003.
- BACKSTROM N., FAGERBERG S., ELLEGREN H., 2008. Genomics of natural bird populations: a gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Molecular Ecology* 17: 964–980.
- BARLOW E.J., DAUNT F., WANLESS S., ALVAREZ D., REID J.M., CAVERS S., 2011. Weak large-scale population genetic structure in a philopatric seabird, the European shag *Phalacrocorax aristotelis*. *Ibis* 153: 768–778.
- BASSAM B.J., CAETANO-ANOLLES, G. e GRESSHOFF, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* 196(1): 80-83.

BAUMGARTEN M.M., 1998. Sistema de cruzamento e variabilidade genética em *Sula leucogaster* e *Sula dactylatra* (Aves: Pelecaniformes) através de “DNA Fingerprinting”. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BAUMGARTEN M.M., 2003. Estudo Genético-Populacional em atobás (Pelecaniformes, Aves) da Costa Brasileira. Tese de Doutorado. USP, São Paulo, SP, Brasil.

BEGE L.A.R. e PAULI B.T., 1989. As aves das ilhas Moleques do Sul – Santa Catarina – Aspectos da ecologia, etologia e anilhamento das aves marinhas. FATMA.

BENCKE G.A., 2001. Lista de Referência das Aves do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 102 pp.

BIRKY C. W., FUERST P. e MARUYAMA T., 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* 121: 613-627.

BOERSMA P. D.; CLARCK J. A. e HILLGARTH N., 2002. Biology of marine birds. Boca Raton. Seabird conservation. p. 559-580.

BOHONAK J.A., 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology* 74: 21–45.

BOWEN B.W. e KARL S.A., 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*, 16: 4886–4907.

BRANCO J. O. e VERANI J. R., 1997. Dinâmica da alimentação natural de *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) na Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 14(4): 1003-1018.

BRANCO J. O., 1999. Biologia do *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae), análise da fauna acompanhante e das aves marinhas relacionada a sua pesca, na região de Penha, SC, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos, SP, 147p.

BRANCO J. O., 2001. Descartes da pesca do camarão sete-barbas como fonte de alimento para aves marinhas. *Revista Brasileira de Zoologia* 18(1): 293-300.

BRANCO J. O., 2004. Aves marinhas das Ilhas de Santa Catarina, Em: J. O. Branco (org.) *Aves marinhas e insulares brasileiras: biologia e conservação*. Itajai: Editora UNIVALI. p. 15-36.



BRAUN J. R. R. e BRANCO J. O., 2002. Dieta do atobá-marrom *Sula leucogaster* (SULIDAE, AVE) nas Ilhas Moleques do Sul, Florianópolis, SC. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 22., Itajaí/UNIVALI: 474-475. BURGER J. e GOCHFELD M. 1994. Predation and effects of humans on island-nesting seabirds. D. N. Nettleship, J. p. 39-67.

BURGER J. e GOCHFELD M., 2004. Seabirds on islands: threats, case studies and action plans. Cambridge, UK: International Council for Bird Preservation.

CAETANO-FILHO E., 2003. O papel da pesquisa nacional na exploração e exploração petrolífera da margem continental na Bacia de Campos. In: Piquet, R. (Org). Petróleo, royalties e região. Rio de Janeiro: Garamond. p39-94.

CASTELLOE J. e TEMPLETON A.R., 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3, p.102–113.

CLOBERT J., DANCHIN E., DHONDT A.A., NICHOLS J.D., 2001. Dispersal. Oxford University Press, Oxford.

COELHO A. G. M., 1981. Observações sobre a avifauna do Arquipélago dos Abrolhos, Bahia. Univ. Fed. Pernambuco, Publ. Avuls. 1: 1-7.

COELHO E.P., Alves V.S., SOARES A.B.A., COUTO G.S., EFE M.A., RIBEIRO A.B.B., VIELLIARDJ. e GONZAGA L.P., 2004. O atobá-marrom (*Sula leucogaster*) na Ilha de Cabo Frio, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. *Aves Marinhas e Insulares Brasileiras: Biologia e Conservação*. Branco, J.O. (Ed.) Editora da Univali, Itajaí.

COULSON J.C., 2002. Colonial breeding in seabirds. In: Schreiber EA and Burger J (eds) *Biology of marine birds*, London, pp 87–114.

CRANDALL K.A. E TEMPLETON A.R., 1993 Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134, p 959–969.

CRAWFORD R. J. e DYER B. M., 1995. Responses by four seabirds species to a fluctuating availability of Cape Anchovy, *Engraulis capensis* off South Africa. *Ibis*, 137: 329 – 339.

CROXALL J. P. e PRINCE P. A., 1996. Cephalopods as prey: seabirds. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, vol 351, 1023-1043.

