

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Estrutura populacional de *Fregata magnificens*
(AVES, SULIFORMES)

Andressa Nuss

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Nelson J. R. Fagundes

Co-orientador: Prof. Dr. Ignacio B. Moreno

Porto Alegre, março de 2014.

Apoio

- CNPq
- Projeto Ilhas do Rio- Instituto mar adentro
- Petrobrás Ambiental
- Avidepa- Associação Vila-velhense de Proteção Ambiental
- Projeto AVES AMAR - Pesquisa, Monitoramento e Conservação de Aves Aquáticas, Marinhas e Ambientes Insulares do Estado de São Paulo
- PPGBM
- GEMARS

AGRADECIMENTOS

Ao Caio, meu “amigo de alma”, ornitólogo e filósofo que me apresentou o mundo magnífico das fragatas, percorreu comigo todo esse longo caminho, e foi um grande idealizador de todo o trabalho. Estou feliz em pensar que nosso brinde vem em breve.

Ao meu orientador Nelson, a quem sou infinitamente grata por ter contribuído tanto pro meu crescimento profissional, por ter confiado nas minhas idéias e aceitado essa proposta além de não me deixar dúvida do quanto eu acertei em fazer essa parceria com ele.

Ao meu co-orientador Ignacio, que me acolheu no Labsmar e sempre esteve disposto a ajudar em tudo, além de ter me proporcionado a oportunidade de ampliar horizontes e vislumbrar esse fascinante mundo marinho.

A todos colegas de laboratório, por tornarem o ambiente de trabalho descontraído, tornando a convivência agradável e prazerosa.

Aos meus amigos do clube dos cinco, em especial a Soraia por ter feito desses últimos dois anos tão divertidos, sempre me apoiando nos momentos difíceis.

Um agradecimento especial ao Gui, por ter me ajudado tanto e de tantas formas, sendo meu fiel companheiro faça chuva ou faça sol, mar adentro ou campo afora, mesmo longe sempre muito perto.

Aos meus pais pelo amor e compreensão, tornando tudo isso possível.

A aqueles que doaram seu tempo, paciência e conhecimento para me ajudar com dúvidas: Fernanda Pedone, Aline Fregonezi, Caroline Turchetto, Mayara Medeiros, Josmael Corso e Elmo Cardoso.

Aos doadores de amostras e possibilitadores de coletas, fundamentais para a realização desse trabalho: Sarah Trefry, Beinoit de Thoisy, Larissa Cunha, Juliana Saviolli, Luis Augusto Ebert, Cesar Musso, Ricardo Krul e Salvatore Siciliano.

Fabício R. Santos, Thales R. O. de Freitas e Eduardo Eizirik por gentilmente aceitarem participar da banca examinadora.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

APOIO.....	ii
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A espécie: <i>Fregata magnificens</i>	1
1.2 Biogeografia do atlântico.....	4
1.3 Genética e as aves marinhas.....	6
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.....	11
4. DISCUSSÃO GERAL	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
6. ANEXO I.....	61
6.1 Breve descrição das ilhas amostradas.....	61

RESUMO

Fregata magnificens (Fregatidae) é uma ave marinha que se reproduz em ilhas costeiras e oceânicas do Atlântico, desde a Flórida até o sul do Brasil, e do Pacífico, desde a Baixa Califórnia até o Equador, incluindo as Ilhas Galápagos. Apesar da grande capacidade de voo, as fragatas tendem a permanecer durante todo o ano nas proximidades das colônias reprodutivas, voando em velocidades lentas, mas varrendo uma grande área. Em aves marinhas, há um paradoxo aparente entre sua elevada capacidade de dispersão e uma aparente filopatria, o que tem levantado uma série de questões sobre estrutura populacional e história evolutiva. A fim de investigar tais aspectos, foram utilizadas amostras de DNA genômico de 156 indivíduos de *F. magnificens* pertencentes a oito populações do Atlântico Ocidental, das quais seis brasileiras (Moleques do Sul-SC, Arquipélagos de Currais-PR, Alcatrazes-SP, Cagarras-RJ, Ilha de Cabo Frio-RJ e Abrolhos-BA), uma da Guiana Francesa (Ilha Grand Connétable) e uma caribenha (Barbuda). Foram amplificados oito marcadores de microssatélites, e 1227 pb de dois genes do mtDNA (ND2 e CytB). As sequências de mtDNA foram alinhadas com outras de outras nove colônias reprodutivas depositadas no GenBank, incluindo Galápagos, diversas ilhas do Caribe e Panamá (n=282). As populações brasileiras apresentaram um único haplótipo comum a todas as amostras brasileiras, exceto por um indivíduo de Abrolhos, e compartilhado com Grand Connétable. Uma análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que boa parte da variação genética encontra-se entre grupos oceânicos de populações ($\Phi_{CT}=0,83$; $F_{CT}=0,49$), e análises par a par evidenciaram um isolamento genético entre as populações brasileiras e caribenhas, enquanto Grand Connétable ocupou uma posição intermediária. Para os microssatélites, uma análise Bayesiana de estruturação populacional (STRUCTURE) sugeriu a ocorrência de dois “clusters” genéticos. O primeiro está associado a Barbuda e, em menor grau, a Grand Connétable, enquanto o outro está associado às populações brasileiras. Uma estimativa de migração recente (BayesAss) detectou conexões desde Abrolhos e Moleques do Sul para outras ilhas brasileiras (exceto entre si), e de Abrolhos para Grand Connétable. Estimativas demográficas sugerem um tamanho populacional reduzido para as populações brasileiras (N_E médio= 353) comparado a Barbuda e Grand Connétable. A separação entre as populações brasileiras e as demais teria ocorrido há cerca de 3.000 anos. A maior diversidade genética para as populações do Caribe (incluindo Grand Connétable) para ambos os marcadores pode estar associado com uma colonização recente do Brasil.

Embora pareça existir alguma conexão entre Grand Connéctale e o Brasil (especialmente através da população de Abrolhos), ela é insuficiente para eliminar completamente a estruturação genética entre essas regiões. O padrão predominante de ventos, associado também às correntes marinhas que afetam a costa da América do Sul parecem bastante importantes para explicar os principais achados de estrutura genética evidenciados nos nossos dados.

ABSTRACT

Fregata magnificens (Fregatidae) is a seabird breeding in coastal and oceanic islands of the Atlantic, from Florida to southern Brazil, and the Pacific, from Baja California to Ecuador, including the Galapagos Islands. Despite a great capability of flight, this species tend to remain around the breeding colonies throughout the year, flying at slow speed, but covering a wide area. In seabirds, there is an apparent paradox between a high dispersal ability and an apparent philopatry, which has raised a number of questions about population structure and evolutionary history. In order to investigate these questions, we used samples of genomic DNA from 156 individuals of *F. magnificens* belonging to eight populations of the Occidental Atlantic, including six Brazilian archipelagos (Moleques do Sul-SC, Currais-PR, Alcatrazes-SP, Cagarras-RJ, Cabo Frio Island-RJ, and Abrolhos-BA), one in French Guyana (Grand Connétable Island) and one in the Caribbean (Barbuda). We amplified eight microsatellite markers and 1227bp from two mtDNA genes (ND2 and CytB). MtDNA sequences were aligned with others from nine breeding colonies deposited in GenBank, including the Galapagos, several Caribbean islands and Panama (n=282). Brazilian populations had a single haplotype common to all Brazilian samples, except for a single individual from Abrolhos, and shared with Grand Connétable. A molecular analysis of variance (AMOVA) showed that a large portion of the genetic variation is found between oceanic groups of populations ($\Phi_{CT}=0.83$; $F_{CT}=0.49$), and pairwise analysis evidenced genetic isolation between Brazilian and Caribbean populations, while Grand Connétable fell in an intermediate position. For microsatellites, a Bayesian analysis of population structure (STRUCTURE) suggested the occurrence of two genetic clusters. The first is associated to Barbuda and, to a lesser degree, to Grand Connétable, while the other is associated to the Brazilian populations. Estimates of recent migration (BayesAss) detected connections from Abrolhos and Moleques do Sul to other Brazilian Islands (except between each other), and from Abrolhos to Grand Connétable. Demographic estimates suggest a reduced population size for the Brazilian populations (average $N_E=353$) compared to Barbuda and Grand Connétable. Separation between the Brazilian populations and the others would have occurred by 3,000 years ago. The higher genetic diversity for the Caribbean populations (including Grand Connétable) for both markers may be associated with a recent colonization of Brazil. Despite there seems to exist some connection between Grand Connétable and Brazil (especially Abrolhos), this is insufficient

to fully eliminate the genetic structure between these regions. The predominant wind pattern, also associated with the marine currents affecting South American coast seem very important to explain the major findings of genetic structure evidenced in our data.