CUNHA L.S.T., TORRES J.P.M, MUÑOZ-ARNANZ J. e JIMÉNEZ B., 2012. Evaluation of the possible adverse effects of legacy persistent organic pollutants (POPs) on the brown booby (*Sula leucogaster*) along the Brazilian coast. *Chemosphere* 87:1039–1044

DAMATO, M.E. e CORACH, D., 1996. Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli* (Cardidea, Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology* 16:650-655.

DORWARD D. F., 1962. Comparative biology of the white booby and the brown booby *Sula spp.* in Ascension. *Ibis*, 10: 79-82.

EDWARDS S.V., KINGMAN S.B., CALKINS J.D., BALAKRISHNAN C.N., JENNING W.B., SWANSON W.J. e SORENSON M.D., 2005. Speciation in birds: genes, geography, and sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 6550–6557.

EFE M. A.; OLIVEIRA A. C.; KANAGAE M. F.; ALVES V. S.; ROSÁRIO L. A. e SCHERER-NETO P., 2006. Análise dos dados de recuperação de *Sula spp* (Pelecaniformes, Sulidae) ocorridas no Brasil entre 1981 e 2000. *Ornithologia*, 1: 125-133.

ELLEGREN H. e SHELDON B.C., 1997. New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends Ecology & Evolution*. 12: 255-259.

EXCOFFIER L., SMOUSE P.E. e QUATTRO, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

EXCOFFIER L.; LAVAL, G. e SCHNEIDER S., 2006. ARLEQUIN version 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. University of Bern, Institute of Zoology, Switzerland. Disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>, fevereiro de 2008.

EXCOFFIER L, LISCHER H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.

DE MOURA JF, ROGES EM, DE SOUZA RL, SICILIANO S, RODRIGUES D.P., 2012. Marine Environment and Public Health. Chapter 11. InTech, <http://dx.doi.org/10.5772/48412>.

FERREIRA A.P., 2010. Trace metals analysis in brown booby (*Sula leucogaster*) collected from Ilha Grande Bay, Rio De Janeiro, Brazil. *Revista Uniandrade* 11: 41-54.

FITZSIMMONS N.N., MORITZ C., LIMPUS C.J., POPE L. e PRINCE R., 1997. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* 147: 1843-1854.

FITZSIMMONS N.N., MORITZ C. e BOWEN B.W., 2000. Identificación de Poblaciones. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A. e Donnelly, M. (eds.). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas. IUCN/SSC Publicación 4: 83-94.

- FRANKHAM R., 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* 66: 95–107.
- FRANKLIN I.R., FRANKHAM R., 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation* 1: 69–70.
- FRIDOLFSSON A.K. e ELLEGREN H., 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- FRIESEN V.L. e ANDERSON D.J., 1997. Phylogeny and evolution of the Sulidae (Aves: Pelecaniformes): A test of alternative modes of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 252–260.
- FRIESEN V.L., 2002. Molecular support for species status of the Nazca booby (*Sula granti*). *The Auk* 119: 820-826.
- FRIESEN V.L., BURG T.M. e MCCOY, K.D., 2007. Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Molecular Ecology* 16: 1765–1785.
- FU Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- FURNESS R.W. e CAMPHUYSEN K., 1997. Seabirds as monitors of the marine environment. *ICES Journal of Marine Science* 54: 726–737.
- FURNESS R.W. e GREENWOOD J.J.D., 1993 *Birds as monitors of environmental change*. Chapman & Hall, London.
- FURNESS R. W., 1982. Competition between fisheries and seabird communities. *Advances in marine biology* 20: 225-307.
- GANDON S., MICHALAKIS Y., 2001. Multiple causes of the evolution of dispersal. In: Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichols JD (eds) *Dispersal*. Oxford University Press, Oxford, pp 155–167.
- GRIFFITHS R., DOUBLE M.C., ORR K. e DAWSON R.J., 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- HAIG S. M., MULLINS T. D., e FORSMAN E. D., 2004. Subspecific relationships and genetic structure in the spotted owl. *Conservation Genetics* 5: 683-705.
- HASEGAWA M., KISHINO H. e YANO T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 32: 443-445.
- HARPENDING, H.C., BATZER, M.A., GURVEN, M., JORDE, L.B., ROGERS, A.L. e SHERRY, S.T., 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1961-1967.

HARRISON P., 1983. Seabirds: an identification guide. Houghton Mifflin Company. Boston.

HARTL D.L. e CLARK A.G. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland. Massachusetts.

HENNICKE J.C., KING B., DRYNAN D., HARDY L.J., STOKES A. e TAYLOR S., 2012. New life-span records of the brown booby *Sula leucogaster*. Marine Ornithology, 40: 125–126.

HOEZEL A.R., HANCOCK J.M. e DOVER G.A., 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. Molecular Biology and Evolution 8: 475-493.

KAHN N.W., St. JOHN J. e QUINN T.W., 1998 Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. The Auk 115: 1074-1078.

KARL S.A. e AVISE J.C., 1993. PCR-based Assays of Mendelian Polymorphisms from Anonymous Single-Copy Nuclear DNA: Techniques and Applications for Population Genetics. Molecular Biology and Evolution 10(2): 342-361.