1.INTRODUÇÃO

1.1. A espécie: *Fregata magnificens*

As aves do gênero *Fregata*, conhecidas como fragatas, guarapirás ou tesourões, formam uma pequena família, FREGATIDAE Deglang & Gerbe, 1840, com distribuição reprodutiva pantropical. O gênero está composto por cinco espécies cuja morfologia externa é bastante similar. As fragatas são aves marinhas de grande porte, com plumagem quase completamente negra (as fêmeas têm o peito e/ou ventre brancos), asas longas (c.2 m de envergadura) e cauda profundamente bifurcada (por isso, também são chamadas de “tesourões”) (Del Hoyo *et al.*, 1992). São bastante longevas, chegando a viver 40 anos (Juola *et al.*, 2006). Exibem dimorfismo sexual, uma vez que a coloração da plumagem de machos e fêmeas adultos difere marcadamente. Os machos são 25% menores e possuem plumagem completamente negra, penas iridescentes na região do pescoço e possuem uma bolsa gular vermelha que é inflada num complexo ritual para atrair as fêmeas durante a estação reprodutiva. (Murphy 1936; Del Hoyo *et al.*, 1992; Sick, 1997; Nelson, 2005).

Fazem ninhos utilizando gravetos, muito próximos um dos outros, geralmente em arbustos nas ilhas costeiras e oceânicas. Os ciclos reprodutivos são longos e geralmente com picos indefinidos, contendo filhotes de diferentes estágios de desenvolvimento nas colônias reprodutivas ao longo das estações. A fêmea permanece com o filhote até que este se torne independente (de 9 a 12 meses, sendo o mais custoso para os pais dentre as aves marinhas) (Del Hoyo *et al.*, 1992) enquanto o macho deserta depois das primeiras semanas, tornando o ciclo reprodutivo desigual entre os sexos, há indícios de que as fêmeas se reproduzem a cada dois anos, enquanto o macho poderia reproduzir-se a cada ano (Diamond, 1973).

As fragatas apresentam diversas peculiaridades em relação ao voo e aerodinâmica. Os ossos são altamente pneumáticos, sendo que todos somados constituem somente 5% do peso do seu corpo. Além disso, possuem fúrcula fusionada ao esterno permitindo altíssima força e mobilidade (Del Hoyo *et al.*, 2005). Em comparação com outras aves de massa semelhante, fragatas têm uma superfície e envergadura de asa incomunmente grandes. Estas duas características não são necessariamente simultâneas, e podem ser vistas como adaptações independentes. Em resultado, a fragata conta com a menor carga da asa (razão entre massa total e superfície da asa) dentre todas as aves (Pennycuick, 1983). Isso permite

que ela voe sem muito esforço, batendo com frequência muito baixa as asas, em círculo com raios pequenos, atingindo altitudes elevadas como 2800 metros (Weimerskirch *et al.*, 2003, 2004), além disso usa a cauda como leme em suas manobras aéreas, que são muito frequentes em momentos de capturar alimentos. São extremamente adaptadas para usar as correntes termais estreitas, entre a superfície do mar e os ventos alísios, acima das nuvens de forma contínua, dia e noite, por períodos prolongados (Pennycuick, 1983, 1987). A fêmea tem maior carga de asa em comparação ao macho, o que pode ser consequência da diferença no ciclo reprodutivo, uma vez que a maior carga da asa reflete maior facilidade de encontrar alimento. Assim, as fêmeas podem voar de forma menos dependente das correntes termais forrageando em uma área maior. Isso seria vantajoso uma vez que elas são encarregadas do cuidado parental contínuo (Diamond, 1972; Pennycuick, 1983; Trivelpiece & Ferraris, 1987).

As fragatas possuem membros posteriores reduzidos o que as torna incapazes de andar, mergulhar e pousar na água. Também possuem glândula uropigial reduzida, característica compartilhada por vários táxons dessa ordem (SULIFORMES), fazendo com que suas penas encharquem facilmente. Somando essas características, uma queda acidental no mar pode ser fatal. Necessitam iniciar o voo a partir de poleiros altos onde possam impulsionar a decolagem com auxílio do vento. (Pennycuick, 1987; Del Hoyo *et al.*, 2005). Nelson (1975) considera que as essas características incomuns surgiram a partir de suas necessidades alimentares especiais. Alimentam-se, principalmente de peixes voadores e lulas capturados na superfície do mar (Eisenmann, 1962; Diamond, 1973, 1975; Scheiber & Hansley, 1976; Nelson, 1983; Rezende, 1987), de tartarugas jovens, ovos e filhotes de aves, peixes e caranguejos descartados por barcos pesqueiros (Eisenmann, 1962; Calixto-Albarrán & Osorno, 2000; Krul, 2000; Branco, 2001). A exata composição da dieta varia em função da disponibilidade de alimento e da técnica de captura utilizada (Calixto-Albarrán & Osorno, 2000; Branco, 2001). Além de seu conhecido hábito de cleptoparasitismo exercido em outras aves marinhas, onde o Atobá (*Sula sp.*) é o mais frequente alvo (Diamond, 1973). Rezende (1987) mostra, no entanto, que a relação entre estas duas espécies é mais complexa e que o comportamento cleptoparasitário pode ser interpretado como sendo apenas parte de todo um processo de exploração mútua, uma vez que estes possuem estratégias bem distintas de predação. De qualquer forma, tal método de alimentação seria relativamente custoso, demorado e pouco confiável, contribuindo para seus ciclos de reprodução longos e sua distribuição ao longo dos trópicos. Segundo

Weimerskirch e colaboradores (2003), esse padrão morfológico da fragata acarreta baixíssimos custos de forrageio, mas também as leva a viajar lentamente ao longo das grandes distancias, colocando as fragatas em um extremo evolutivo que lhe permite explorar águas tropicais onde a presa é escassa.

A espécie *Fregata magnificens* (Mathews, 1914) possui a seguinte distribuição reprodutiva de acordo com as sub-espécies de *Fregata* atualmente reconhecidos (Murphy, 1936; Sibley & Monroe, 1990; Del Hoyo *et al.*, 1992; Sick, 1997; Nelson, 2005). *F. magnificens magnificens*: Ilhas Galápagos, Oceano Pacífico, *F. magnificens rothschildi*: Ilhas das costas Atlântica e Pacífica do continente americano (i.e., EUA [Flórida], México [ilhas ao largo das costas Pacífica e Caribenha], Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Trinidad e Tobago, Haiti, República Dominicana, Porto Rico, Aruba, Curaçao, Barbados, Martinica, Bonaire, Guiana Francesa, Brasil [Fernando de Noronha, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina]), *F. magnificens lowei*: Arquipélago de Cabo Verde, Oceano Atlântico Norte.

Apesar da grande capacidade de vôo, as fragatas tendem a permanecer durante todo o ano nas proximidades das colônias reprodutivas (Del Hoyo *et al.*, 1992; Nelson, 2005), voando em velocidades lentas varrendo uma área grande ao redor da colônia reprodutiva (Weimerskirch *et al.*, 2006). Os juvenis, logo que deixam o ninho frequentemente dispersam-se por longas distâncias (>1.000 km), fazendo uso dos principais sistemas de ventos oceânicos e/ou sendo transportados por tempestades (Murphy, 1936; Del Hoyo *et al.*, 1992; Nelson, 2005). Antas (1986) relatou o caso de uma fragata anilhada no Paraná que foi recuperada posteriormente no Caribe, o fato poderia ser explicado por eventos de adversidade climática, tratar-se de um caso isolado de um vagante ou dispersão de jovens conforme citado anteriormente. Essa característica levou alguns autores, tais como Murphy (1936) e Bourne (1955), a terem dúvidas quanto à existência de tantas subespécies – 13 atualmente descritas (Murphy, 1936; Sibley & Monroe, 1990; Del Hoyo *et al.*, 1992; Sick, 1997; Nelson, 2005) - de distribuição reprodutiva restrita. Para eles, indivíduos em dispersão seriam capazes de migrar de uma ilha para outra e, com isso, manter o fluxo gênico entre populações de uma mesma subespécie, pelo menos dentro de um mesmo oceano.

1.2. Biogeografia do atlântico

O Oceano Atlântico cobre aproximadamente 60° de latitude estendo-se da região Ártica até a Antártica. Inclui um conjunto de mares adjacentes, que influenciam suas características oceanográficas e, além disso, é dividido em uma série de bacias a leste e a oeste pela Cordilheira Meso-Oceânica, a qual exerce grande influência sobre a circulação das águas mais profundas (Tomczak & Godfrey, 2003).

Dentro do grande complexo oceano atlântico, giros subtropicais são bem definidos em cada hemisfério. O giro do norte é formado pela Corrente Norte Equatorial; Corrente das Antilhas a leste, Corrente do Caribe, através do Mar do Caribe, Corrente da Flórida, Corrente do Golfo, Corrente dos Açores e Correntes de Portugal e Canárias. Por sua vez, o giro do sul é composto pela Corrente Sul Equatorial, que flui para o oeste; Corrente do Brasil, Corrente do Atlântico Sul e Corrente de Benguela (Tomczak & Godfrey, 2003).

A distância entre as áreas delimitadas biogeograficamente provavelmente não é o único fator relevante para a definição dos padrões genéticos das populações. As barreiras que separam estas regiões oceânicas como as saídas de rios, limitações térmicas e os giros subtropicais podem desempenhar um papel significativo como obstáculos relevantes para alteração de fluxo gênico (Muss *et al.*, 2001).

Cada corrente oceânica possui características próprias de temperatura, salinidade e concentração de nutrientes e, por isso, favorecem ou limitam a ocorrência dos organismos, inclusive daqueles dotados de grande mobilidade, tais como as aves marinhas (Baumgartner *et al.*, 2001; Schreiber & Burger, 2002). De fato, ao contrário do que se imaginava, essas massas de água podem atuar como verdadeiras barreiras à dispersão das espécies marinhas, influenciando de diversas maneiras ocorrência e distribuição (Norris, 2000). Após o surgimento do Istmo do Panamá e o início da glaciação do Hemisfério Norte há cerca de 3 Ma, as principais correntes envolvidas no padrão de circulação do Atlântico já estavam definidas (Driscoll & Haug, 1998; Lessions, 2008). Porém, durante o Pleistoceno (entre ~2.600.000 – 11.700 anos), a alternância entre ciclos glaciais e interglaciais e os consequentes eventos de regressão e transgressão marinha foram eventos promotores de diversidade da fauna marinha (Davies, 1963; Hare *et al.*, 2002; Pastene *et al.*, 2007).

Para alguns tipos de fauna marinhas tropicais (cetáceos, peixes, etc.), o Atlântico constitui uma bacia oceânica isolada, pois o contato com outros oceanos ocorre somente em altas latitudes, onde a baixa temperatura da água age como uma barreira para espécies tropicais (Briggs, 2003; Lessions, 2008). O contato com o Oceano Pacífico Tropical está bloqueado pelo Istmo do Panamá há pelo menos 2,8 milhões de anos (Ma), enquanto a comunicação do Oceano Atlântico com o Índico via Mar Mediterrâneo está bloqueada desde o Mioceno Médio, há aproximadamente 15 Ma (Lessions, 2008).

Com exceção do Atol das Rocas, as ilhas oceânicas brasileiras são o resultado de erupções vulcânicas. A distancia destas do continente tem permitido a adaptação, a diferenciação e o aparecimento de espécies endêmicas, tanto aquáticas quanto terrestres (Couto *et al.*, 2003). As ilhas do Oceano Atlântico Tropical do Sul são amplamente dispersas e abrigam uma fauna de plataforma continental, que exhibe baixa diversidade e outros efeitos de isolamento (Floeter & Gasparini, 2000). Considerando que as ilhas variam em idade, tamanho e distância da costa, estudos comparativos de suas faunas podem revelar informações consideráveis sobre os padrões gerais de evolução e distribuição das espécies (Joyeux *et al.*, 2001).

Em relação às correntes brasileiras, as mais importantes são a Corrente Sul Equatorial (CSE), que é uma extensa região de fluxo uniforme direcionado para oeste, que é determinado pelos ventos alísios do sudeste respondendo rapidamente a suas variações, sendo mais forte no inverno (Agosto), do que no verão (Tomczak & Godfrey, 1993). Ao atingir a plataforma continental do Brasil ao largo da costa de Recife, a CSE bifurca-se num ramo mais forte, o qual flui para o noroeste, como a Corrente do Norte do Brasil, ou Corrente das Guianas (Silveira *et al.*, 1994) e outro mais fraco para o sul, que dá origem a Corrente do Brasil (Silveira *et al.*, 2000).

A Corrente do Brasil (CB) inicia-se em 10°S e flui para o sul ao longo da costa brasileira até atingir 38°S, onde conflui com as águas mais frias e menos salinas da Corrente das Malvinas (ou Falklands), a qual se constitui num intenso fluxo direcionado para o norte, originado da Corrente Circumpolar Antártica (Tomczak & Godfrey, 1993). Quando se encontram, as duas correntes separam-se da costa, formando uma intensa frente conhecida como a Zona da Confluência Brasil/Malvinas (Castello & Moeller, 1977; Silveira *et al.*, 2000). Durante o outono e inverno austrais a Corrente das Malvinas está mais forte e estende-se progressivamente para o norte, sob a influência dos fortes ventos de sul. Com isso, desloca a Corrente do Brasil e suas águas então invadem a plataforma

continental de Santa Catarina, podendo eventualmente chegar até a costa do Rio de Janeiro (Campos *et al.*, 1996). Durante o verão, com os ventos de nordeste, a Corrente do Brasil novamente domina a circulação costeira. Cabo Frio (~23°S) marca o limite norte alcançado pelas águas frias do sul. Nessa região, as ressurgências são fortes e, com a incursão das águas frias, a produtividade biológica aumenta significativamente. A produção oceânica aumenta em direção ao sul. Em contraste, as águas ao norte do Rio de Janeiro são relativamente pouco produtivas.

1.3. Genética e as aves marinhas

O termo filogeografia é classicamente aplicado ao estudo da distribuição genética de uma espécie em um contexto geográfico e temporal, com base na análise de haplótipos gerados a partir de segmentos de genes (Avice *et al.*, 1987; Avice, 2000; para algumas revisões recentes, ver Beheregaray 2008; Hickerson *et al.*, 2010). Essa linha de investigação busca observar padrões de variação genética entre grupos de espécies distribuídas, tentando estabelecer os principais fatores envolvidos na geração de características comuns ou divergentes entre os grupos, tais como: características das espécies em relação ao fluxo gênico, presença de barreiras físicas à dispersão, níveis históricos de variabilidade genética e contexto evolutivo das espécies (Zink, 1997).