KARL, S.A., BOWEN, B.W. e AVISE, J.C., 1992. Global population structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. Genetics 131: 163-173.

KENNEDY M., SPENCER H.G., 2004. Phylogenies of the frigatebirds (Fregatidae) and Tropicbirds (Phaethonidae), two divergent groups of the traditional order Pelecaniformes, inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 31: 31-38.

KRUGER, G. C. T.; CARVALHO, C. E. V. e SUZUKI, M. S., 2006. Dissolved nutrient, Chlorophyll a and DOC Dynamic Under Distinct Riverine Discharges and Tidal Cycles Regimes at the Paraíba do Sul River Estuary, RJ, Brazil. Journal of Coastal Research 39: 724 – 730.

KRUL R., 1999. Interação de aves marinhas com a pesca de camarão no litoral paranaense. Curitiba. 156 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LACERDA L. D.; CARVALHO C. E. V.; REZENDE C. E. e PFEIFFER W. C., 1993. Mercury in sediments from the Paraíba do Sul river continental shelf, S.E. Brazil. Marine Pollution Bulletin 26: 220-222.

LE BOHEC C., WHITTINGTON J. D. e LE MAHO Y., 2012. Polar Monitoring: Seabirds as Sentinels of Marine Ecosystems. Em: C. Verde and G. di Prisco (eds.), Adaptation and Evolution in Marine Environments 2: 205-230.

LEE J. S., MIYA M., LEE Y. S., KIM C.G., PARK E.H., AOKI Y. e NISHIDA M., 2010 The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self fertilizing fish

*Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of a control region in fish. *Gene an international journal on genes and genomes*. Elsevier Science: 1-7

LEVIN I.I. e PARKER P.G., 2012. Philopatry drives genetic differentiation in an island archipelago: comparative population genetics of Galapagos Nazca boobies (*Sula granti*) and great frigatebirds (*Fregata minor*). *Ecology and Evolution*: 2775-2787.

LYNCH M. e LANDE R., 1998. The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation* 1:70–72.

MANTEL, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.

MATSUURA Y., 1995. Exploração Pesqueira. Os ecossistemas Brasileiros e os Principais Macrovetores de Desenvolvimento. Subsídios ao planejamento da gestão ambiental – Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Secretaria de Coordenação dos Assuntos do Meio Ambiente. Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA – Brasília, MMA: 39 – 47.

MATTHIOPOULOS J., HARWOOD J. e THOMAS L., 2005. Metapopulation consequences of site fidelity for colonially breeding mammals and birds. *Journal Animal Ecology* 74: 716–727.

MILOT E., WEIMERSKIRCH H. e BERNATCHEZ L., 2008. The seabird paradox: dispersal, genetic structure and population dynamics in a highly mobile, but philopatric albatross species. *Molecular Ecology* 17: 1658–1673.

MIYAKI C.Y., 2001. Genética e evolução aplicadas à conservação. *Ornitologia e conservação: da ciência às estratégias*. Editora Unisul, Tubarão, SC: 239-248.

MONTEVECCHI W.A., 1993. Birds as indicators of change in marine prey stocks. *Birds as monitors of environmental change*. Chapman and Hall, London: 217–266.

MORAES V. S. e KRUL R., 1995. Aves associadas a ecossistemas de influência marítima no litoral do Paraná. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 38 (1): 121-134.

MORENO C.A.; ARATA J.A.; RUBILAR P.; HUCKE-GAETE R.; ROBERTSON G., 2006. Artisanal longline fisheries in Southern Chile: lessons to be learned to avoid incidental seabird mortality. *Biological Conservation* 127: 27-36.

MORITZ C.; DOWLING T. E. e BROWN W. M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.

MORRIS-POCOCK J.A., STEEVES T.E., ESTELA F.A., ANDERSON D.J. e FRIESEN V.L., 2010 a. Comparative phylogeography of brown (*Sula leucogaster*) and red-footed boobies (*S. sula*): The influence of physical barriers and habitat

preference on gene flow in pelagic seabirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 883–896.

MORRIS-POCOCK J.A., TAYLOR S.A., BIRT T.P., FRIESEN V.L., 2010 b. Concerted evolution of duplicated mitochondrial control regions in three related seabird species. *BMC Evol Biol* 10:14

MORRIS-POCOCK J.A., ANDERSON D.J. e FRIESEN V.L., 2011. Mechanisms of global diversification in the brown booby (*Sula leucogaster*) revealed by uniting statistical phylogeographic and multilocus phylogenetic methods. *Molecular Ecology* 20: 2835–2850.

NEI M. E KUMAR S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

NEIGEL, J.E., 2002. Is FST obsolete? *Conservation Genetics* 3(2):167-173.

NELSON J. B., 1978. *The Sulidae: Gannets and Boobies*. Oxford, UK: Oxford University Press.

NIXON S. e LEE V., 1998. A comparison of foraging techniques of brown pelicans and brown boobies in Sandy Ground Lagoon, Jost Van Dyke, B.V.I. *Caribbean Journal of Science*. 34(1-2): 125-129.

NORTON R. L., 1988. The density and relative abundance of Pelecaniformes on the Eastern Puerto Rico Bank in december 1982. *Caribbean Journal of Science* 24(1-2): 28-31.

O'BRIEN R.M. e DAVIES J., 1990 A new subspecies of masked booby *Sula dactylatra* from Lord Howe, Norfolk and Kermadec Islands. *Marine Ornithology*, 18: 1–7.

ORO D., PRADEL R. e LEBRETON J.-D., 1999. Food availability and nest predation influence life history traits in Audouin's gull, *Larus audouinii*. *Oecologia* 118: 438–445.

PALUMBI S.R., SANDIFER P.A., ALLAN J.D., BECK M.W., FAUTIN D.G., FOGARTY M.J., HALPERN B.S., INCZE L.S., LEONG J., NORSE E., STACHOWICZ J.J. e WALL D.H., 2008. Managing for ocean biodiversity to sustain marine ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7: 204–211.

PATTERSON S.A., MORRIS-POCOCK J.A. e FRIESEN V.L., 2011. A multilocus phylogeny of the Sulidae (Aves: Pelecaniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 181–191.

PELANDA A.A., 2007. Impactos humanos sobre aves associadas a ecossistemas marinhos na costa paranaense. Monografia. Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, Paraná.

PETRY M.V. e FONSECA V.S. Da S., 2002. Effects of human activities in the marine environment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ornitologia Neotropical*, 13: 137-142.

PIATT J.P., SYDEMAN W.J. e WIESE F., 2007. Introduction: a modern role for seabirds as indicators. *Marine Ecology Progress Series* 352:199–204.

PICHEGRU L., GRÉMILLET D., CRAWFORD R.J.M. e RYAN P.G., 2010. Marine no-take zone rapidly benefits endangered penguin. *Biology Letters* 6(4): 498–501.

PIERROTI R. e ANNETT C.A., 1990. Diet and reproductive output in seabirds. *BioScience* 40: 568–574.

PIQUET R., 2003. Da cana ao petróleo: uma região em mudança. In: Piquet, R. (Org). *Petróleo, royalties e região*. Rio de Janeiro: Garamond: 219-238.

PITMAN R.L. e JEHL, 1998. Geographic variation and reassessment of species limits in the “Masked” Boobies of the eastern Pacific Ocean. *Wilson Bulletin* 110: 155-170.

RAYNER M.J., HAUBER M.E., STEEVES T.E., LAWRENCE H.A., THOMPSON D.R., SAGAR P.M., BURY S.J., LANDERS T.J., PHILLIPS R.A., RANJARD L. e SHAFFER S.A., 2011. Contemporary and historical separation of transequatorial migration between genetically distinct seabird populations. *Nature Communications* 2: 332.

REIS E. C. , SOARES L. S. , VARGAS S. M. , SANTOS F. R. , YOUNG, R. J., BJORN DAL K. A. , BOLTEN A. B. E LÔBO-HAJDU G., 2010. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics*, Vol 11, pp 1467-1477.

REZENDE C. E.; LACERDA L. D.; OVALLE A. R. C.; SOUZA C. M. M.; GOBO A. A. R. e SANTOS D. O., 2002. The effect of an oil drilling operation on a trace metal distribution in bottom sediments from the Brazilian continental platform. *Marine Pollution Bulletin* 44: 680-684.

RIFFAUT L., MCCOY K.D., TIRARD C., FRIESEN V.L. e BOULINIER T., 2005. Population genetics of *Uria aalge* in the North Atlantic: geographic impact of oil spills. *Marine Ecology Progress Series* 291: 263–273.

ROBERGE J.M. e ANGELSTAM P., 2004. Usefulness of the umbrella species concept as a conservation tool. *Conservation Biology* 18: 76–85.

ROGERS A.R., 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49:608-615.

ROGERS A.R. e HARPENDING H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.

ROSS K.G., 2001. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology* 10: 265–284.

SAITOU N. e M. NEI ., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4. p,406-425.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F. e MANIATIS T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

SANDOVAL-CASTILLO J., ROCHA-OLIVARES A., VILLAVICENCIO-GARAYZAR C., e BALART E., 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology* 145: 983–988.

SCHNEIDER, S. e EXCOFFIER, L., 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.

SCHREIBER E. e NORTON R., 2002. Brown booby: *Sula leucogaster*. *The Birds of North America*, 17/1: 1-26.

SHIZUKA D. e LYON B.E., 2008. Improving the reliability of molecular sexing of birds using a W-specific marker. *Molecular Ecology Resources* 8: 1249-1253.

SICK H., 1988. *Ornitologia Brasileira, uma introdução*. 3º ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília: 912.