As aves marinhas impõem diversos desafios ao entendimento dos mecanismos mais aceitos de diferenciação populacional. A maioria delas tem grande poder de deslocamento, com algumas espécies podendo voar milhares de quilômetros em uma única viagem de alimentação (Croxall *et al.*, 2005; Weimerskirch *et al.*, 2006). Por esse motivo, esses animais encontram poucas barreiras geográficas à sua dispersão. Embora as aves marinhas sejam consideradas como organismos altamente móveis, barreiras físicas podem impactar sua estruturação genética da mesma forma que afetaria animais menos móveis ou desprovidos da capacidade de voo. Por exemplo, a presença do Istmo do Panamá pode servir como uma eficiente barreira física para o fluxo gênico de algumas espécies de aves marinhas como atobás (*Sula sp.*) e Trinta-réis (*Sterna sp.*) (Avice *et al.*, 2000; Steeves *et al.*, 2003; Steeves *et al.*, 2005a,b). Espécies que possuem habitat fragmentado por terra ou gelo, invariavelmente exibem uma forte estrutura populacional e filogeográfica (Friesen *et al.*, 2007).

Muitas espécies de aves marinhas (26 de 37 estudadas) apresentam forte estrutura genética mesmo em a ausência de barreiras físicas óbvias (Friesen *et al.*, 2007). Em alguns casos, evidências morfológicas e genéticas indicam diferenciação populacional significativa. Existem indícios de que existe uma significativa variação geográfica na morfologia externa, onde aproximadamente 15% das espécies e 30% das subespécies de aves marinhas atualmente reconhecidas se reproduzem em uma única ilha ou arquipélago, e mesmo populações simpátricas podem divergir geneticamente (Del Hoyo *et al.*, 1992; 1996; Nelson 2005; Smith & Friesen 2007).

Assim, além de barreiras físicas, outros fatores devem ser responsáveis pela existência desta estrutura. De fato, fatores relacionados com histórias de vida dessas espécies têm afetado de forma importante as trajetórias evolutivas de algumas aves marinhas (Friesen *et al.*, 2007). Exemplos disso podem ser distintas áreas de forrageio, diferenças nos ciclos reprodutivos, podendo gerar picos de nidificação específicos para cada ilha (Burg & Croxall, 2004; Friesen *et al.*, 2007; Morris- Pocock *et al.*, 2010a,b). Espécies com ampla faixa de forrageio e/ou que se dispersam durante a estação não reprodutiva podem ser menos suscetível à estruturação genética, como uma consequência de taxas mais altas de fluxo de gênico (Calderón *et al.*, 2014).

Em aves marinhas pelágicas, há um paradoxo aparente entre alta capacidade de dispersão e relutância para tanto, o que tem levantado uma série de questões relativas à dispersão e sua evolução no reino marinho tais como os benefícios de filopatria e colonialidade (*e.g.* Coulson, 2002), as barreiras à dispersão (Friesen *et al.*, 2007) e as dinâmicas de formação e extinção de colônias (Matthiopoulos *et al.*, 2005). A filopatria poderia ter sido uma importante condição para o surgimento de uma estratégia de sobrevivência na qual o cenário é de recursos alimentares que estão disponíveis ao longo da vida inteira de um animal, em vez de recursos disponíveis em curtos períodos de tempo (Milot *et al.*, 2008). Assim, talvez a filopatria seja uma estratégia obrigatória para a maioria dos indivíduos associados aos ambientes marinhos. Há poucos estudos sobre a estruturação das populações e o fluxo gênico em aves marinhas tropicais (Avisé *et al.*, 2000;. Steeves *et al.*, 2003, 2005a,b; Smith *et al.*, 2007), e há boas razões para acreditar que os mecanismos de diferenciação podem variar entre latitudes (Friesen *et al.*, 2007).

Um estudo realizado com populações *F. magnificens* de diversas colônias reprodutivas do oceano pacífico e atlântico central, demonstrou através da utilização de marcadores mitocondriais, nucleares e microsatélites que há fluxo gênico entre as

populações nas colônias reprodutivas (exceto pela população de galápagos com grande divergência genética estrutural), sendo que a diversidade haplotípica foi baixa comparada com aves terrestres (Hailer *et al.*, 2010). Populações de aves marinhas com distribuição circumpolar como os albatrozes (DIOMEDEIDAE Gray, 1940), têm conseguido manter um certo fluxo gênico relativamente constante entre si, o que se contrapõe à divergência genética interpopulacional (e.g., Burg & Croxall, 2004). Representantes dessa família podem forragear ao longo de milhares de quilômetros em uma única semana (Weimerskirch *et al.*, 1994; 1997; Fernandez *et al.*, 2001; Pinaud & Weimerskirch, 2005), mas ainda exibem forte fidelidade com seu local de origem, reproduzindo-se em sua colônia natal (Harris 1973; Prince *et al.*, 1994; Weimerskirch *et al.*, 1997; Sagar *et al.*, 1998) o que indicaria que sua grande área de vida pode não ser um indicativo do padrão real de fluxo gênico e estrutura populacional. Este exemplo destaca o fato de que o uso de área de vida e a dispersão evoluem sob influência de forças diversas, muitas vezes opostas, incluindo heterogeneidade espacial e temporal de recursos, competição por parceiros e recursos, e seleção para evitar à endogamia – *inbreeding avoidance* (Clobert *et al.*, 2001).

As taxas de mutação parecem ser relativamente menores dentro do grupo das aves. Avise & Aquadro (1982) encontraram em torno de 1,95% de divergência entre sequências de citocromo *b* de espécies do mesmo gênero de aves, valor significativamente menor quando comparado com outros vertebrados, utilizando espécies congênicas (2,85% a 3,5%), o que leva a formular algumas hipóteses para explicar os valores observados. A hipótese mais utilizada é a de restrição funcional (*functional constraint*) em proteínas de aves (Avise & Aquadro, 1982), na qual as características fisiológicas das aves como maior temperatura corporal, e outras características relacionadas à concentração de CO₂ e pH do sangue, seriam muito exigentes em termos de mudanças, onde mutações não sinônimas, resultando em proteínas ligeiramente modificadas, reduziriam o fitness dos indivíduos afetados de forma muito mais proeminente nas aves do que em outros grupos de vertebrados. Esta menor tolerância à substituição de aminoácidos em proteínas de aves implicaria em taxas de evolução molecular ocorrendo de forma mais lenta para aves em relação a outros vertebrados, principalmente quando comparados aos mamíferos, onde a proporção entre substituições não sinônimas e sinônimas no citocromo *b* de aves é significativamente menor do que no citocromo *b* de mamíferos (Stanley & Harrison, 1999; Johns & Avise, 1998).

Essas menores taxas de substituição também poderiam ser explicadas pelo efeito Hill-Robertson onde em aves o cromossomo W e o genoma mitocondrial são transmitidos maternalmente, assim, o efeito de seleção sobre o cromossomo W poderia influenciar a variabilidade do mtDNA (Berlin *et al.*, 2007). Min & Hickey (2008) propuseram outra explicação, onde a mitocôndria das aves produz menos espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) causando menos danos ao DNA, e em grande parte explicando também a maior longevidade das aves em comparação com os mamíferos. Nabholz *et al.* (2009) sugerem que a evolução do mtDNA em aves é principalmente regulada por seleção purificadora, e que a menor diversidade mitocondrial em aves não é encontrada em alozimas nucleares dentro da classe. Bazin *et al.* (2006) revelam ainda que utilizando dados de mtDNA a diversidade de uma determinada espécie não reflete o tamanho da população, não havendo correlação entre polimorfismo no mtDNA e abundância das espécies e que em contraste, dados de DNA nuclear são bastante consistentes para tal inferência. Tais conclusões indicam que o mtDNA em aves seria uma ferramenta menos poderosa para a identificação de estrutura genética e tempo de divergência quando comparado com a utilização desse mesmo marcador em mamíferos ou outros vertebrados.