SICK H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira.

SILVA R.J., RASO T.F., FARIA P.J. e CAMPOS F.P., 2005. Occurrence of *Contracecum pelagicum* Johnston & Mawson 1942 (Nematoda, Anisakidae) in *Sula leucogaster* Boddaert 1783 (Pelecaniformes, Sulidae). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 57(4): 565-567.

SIMMONS K.E.L., 1967. Ecological adaptation in the life history of the brown booby at Ascension Island. *The Living Bird* 6: 187-212.

SLATKIN M., 1993. *Gene Flow and Population Structure*. In: *Ecological Genetics*. Princeton University Press.

SOARES M. e SCHIEFLER A. F., 1995. Reprodução de *Larus dominicanus* (Aves, Laridae), na Ilhota da Galheta, Laguna, SC, Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 38(1): 313-316.

SOLARI A. J., 1994. *Sex chromosomes and sex determination in vertebrates*. CRC Press, London: 43-73.



STEPIEN C.A., ROSENBLATT R.H. e BARGMEYER B.A., 2001. Phylogeography of the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*: divergence of Gulf of California and Pacific coast populations. *Evolution* 55: 1852–1862.

STEEVES T. E., ANDERSON D. J., MCNALLY H., KIM M. H. e FRIESEN V. L., 2003. Phylogeography of *Sula*: the role of physical barriers to gene flow in the diversification of tropical seabirds. *Journal of Avian Biology* 34: 217–223.

STEEVES T. E., ANDERSON D. J. e FRIESEN V. L., 2005a. The Isthmus of Panama: a major physical barrier to gene flow in a highly mobile pantropical seabird. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 1000–1008.

STEEVES T. E., ANDERSON D. J. e FRIESEN V.L., 2005b. A role for nonphysical barriers to gene flow in the diversification of a highly vagile seabird, the masked booby (*Sula dactylatra*). *Molecular Ecology* 14: 3877–3887.

TAJIMA F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

TAJIMA F., 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among site. *Genetics* 143: 1457-1465.

TAMURA K. e NEI M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.

TASKER M.L.; CAMPHUYSEN C.J.; COOPER J.; GARTHE S.; MONTEVECCHI W. A. e BLABER S.J.M., 2000. The impacts of fishing on marine birds. *ICES Journal of Marine Science* 57: 531-547.

TATARENKOV e AVISE, 2007 Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *The Royal Society B* 274: 1795–1798.

TAYLOR S.A., ANDERSON D.J., ZAVALAGA C.B. e FRIESEN V.L., 2012. Evidence for strong assortative mating, limited gene flow, and strong differentiation across the blue-footed/Peruvian booby hybrid zone in northern Peru. *Journal of Avian Biology* 43: 311–324.

TAYLOR S.A., ZAVALAGA C.B., LUNA-JORQUERA G., SIMEONE A., Anderson D.J. e FRIESEN V.L., 2011 a. Panmixia and high genetic diversity in a Humboldt Current endemic, the Peruvian booby (*Sula variegata*). *Journal Ornithology* 152: 623–630.

TAYLOR S.A., MACLAGAN L., ANDERSON D.J e FRIESEN V.L., 2011 b. Could specialization to cold-water upwelling systems influence gene flow and population differentiation in marine organisms? A case study using the blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Journal of Biogeography* 38: 883–893.

- TEIXEIRA J., SECCO H., MACIEL C.P. e SUZUKI M.S., 2010. Sazonalidade hidroquímica e transporte de materiais dissolvidos no delta da Bacia do Rio Paraíba do Sul, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil (2008 – 2009). Boletim do observatório ambiental Alberto Ribeiro Lamego, 4(2): 205-218.
- VALENTIN J.L., 2001. The Cabo Frio Upwelling System, Brazil. Ecological Studies: Coastal Marine Ecosystems of Latin America. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 97-105
- VERMEER K. e PEAKALL D.B., 1977. Toxic chemicals in Canadian fish-eating birds. Marine Pollution Bulletin 8: 205–210.
- WALKER C.H., 1990. Persistent pollutants in fish-eating sea birds – bioaccumulation, metabolism and effects. Aquatic Toxicology. 17: 293–324.
- WALSH H.E. e EDWARDS S.V., 2005. Conservation genetics and fisheries by-catch: mitochondrial differentiation and population assignment in black-footed albatrosses (*Phoebastria nigripes*). Conservation Genetics 6: 289–295.
- WALTER U. e BECKER P. H., 1994. The significance of discards from the brown shrimp fisheries for seabird. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. Ambio 22: 10–18.
- WANIA F. E MACKAY D., 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. Ambio 22, 10–18.
- WEIMERSKIRCH H., LE CORRE M., ROPERT-COUDERT Y., KATO A., MARSAC F., 2005. The three-dimensional flight of red-footed boobies: adaptations to foraging in a tropical environment. Proc R Soc London B Biol Sci 272:53–61.
- WEIMERSKIRCH H., LE CORRE M., BOST C.A., 2008. Foraging strategy of masked boobies from the largest colony in the world: relation with environmental conditions and fisheries? Mar Ecol Prog Ser 362:291–302
- WEIMERSKIRCH H., LE CORRE M., GADENNE H., PINAUD D., KATO A., ROPERT-COUDERT Y. e BOST C-B., 2009. Relationship between reversed sexual dimorphism, breeding investment and foraging ecology in a pelagic seabird, the masked booby. Oecologia 161: 637–649.
- WHITLOCK, M.C. & MCCAULEY, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal  $1/(4Nm+1)$ . Heredity 82:117-125 (Part 2).
- WILSON A.C., CANN R.L., GEORGE M., GYLLENSTEN U.B., HELMBYCHOWSKI K.M., HIGUSHI R.G., PALUMBI E.M., SAGE R.D. e STONEKING M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biological Journal of Linnean Society, 26: 375-400.
- WRIGHT S., 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.

WRIGHT S. , 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

WoRMS, World Register of Marine Species.

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=137055>. Consultado em 03 de dezembro de 2012.

YABSLEY M. J, WORK T.M. e RAMEYER R. A., 2006. Molecular Phylogeny of *Babesia poelea* From Brown Boobies (*Sula leucogaster*) From Johnston Atoll, Central Pacific. *Journal of Parasitology*, 92(2): 423-425.

## APÊNDICE A – Protocolos de Biologia Molecular

---

### A.1 Extração de DNA com CTAB

O protocolo de extração do DNA genômico total, modificado de Damato & Corach (1996), faz uso de tampão de lise contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB 2% / 100 mM Tris-Cl pH 8,0 / 20 mM EDTA / 1,4 M NaCl).

Suas etapas estão detalhadamente explicadas abaixo:

- 1) Separar as amostras a serem extraídas e colocar num isopor com gelo;
- 2) Usando tesoura e pinça, retirar 10 mg de cada amostra, colocar num tubo autoclavado, devidamente numerado. Picar o tecido no interior do tubo com a tesoura e manter o tubo no gelo, sempre lavando a pinça e a tesoura em solução de NaOH 1M e enxaguando em água Milli-Q ou destilada estéril entre a manipulação de cada amostra para evitar contaminação;
- 3) Preparar o tampão de lise (tampão CTAB 2%), lembrando de adicionar (em capela de exaustão), logo antes do uso, 1  $\mu$ L de beta-mercaptoetanol e 0,5  $\mu$ L de proteinase K (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) para cada 1 mL de solução de tampão CTAB a ser utilizada. A proteinase quebra as proteínas em subunidades menores, facilitando a sua posterior remoção. O detergente (CTAB) auxilia a lise celular removendo moléculas de lipídeos das membranas;
- 4) Adicionar 700  $\mu$ L do tampão CTAB preparado em cada tubo;
- 5) Incubar a mistura em banho-maria a 55°C por 3 horas ou *overnight*;
- 6) Retirar os tubos do banho, com o auxílio dos pistilos plásticos autoclavados, macerar o tecido com cuidado para não derramar o tampão;
- 7) Colocar numa estante e adicionar clorofórmio à mistura na proporção 1:1, 700  $\mu$ L (em capela de exaustão);
- 8) Misturar as fases por inversão até que a solução fique homogênea (com aspecto leitoso), centrifugando em seguida a 10.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. É possível observar a formação de 3 fases: a fase superior (aquosa) que contém o DNA e RNA; a fase inferior (orgânica) que contém o clorofórmio mais lipídeos, polissacarídeos e *debris* celulares; e na interface entre as duas fases há uma massa branca de proteínas coaguladas;

- 9) Cuidadosamente retirar somente a fase aquosa e transferir para um novo tubo numerado. Repetir a etapa do clorofórmio;
- 10) Passar o sobrenadante para um tubo limpo, verificar o volume obtido de fase aquosa e adicionar 1/10 deste volume de sal - 3 M acetato de sódio pH 5,2 - mais igual volume de álcool isoamílico;
- 11) Misturar por inversão, deixando no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Nesta etapa o DNA precipita, podendo ser observado como uma nuvem esbranquiçada;
- 12) No dia seguinte, centrifugar a 14.000 rpm por 20 minutos em microcentrífuga refrigerada ( $4^{\circ}\text{C}$ );
- 13) Descartar o sobrenadante com cuidado, observando a ocorrência de *pellet* de DNA no fundo do tubo;
- 14) Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado. Esta solução irá retirar o excesso de sal da amostra, mas sem solubilizar o DNA;
- 15) Centrifugar a 10.000 rpm por 3 minutos em microcentrífuga;
- 16) Descartar o sobrenadante com cuidado e manter o tubo invertido sobre papel toalha até que o *pellet* de DNA seque por completo;
- 17) Suspender o DNA em 30-50  $\mu\text{L}$  de água com RNase (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e deixar à temperatura ambiente;
- 18) Por fim, armazenar os tubos com DNA em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## A.2 Quantificação do DNA genômico em gel de agarose

A concentração de DNA das amostras é estimada através da realização de uma eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-base, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA), utilizando também o TBE 0,5X como tampão de corrida. A agarose forma uma malha que oferece resistência à migração das partículas, de modo que as maiores ficam “retidas” ao passo que as menores migram mais facilmente. Como o DNA genômico apresenta carga negativa, este migra em direção ao eletrodo de pólo positivo.