2. OBJETIVOS

Avaliar a estruturação genética de populações de *Fregata magnificens* presentes oceano atlântico ocidental a fim de ter um melhor entendimento das questões filogeográficas e da biologia evolutiva dessa espécie.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a estrutura genética presente entre populações utilizando sequências de segmentos de genes mitocondriais.
- Caracterizar a estrutura genética presente entre populações usando locos de microssatélites específicos para o gênero *Fregata*.
- Estimar o tempo de separação entre as populações, inferindo na história evolutiva e padrões filogeográficos populacionais.
- Estimar o fluxo de migrantes comparando com as questões biogeográficas e capacidade dispersiva da espécie.
- Estimar o número efetivo das populações a fim de obter uma melhor compreensão dos padrões de estruturação e variabilidade genética da espécie.

3. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

**GENETIC STRUCTURE OF FREGATA MAGNIFICENS (AVES,
SULIFORMES) OFF BRAZIL AND ITS RELATIONSHIP WITH CARIBBEAN
POPULATIONS**

ANDRESSA NUSS, CAIO J. CARLOS, IGNACIO B. MORENO, NELSON J.R.
FAGUNDES

Manuscrito em preparação a ser submetido à revista “PLOS ONE”

Population genetic structure of *Fregata magnificens* (Aves, Suliformes) off Brazil and its relationship with Caribbean populations

Nuss, Andressa¹; Carlos, Caio J.²; Moreno, Ignacio B.²; Fagundes, Nelson J.R.^{1*}

¹Departament of Genetics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departament of Zoology, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Key-words: Seabirds, *CytB*, *ND2*, microsatellites, phylogeography

*Corresponding Author

Nelson J.R. Fagundes,

Departamento de Genética – UFRGS

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

nelson.fagundes@ufrgs.br

Abstract

Fregata magnificens has a pantropical distribution, nesting on islands in the Atlantic and Pacific coast. They are extremely adapted for flying using the narrow thermals, and juveniles may disperse over long distances. In the Caribbean, there is little genetic structure among nesting colonies, but the genetic structure in colonies off Brazil and the the relationship of these populations with those in the Caribbean is unknown. In this study, we used mtDNA and microsatellite markers to characterize the pattern of genetic diversity and infer evolutionary history in a sample of *F. magnificens* individuals collected in Brazil, Grand Connétable, in French Guyana, and Barbuda. Virtually all Brazilian individuals had the same mtDNA haplotype. There was no haplotype sharing between Brazil and the Caribbean, while Grand Connetable shared haplotypes with both regions. A Bayesian clustering analysis using microsatellite data found $K=2$ genetic ancestry clusters. One associated with Barbuda, and the other with the Brazilian populations. Grand Connétable was more similar to Barbuda, but had significant values for both clusters, corroborating its “intermediate” position. Caribbean and Grand Connétable had higher genetic diversity and effective population size compared to Brazil, suggesting that the Brazilian coast may have been recently settled from individuals coming north. Divergence time estimates suggest that an ancestral population split around 3,000 years ago into a “Northern” (Barbuda + Grand Connétable) and Brazilian sub-populations. Overall, our results are in good agreement with an effect of marine winds and currents isolating the Brazilian meta-population due to the split of the South Equatorial Current in a southern (Brazil Current) and a northwest (Guiana Current) streams. In addition, the interplay between the tropical Brazil Current and the cold Falklands Current, whose influence over Brazilian coast change seasonally, may explain some of the patterns observed for the Brazilian populations.

Introduction

Fregata magnificens (Mathews, 1914) or magnificent frigatebird is part of small family with a single genus that has a reproductive pantropical distribution, breeding on islands in Atlantic and Pacific coasts. Reproductive colonies occur in the Pacific Ocean (Mexico, Panama, and Galapagos Islands), in the North Atlantic Ocean (Cabo Verde Islands), in the Atlantic Ocean Caribbean gulf (USA [Florida], Mexico, Costa Rica, Panama, Colombia, Ecuador, Venezuela, Trinidad and Tobago, Haiti, Dominican Republic, Puerto Rico, Aruba, Curacao, Barbados, Martinique, Bonaire, and French Guiana), and in the Southern Atlantic Ocean off Brazil [Fernando de Noronha, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná and Santa Catarina] (Del Hoyo *et al.*, 1992; Sick, 1997; Nelson, 2005).

Frigatebirds (genus *Fregata*) are extremely adapted for flying day and night for prolonged periods using the narrow thermals between the sea surface and the trade winds above the clouds, and are considered one of the most effective bird flyers (Pennycuick, 1983, 1987). Bone mass constitute only 5% of their body weight (Del Hoyo *et al.*, 2005), thus resulting in one of the lowest wing loading (ratio between total mass and wing surface) among all birds (Pennycuick, 1983). These birds are an example of extreme adaptations to poorly provisioned tropical waters, as this allows covering a large area around the breeding colony for foraging (Weimerskirch *et al.*, 2003). As soon as they leave the nest, juveniles often disperse over long distances (> 1,000 km), making use of the systems of ocean winds and/or being transported by storms (Murphy, 1936; Del Hoyo *et al.*, 1992; Nelson, 2005). Such high dispersal abilities would therefore maintain gene flow between populations, at least within the same ocean (Murphy, 1936; Bourne, 1955). However, in pelagic seabirds there is an apparent paradox between high dispersal ability and reluctance to disperse, raising a number of questions regarding the evolution of dispersal in the marine realm (e.g. Coulson, 2002; Matthiopoulos *et al.*, 2005; Friesen *et al.*, 2007). In marine organisms, even in those of great mobility such as seabirds and cetaceans, gene flow may be favored or limited by characteristics of temperature, salinity and nutrient concentration associated with water masses (Baumgartner *et al.*, 2001; Schreiber & Burger, 2002).

A previous study with *F. magnificens* in several breeding colonies of the Pacific and central Atlantic Ocean indicated, using mitochondrial (mtDNA), nuclear and microsatellite markers (SSR), that there is a extensive gene flow among populations

(except for the Galapagos population with large genetic divergence), and the haplotype diversity was low compared to terrestrial birds (Hailer *et al.*, 2010). However, South Atlantic breeding colonies were not included, and therefore, the genetic connection between the Caribbean and Southern Atlantic populations are unknown. Populations for *F. magnificens* are declining and listed as high concern in the North American Waterbird Conservation Plan (Kushlan *et al.*, 2002). Thus, knowledge about population structure in this species across its whole distribution is fundamental for planning conservation strategies. The aim of this study is to characterize a set of mtDNA and SSR markers in breeding colonies off South America and in the Caribbean to better understand the pattern and level of genetic structure in this species across different oceanic basins. This, in turn, may help contribute to the knowledge about the evolutionary processes responsible for diversification in the tropical oceanic fauna.

Material and Methods

Samples and laboratory analyses

Overall, we collected 156 individuals from eight different population in the Atlantic, including one population in the Caribbean (Barbuda), one in Northern South America (Grand Connétable, French Guiana), and six along the eastern Brazilian coast (Abrolhos, Cabo Frio, Cagarras, Alcatrazes, Currais, Moleques do Sul) (Figure 1). We used several different strategies to obtain DNA, and, therefore, sampled different tissues, including fresh tissue from embryos; muscles, paw scales and nails from carcasses; blood via brachial venipuncture; or collected using filter paper; feather tips from both old and recently collected feathers. Chicks comprised 77% of our sample and are presumably unrelated at least concerning the current generation. Excepted for filter paper and feathers, all other samples were stored in absolute alcohol.