A corrida é realizada em cuba de eletroforese horizontal por cerca de uma hora a 80V. Cada 5  $\mu\text{L}$  de DNA genômico da amostra é aplicado em gel com 2  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento de amostra ou *loading-buffer* (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol). Este tampão dá densidade à

amostra, impedindo que o DNA se difunda pelo TBE 0,5X e também facilita a aplicação uma vez que confere cor à amostra. Além disso, o corante azul de bromofenol migra a uma taxa conhecida no gel, mais rapidamente que o xilenocianol (correndo próximo dos fragmentos de DNA com tamanho de cerca de 300 pares de bases e 4 kb, respectivamente), facilitando o controle do tempo de corrida. Em seguida, o gel é incubado com brometo de etídio (EtBr) (0,6 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos. Com o auxílio de luz ultravioleta do transiluminador (UVP 254nm), a quantidade de DNA é então aferida por meio da comparação de concentrações padrão de DNA de bacteriófago lambda (λ10 ng/µL, λ50 ng/µL) com a intensidade de banda e/ou arrasto obtidos em cada amostra de DNA.

### A.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificar a região controle do DNA mitocondrial das amostras de *Sula leucogaster* são utilizados os oligonucleotídeos sintéticos ou *primers* SIMCR-L160A (5'-ATCCACATTGCACATTTAAA-3'; STEEVES *et al.*, 2005) e SdMCR-H750 (5'-GGGAACCAAAGAGGAAAACC-3'; STEEVES *et al.*, 2005).

A reação de PCR ocorre em termociclador BIORAD com o seguinte programa: 95°C/2min; 30 ciclos de 94°C/30seg, 54°C/30seg e 72°C/1min; 72°C/3min. As condições de termociclagem estão indicadas no esquema abaixo:

- 95°C por 2' → certifica que o DNA encontra-se desnaturado para a próxima fase
- 30 ciclos {
  - 95°C por 30" → desnaturação do DNA
  - 54°C por 30" → pareamento dos *primers*
  - 72°C por 1' → extensão / adição de nucleotídeos
- 72°C por 3' → garante que as fitas que ainda encontram-se incompletas sejam completadas neste passo do ciclo

Cada reação de amplificação contém uma mistura de 9,7 µL de água Milli-Q autoclavada; 1,5 µL de tampão de reação 10X (Promega); 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Biotools); 0,6 µL de dNTPs 5 mM (dATP + dCTP + dGTP + dTTP);

combinação de *primers* desejada na concentração de 0,4  $\mu\text{M}$ , sendo utilizados 0,6  $\mu\text{L}$  de cada; 0,5  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase *Tth* 1U/ $\mu\text{L}$  (Promega) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico total (aproximadamente 0,5 ng/ $\mu\text{L}$ ) em 15  $\mu\text{L}$  de reação (ver Tabela A1). As reações de PCR foram realizadas com a adição de controles negativo (sem DNA) e positivo (com concentração de DNA que sempre gera amplificação do fragmento desejado) de modo a averiguar possíveis contaminações e avaliar a qualidade dos reagentes utilizados.

Tabela A1 – Reagentes, volumes e concentrações ideais para a amplificação da região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster*.

| Reagentes                     | Concentração estoque | Volume ( $\mu\text{L}$ ) | Concentração final      |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Água Milli-Q                  | ---                  | 9,7                      | ---                     |
| Tampão (Biotools)             | 10X                  | 1,5                      | 1X                      |
| MgCl <sub>2</sub> (Biotools)  | 50 mM                | 0,5                      | 1,6 mM                  |
| dNTP                          | 5 mM                 | 0,6                      | 0,2 mM                  |
| SIMCR-L160A                   | 10 $\mu\text{M}$     | 0,6                      | 0,4 $\mu\text{M}$       |
| SdMCR-H750                    | 10 $\mu\text{M}$     | 0,6                      | 0,4 $\mu\text{M}$       |
| DNA polimerase ( <i>Tth</i> ) | 1 U/ $\mu\text{L}$   | 0,5                      | 0,033 U/ $\mu\text{L}$  |
| DNA                           | 10 ng/ $\mu\text{L}$ | 1,0                      | 0,015 ng/ $\mu\text{L}$ |
| Total                         |                      | 15,0                     |                         |

#### A.4 Visualização dos produtos da PCR em gel de agarose

Após a amplificação pela PCR, as amostras são novamente submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X, utilizando também o TBE 0,5X como tampão de corrida. São utilizados marcadores de tamanho conhecido em pares de bases (pb) para a identificação do fragmento amplificado. O padrão ou marcador de tamanho conhecido habitualmente utilizado é o Gene Ruler™ 100 pares de bases DNA *ladder* (Fermentas). Este apresenta 11 bandas e fragmentos de 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 e 80 pares de bases (pb). Entretanto, é preciso estar atento ao fato de que nem sempre as menores bandas aparecem em gel de agarose 2,0%.

#### A.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação sexual

Para amplificar dos íntrons CHD-Z e CHD-W dos cromossomos sexuais de *Sula leucogaster* são utilizados os oligonucleotídeos sintéticos ou P2 (5'-TCT

GCA TCG CTA AAT CCT TT-3') e P8 (5'-CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG-3') (Griffiths *et al.*, 1998).

A reação de PCR ocorre em termociclador VERITI com o seguinte programa: 94°C/2min; 35 ciclos de 94°C/45seg, 52°C/45seg e 72°C/45min; 72°C/5min. Cada reação de amplificação contém uma mistura de 4,7 µL de água Milli-Q autoclavada; 1,4 µL de tampão de reação 10X com MgCl<sub>2</sub> (Biotools); 0,4 µL de dNTPs 5 mM (dATP + dCTP + dGTP + dTTP); combinação de *primers* desejada na concentração de 1 µM, sendo utilizados 1 µL de cada; 0,5 µL de DNA polimerase *Tth* 5U/µL (Biotools) e 1 µL de DNA genômico total (aproximadamente 0,5 ng/µL) em 15 µL de reação (ver Tabela A2). Para toda PCR são realizados controles negativo (sem DNA) e positivo (com concentração de DNA que sempre gera amplificação do fragmento desejado) de modo a averiguar possíveis contaminações e avaliar a qualidade dos reagentes utilizados.

Tabela A2 – Reagentes, volumes e concentrações ideais para a amplificação da região controle do DNA mitocondrial de *Sula leucogaster*.

| Reagentes                              | Concentração estoque | Volume (µL) | Concentração final |
|--|----------------------|-------------|--------------------|
| Água Milli-Q                           | ---                  | 4,7         | ---                |
| Tampão c/ MgCl <sub>2</sub> (Biotools) | 10X                  | 1,4         | 1X                 |
| dNTP                                   | 5 mM                 | 0,4         | 0,7 mM             |
| P2                                     | 10 µM                | 1,0         | 1 µM               |
| P8                                     | 10 µM                | 1,0         | 1 µM               |
| DNA polimerase ( <i>Tth</i> )          | 5 U/µL               | 0,5         | 0,25 U/µL          |
| DNA                                    | 10 ng/µL             | 1,0         | 1 ng/µL            |
| Total                                  |                      | 10,0        |                    |

#### A.6 Visualização de produto de PCR para identificação sexual

Os produtos da PCR dos íntrons CHD-Z e CHD-W dos cromossomos sexuais, no total de 10 µL, são aplicados no gel de poliacrilamida não-desnaturante (quantidade para 2 géis de SSCP 8,0%: 9,6 mL de acrilamida 50%; 6,0 mL de TBE 5X; 43,8 mL de água Milli-Q; 600 µL de APS 10% e 40 µL de TEMED; sendo estes dois últimos adicionados apenas no momento de verter o gel - SAMBROOK *et al.*, 1989) e submetidos a um campo elétrico de 15V/cm por, no mínimo, 8 horas.



Ao término da eletroforese, o gel de poliacrilamida é submetido à coloração por nitrato de prata, que consiste na fixação em 10% de ácido acético durante 20 minutos; lavagem de 2 minutos, duas vezes, em água Milli-Q e incubação por 30 minutos, sob agitação, em solução de coloração (que deve ser mantida protegida da luz), contendo para cada 500 mL: 0,7 g de nitrato de prata + 1.050  $\mu$ L de formaldeído, que deve ser adicionado imediatamente antes do uso. Após a coloração, o gel é lavado novamente com água Milli-Q por 10 segundos e revelado com solução de revelação (que deve ser mantida sob refrigeração) contendo para cada 500 mL: 15 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro, 750  $\mu$ L de formaldeído e 100  $\mu$ L de tiosulfato de sódio (10 mg/mL), sendo estes dois últimos adicionados apenas na hora do uso (BASSAM *et al.*, 1991). As bandas aparecem quando o nitrato de prata, que tem carga positiva, liga-se por afinidade ao DNA, que possui carga negativa. Após o aparecimento das bandas, deve-se parar a revelação com solução de ácido acético 10%. Em seguida, retira-se cuidadosamente tal solução para que os géis possam então ser montados em placas de vidro e devidamente embrulhados em papel celofane umedecido.