DNA was extracted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit – Invitrogen, or the Quick-gDNA MiniPrep - Zymo Research. We also extracted DNA following two standard protocols based on proteinase K digestion followed by salting-out (adapted from Medrano *et al.*, 1990) or CTAB digestion and phenol:chloroform purification (adapted from Doyle & Doyle, 1987). We tested different methods for each kind of samples and some samples were extracted more than once time with several protocols to obtain high quality DNA. All samples was quantified using Picodrop and diluted to 40ng/ul for use.

We tested for genetic structure in *F. magnificens* populations using both mtDNA and microsatellite (STR) markers. For mtDNA, we amplified fragments of two mitochondrial genes: NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2), and cytochrome b (cytb), using primers described previously (Sorenson *et al.*, 1999; Hailer *et al.*, 2010 for ND2; Pook *et al.*, 2000 for cytb). PCR conditions were the same for the two mitochondrial segments, and began with 10 cycles (Touchdown) of 94°C for 60s, 60-51°C for 60s, 72°C for 60s; this was followed by 35 cycles of 94°C for 60s, 55°C for 60s, 72°C for 60s and final extension of 72°C for 10min. The amplified products were checked in 1% agarose gel, purified enzymatically with shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I (GE Healthcare) and Sanger sequenced by Macrogen Inc., South Korea.

We selected eight STR loci (Fmin02, Fmin11, Fmin12, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17 and Fmin18 in Dearborn *et al.*, 2008) that were developed for the great frigatebird, *F. minor*, and that were shown to exhibit consistent amplification and polymorphism in *F. magnificens* (Hailer *et al.*, 2010). Every forward primer was 5'-tailed with an M13 sequence (5'- CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), and used in combination with an M13 primer that had the same sequence but was dye-labeled on its 5' (Boutin-Ganache *et al.*, 2001). The PCR reactions were performed individually for each locus in 10ul reactions containing 1ul of diluted DNA, 1x PCR Buffer (Invitrogen), 2.5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,4uM of the reverse and M13-fluorescent primers, 0.05 uM of the M13-tailed forward primer, and 0.1 unit of Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen). The cycling parameters were: 94°C for 5 min; 10 touchdown cycles in which annealing temperature varied between 65°-60°; 94°C, 45 s 60°C, 45s and 72°C, 45s at 35 cycles and one final cycle for 15 min at 72°C. Following amplification, PCR products were diluted and different loci were pooled together based on the expected size range and fluorescent dye. Genotyping was performed in a MegaBACE 1000 automated sequencer (GE Healthcare) following manufacturer's protocols.

Data Analysis

Mitochondrial DNA analyses

Individual DNA sequences were assembled in Geneious v.5.4.4 (Drummond *et al.*, 2011), and sequences from the two markers were concatenated. We also used 218 sequenced from Hailer *et al.*, (2010) from populations sampled in the Atlantic (Caribbean) and Pacific Ocean. All sequences were aligned and checked by eye in Bioedit v. 7.1.11

(Hall, 1999). Evolutionary relationships among haplotypes were represented using a median joining network (Bandelt *et al.*, 1999), estimated in the program Network v.4.6 (www.fluxus-engineering.com).

We used the program Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) to estimate standard genetic diversity indices, including Tajima's D (Tajima, 1989) and Fu's F_S (Fu, 1997) neutrality tests. This program was also used to quantify the level of genetic structure using F-statistics, using both pairwise colony comparisons and a hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA) based on oceanic features: Galapagos; Panama (Isla Iguana – Pacific Ocean); Caribbean (Barbuda, Dry Tortuga, Bahamas, British Virgin Islands, Belize HC, Belize MW, Jamaica, Little Cayman) and French Guiana (Grand Connétable); and Brazil (Abrolhos, Alcatrazes, Cabo Frio, Cagarras, Currais, Moleques do Sul). All genetic structure values were calculated using both traditional (F_{ST}) or distance-based (Φ_{ST}) F-statistics and 1,000 permutations to assess statistical significance.

Microsatellite DNA analysis

Microsatellite genotyping was performed using the software Genetic Profiler v.2.2 (GE Healthcare). All genotypes that could not be called with certainty were repeated based on an independent PCR. We used the program Micro-checker v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) to test for null alleles and evidences for genotype miscalling in specific loci. We conducted Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and Linkage Disequilibrium (LD) tests in programs Genepop (Rousset, 2008) and Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010), respectively, adjusting for multiple tests using the Bonferroni correction. Whenever microchecker suggested genotyping problems all genotypes were thoroughly reviewed. We also used Arlequin 3.5 for estimating observed and expected heterozygosity. We estimate a measure of inbreeding, F_{IS} , and several genetic diversity estimates such as number of alleles, allelic richness and gene diversity in the program FSTAT (Goudet, 2001).

To quantify genetic structure using STR markers we estimated pairwise F_{ST} and R_{ST} values in Arlequin 3.5 with 1,000 permutations to assess statistical significance. Because we did not have STR genotypes for the Caribbean and Pacific populations studied by Hailer *et al.* (2010), we used AMOVA to compare two groups: one consisting of Barbuda and Grand Connétable, and the other containing all populations off Brazilian coast. We also evaluated genetic clustering using the Bayesian method implemented in STRUCTURE v.2.3.3 (Falush *et al.*, 2003). The most probable number of genetic clusters,

K, was determined based on the probability of data conditioned on K, as suggested by (Falush *et al.*, 2003) and as described in Evanno *et al.* (2005) based on ΔK . We performed five runs for every K (from K=1 to K=5) using sampled populations as locprior, the admixture model with correlated allele frequencies, and a burnin of 20,000 steps with 200,000 further steps in the Markov chain Monte Carlo (MCMC). We also performed shorter runs using different settings (no-admixture model, or without locprior) to evaluate the importance of model choice. Anyway, in all cases these were consistent with the results obtained using locprior and the admixture model. The strength of recent migration among populations was estimated using BayesAss v.1.3 (Wilson & Rannala, 2003), which evaluates gene flow using a model that does not assume migration-drift equilibrium. We ran independent replicates to check for consistency using 500,000 steps as burnin followed by 50,000,000 further MCMC steps sampling every 1,000 steps, with initial values for allele frequencies, migration rates and inbreeding adjusted for adequate mixing among chains. Migration was considered statistically significant whenever the 95% lower bound for the estimate (considering $1.96 \times \text{SD}$ [standard deviation]) was larger than zero. Population size estimates for each population individually were obtained using the STR markers in the program Lamarc (Kuhner, 2006). We used the likelihood criterion, and a search strategy based two replicates consisting of 20 short chains of 5,000 steps and 2 long chains of 500,000 steps. Historical demographic parameters, including an estimate of the divergence time between Brazil and Caribbean plus French Guiana as estimated under the basic Isolation with Migration (IM) model (Takahata & Slatkin, 1990; Wakeley & Hey, 1998; Nielsen & Wakeley, 2001), in the program IM (Hey & Nielsen, 2004) considering constant population size for the daughter populations. For the IM estimates we used both mtDNA and STR markers, and assumed mutation rates of 2.0×10^{-8} /site/year for mtDNA (e.g. Garcia-Moreno, 2004) and 0.0002/locus/year (0.0001 - 0.0004) for STRs assembled from several studies (Ortego *et al.*, 2008; Brohede *et al.*, 2004; Masters *et al.*, 2011). For the IM analysis we ran 30 chains with heating (0.9 for both heating parameters), taking 3.4 million samples after a burn-in of 2.0 hours. Sufficiency of the sampling was evaluated by monitoring effective sample size. An alternative run with different heating scheme was used to confirm the results (data not shown). We used 15 years the generation time based on estimates of survival and sexual maturity for frigatebirds (BirdLife International, 2014).

Results

Mitochondrial DNA data

Considering both mtDNA genes sequenced in in this study, we analyzed 1227 bp and found 26 variable sites. Total number of haplotypes was 22 and the haplotype diversity for the whole sample was 0.726 (SD 0.022). Detailed information about haplotype composition for each population is shown in Table S1. The Median-Joining haplotype network is shown in Figure 2. Noteworthy, Caribbean population had higher diversity when compared to the Brazilian sample. All Brazilian individuals (n=41), had the same haplotype (H1), except for a single individual from the Abrolhos population who had H4. Some individuals from Grand Connétable, in Northern South America, also exhibited H1 indicating possible gene flow, or shared ancient polymorphism. The other haplotypes found in the Grand Connétable population (H2 and H3) were shared with populations from the Caribbean. The Barbuda population, in the Caribbean also had these same haplotypes, with H3 being the most common over all populations, including Isla Iguana, in the Pacific Ocean off Panamá.

Hierarchical AMOVA considering Φ -statistics and four groups (Galapagos; Pacific Ocean; Caribbean and French Guiana; Brazil) resulted in overall high levels of genetic structure among groups, while traditional F-statistics resulted in smaller values (Table 1). Because the Φ -statistics take into account mutational distance and the Galapagos population have highly divergent haplotypes we performed AMOVA with three groups excluding the Galapagos population. Results were very similar (Table 1), possibly reflecting the low haplotype sharing between Brazil and the other groups. Table 2 shows pairwise values Φ_{ST} and F_{ST} among populations. As expected, the Brazilian populations are not significantly different among each other. Overall, different Caribbean populations also do not show statistically significant genetic structure among each other or compared to Isla Iguana. On the other hand, the Grand Connétable population exhibited significant differentiation from some population from Brazilian and the Caribbean, in agreement to its haplotype composition.

Microsatellite loci data

All loci were in linkage equilibrium and in HWE, except Fmin17, that showed statistically significant homozygote excess. Because all loci had some level of homozygote excess (which could be an indication of inbreeding), and because Fmin17 genotyping

showed chromatograms of good quality we decided to maintain this locus in the main dataset while testing if this could affect our results and conclusions. Table 3 summarizes genetic diversity for STR loci over studied populations considering all loci (see Table S2 for the results excluding locus Fmin17). We found between 5 and 23 alleles per locus. Allelic richness, number of alleles, and observed and expected heterozygosity were highest in Barbuda, followed by Grand Connétable and then by the Brazilian populations. Considering all loci, F_{IS} values were distributed between 0.039 (Abrolhos) and 0.231 (Moleques do Sul) (Table 2). As expected, excluding Fmin17 results in lower values, even though Abrolhos and Moleques do Sul populations still showing the lowest and highest values (-0.028 and 0.155), respectively (Table S2).

Measures of genetic structure between Brazilian populations vs. Barbuda (Caribbean) + Grand Connétable (French Guiana) were small and similar using either R-statistics or F-statistics, resulting in an “among group” component of 3.21% and 6.43%, respectively. The “among populations within group” component was of 3.54% and 2.51%, while the “within population” component estimates were of 93.31% and 91.05%. Pairwise R_{ST} and F_{ST} for the STR dataset are shown in Table 4. In general there was evidence of significant structure between Barbuda and most Brazilian populations, and between Grand Connétable and a few Brazilian populations. Interestingly, there was also a few significant though small values among Brazilian populations. As before, excluding loci Fmin17 did not result in significant change in these results. In the AMOVA analysis, the “among group” values were 2.77% and 5.78% for R-statistics and F-statistics, respectively, while in the pairwise matrix, ten out of 14 values remained significant (Table S3).

Despite these low genetic structure values, the Bayesian clustering analysis performed in STRUCTURE found $K=2$ as the best number of genetic populations supported by STR data. Posterior probability of data conditioned on $K=2$ was ~ 1.0 , while for $K=3$, the second best K -value, posterior probability was of 5.6×10^{-33} . The ΔK approach also supported two genetic clusters (Figure S1) Figure 3 shows individual probabilities of assignment for each K . One genetic cluster is clearly associated with Barbuda, and the other is associated with the Brazilian populations. Grand Connétable had a higher component of the first cluster, but also showed a significant portion of the second cluster. On the other hand, Abrolhos, the Northernmost Brazilian population analyzed in this study, had a major component in the second cluster while still maintaining some

association in the first cluster. Again, these results are robust to the exclusion of locus Fmin17 from the analysis (Figure S2).

Estimates of recent migration based on Bayesian population assignment showed that there are migratory connections from Moleques do Sul to all other Brazilian populations except Abrolhos, from Abrolhos to all other Brazilian populations, except Moleques do Sul, and also from Abrolhos to Grand Connétable (Table S4). Interestingly we did not detect migration between Caribe and French Guiana, and all inferred migrations were unidirectional. Estimates of the effective population size (N_E) in Lamarc showed a clear distinction between Barbuda and Grand Connétable, on the one hand, with larger numbers, and the Brazilian populations on the other hand, with lower and similar values (Table 5). Based on the STRUCTURE results, we used IM to estimate the divergence between Brazilian populations, on one hand, and Barbuda plus Grand Connétable on the other hand. IM estimates for population sizes were roughly similar with those suggested in Lamarc (Table 5), with low migration and a recent divergence time of ~2,800 years (1,704 – 120,381 years) between these meta-populations. The posterior density of all parameters is shown in Figure S3-S6. The effective population size of the ancestral population had a wide credible interval (Figure S4), but it is clearly more similar to that from Barbuda and Grand Connétable than to the small population size estimated for Brazil. Divergence time estimates also had wide credible interval, but most of the density is clearly associated with recent time estimates, with a long tail associated with larger values (Figure S6).

Discussion

Overall genetic structure in the Occidental Atlantic Ocean

Friesen et al (2007), in an extensive review of several seabird taxa found a vast array of results, varying from virtual panmixia (e.g. Grey-headed Albatross) to genetic structure in the absence of obvious barriers to gene flow (e.g. Galapagos petrel and Xantu's murrelet). However, most species had detectable genetic structure, especially those whose distributions were fragmented by land or ice. Some results indicate that geographic distance may promote population differentiation in seabirds, depending on ecological and historical differences like widespread breeding distribution and population-specific nonbreeding seasons. For example, different patterns of genetic structure in closely related species was also reported by Abbot & Double (2003), who found no genetic structure among

populations of the White-capped Albatross (*Thalassarche steadi*), but found significant structure among populations of the Shy Albatross (*T. cauta*).

In agreement with Hailer et al. (2010), our results show virtually no genetic structure within the Caribbean (Table 2, Figure 2), including Isla Iguana, in the Pacific Ocean off Panama. Gene flow may be facilitated among Caribbean populations by peculiarities of the region seascape. High gene flow in the Caribbean Sea also seems happen for other species (e.g. Gibbons, 1997; Joyeux *et al.*, 2001). Conversely, there is no haplotype sharing between Brazilian and Caribbean populations (Figure 2, Table S1), indicating, at least based on mtDNA, that these populations are effectively isolated. A key population seems to be Grand Connétable in French Guiana; it shares mtDNA haplotypes with both the Caribbean and Brazil populations, and therefore, may serve as a genetic stepping-stone between these two distinct areas. González-Jaramillo & Rocha-Olivares (2011) studied *F. magnificens* breeding colonies off Mexico and found high genetic differentiation between Pacific and Caribbean *F. magnificens* populations using mtDNA control region data, consistent with ecological data on Mexican frigatebirds, indicating a strong reproductive philopatry. Interestingly, they found no significant genetic structure among Mexican populations, similarly to our results for the Brazilian populations. We also found a clear distinction between the level of mtDNA genetic variation in the Caribbean and in Brazil (Figure 2). For instance, the only Caribbean population sampled by us (Barbuda) had more mtDNA haplotypes than all Brazilian population considered together (Table S1). Because the islands in the Caribbean are geographically close, a seabird species with wide capacity for foraging such as the magnificent frigatebird can easily cover distances between one island and another in a single day, and dispersal may occur in many directions, once the islands are arranged in a circular shape. In Brazilian coast, on the other hand, low genetic structure among populations may be maintained in a stepping stone model as the islands occur are linearly distribute off the coast.

Results based on the SSR markers corroborate these inferences. There is a general low level of genetic structure even between Barbuda and the Brazilian populations (Table 3, Table S3). Nonetheless, the strongest genetic structure detected in our data separates Barbuda from the Brazilian populations, reinforcing the “intermediate” nature of the Grand Connétable population (Figure 3). Concerning the inference of recent migratory connections estimated in BayesAss (Table S4), even though the small values for genetic structure in our dataset reduce the statistical power to detect migration in fine scale, our

analysis was able to detect two major migratory patterns. The first connects Moleques do Sul, the southernmost Brazilian population to all other Brazilian populations except the northernmost Brazilian population, Abrolhos. The other connects Abrolhos to Grand Connétable and to all other Brazilian populations except Moleques do Sul. These connections are in agreement with the results from the STRUCTURE analysis, even though we did not detect a direct migratory connection between Barbuda and any other population, which may be due to the fact that we only had SSR data for one population from the Caribbean.

A study with brown boobies (*Sula leucogaster*) in Atlantic South coast, a species whose distribution is similar to *F. magnificens*, found low genetic variation and low genetic structure, which could be explained by a recent bottleneck or founder effect, and/or because of natal philopatry (Baumgarten *et al.*, 2001). In contrast, Morris-Pocock (2012) found high genetic structure in brown boobies in Pacific and Indic Ocean global population, with Φ_{ST} values as high as 0.86, suggesting that the low structure in Brazil may be associated with a different colonization history in this region rather than a general lack of dispersal for this species. Finally, another study in a different South Atlantic species occurring off Brazil, *Sterna hirundinacea*, found low genetic structure for both mtDNA (F_{ST} between 0.0005 and 0.0184), and microsatellites (F_{ST} between -0.0038 and 0.0938), corroborating a general low genetic structure among coastal Brazilian seabird populations (Faria *et al.*, 2010).

Overall, our data is compatible with a strong role of marine winds and currents in shaping the major patterns of genetic structure (Figure 1). The strong genetic structure between Brazil vs. Caribbean + Grand Connétable may be associated with an effect of the South Equatorial Current that bifurcates in two branches as it comes closer to the Brazilian coast. The stronger branch flows to the northwest forming the Guiana Current, or the North Brazil Current, (Silveira *et al.*, 1994), while the weaker branch flows to the south, giving rise to the Brazil Current (Silveira *et al.*, 2000). In this case, individuals from Northern Brazilian populations may find thermals flowing northeast and reach the Guiana sporadically. The reverse movement (against the predominant winds associated with the oceanic currents) should be less frequent, but may happen. For example, Weimerskirch *et al.* (2006) found that two individuals that bred in a colony off French Guiana moved west along the coast of South America, with one of them moving as far as Trinidad, 1400 km away from its natal colony. The fact that we only detected unidirectional migration may be

a consequence of a relative small power to detect genetic structure associated with a stronger influence of dispersal in favor of the major oceanic currents. A recent study of genetic structure in the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) also found that currents may be the major driver of genetic structure for some marine organisms (Proietti *et al.*, 2014). These currents have an important function regulating species distribution (Briggs, 1974).

Migratory connections among Brazilian populations may also be explained by the relative importance of the wind regime associated with the Brazil Current and the Falklands Current. The Brazil Current flows south along the Brazilian coast as far as ~38°S, where it converges with the colder and less saline waters of the Falklands Current, which is an intense flow directed to the north originated from the Antarctic Circumpolar Current (Tomczak & Godfrey, 1993). During the austral winter, the Falklands Current is stronger and extends progressively to the north, under the influence of strong southerly winds. Shifts the Brazil Current northwards reaching as far as the coast of Rio de Janeiro. During the austral summer, the opposite trend occurs and backed up by winds from the northeast, the Brazil Current again dominates the coastal circulation (Castello & Moeller, 1977; Campos *et al.*, 1996, Silveira *et al.*, 2000). Thus, the relative importance of coastal winds may be associated with the findings of Moleques do Sul sending migrants for all populations except Abrolhos and vice-versa. This may also explain why Moleques do Sul shows the highest F_{IS} estimates (Table 3, Table S2).

Marine biogeography and demographic scenarios

For both mtDNA and SSR loci populations found in the Caribbean and in Grand Connétable have more genetic diversity when compared to Brazilian populations (Figure 2; Table 2; Table S2). This is reflected in the estimates of effective population size, which results in smaller values for the Brazilian populations when compared to the former group (Table 4). A historical inference compatible with these observations is that the Brazilian coast was recently settled by magnificent frigatebird coming from the Northeastern Atlantic/Caribbean Sea region. Indeed, the mtDNA pattern relating the Caribbean and Brazilian populations is very similar to the one relating the populations from the Caribbean and the Galapagos Islands (Figure 2). In this case, an ancient dispersal, estimated by Hailer *et al.* (2010) by ~250,000 years ago would have led to the emergence of the Galapagos population, while a more recent dispersal event (~3,000 years ago) would be associated

with a colonization (or re-colonization) of the Brazilian coastal islands. An intriguing possibility is that the low genetic diversity in Brazilian populations of the brown boobie may indicate a common colonization history shared by these two species (Baumgarten *et al.*, 2001), given that frigatebirds are cleptoparasites of boobies. Interestingly, Palacio (1982) considered the Caribbean as a potential center of biodiversity, based on the early occurrence, for several taxonomic groups, of species in this region compared to its later appearance in adjacent geographic areas, including the Brazilian shoreline.

Dating biogeographic events in birds is complicated by the wide variation in mtDNA evolutionary rates (e.g. Pereira & Baker, 2006; Weir & Schuller, 2008; Nabholz *et al.*, 2009). The widely used 2% per million years rule, which we also used here, have received mixed support and despite most studies agree that an average rate falls around this general estimate it is very general and may lead to biased estimates (Garcia-Moreno, 2004; Lovette, 2004; Weir & Schuller, 2008). For example, the ~250,000 divergence estimate between frigatebird populations from the Galapagos Is. and the Caribbean was based only on mtDNA data. Variation in SSR rates may also complicate molecular divergence estimates based on these markers due to rate heterogeneity across different loci (Ortego *et al.*, 2008; Masters *et al.*, 2011). However, while in our study we used relatively simple mutation models, analyzing mtDNA and SSR markers jointly allows a better modelling of the true population history as more loci are added in the analysis (Felsenstein, 2006). Anyway, irrespective of the precise values, it is likely that the genetic divergence between the Caribbean (including populations sampled in the Pacific Ocean in Panama) and the Galapagos Is. predates the divergence between the former and Brazil. The ancestral effective population size of Brazil and the Caribbean is similar to the estimate of the current population size for this latest population (Table 4), what is compatible with this region playing the role of a historical “refuge” for population diversification across the Pleistocene in repeated “out of the Caribbean” dispersal episodes.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the institutions and people who generously provided or helped to collect the biological samples used in this study: Sarah Trefry, Beinoit de Thoisy, Larissa Cunha, Juliana Saviolli, Luis Augusto Ebert, Cesar Musso, Ricardo Krul, and Salvatore Siciliano. We also thank Fabrício R. Santos, Thales R. O.

Freitas, Eduardo Eizirik for comments on an earlier draft of the manuscript, and CNPq and PPGBM/UFRGS for financial support.

References

- Abbott CL and Double M C (2003) Genetic structure, conservation genetics and evidence of speciation by range expansion in shy and white-capped albatrosses. *Molecular Ecology* 12(11): 2953-2962.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Baumgarten MM, Kohlrausch AB, Miyaki CY, de Freitas TRO, de Araújo AM (2001) DNA fingerprinting and parentage in masked (*Sula dactylatra*) and brown (*S. leucogaster*) boobies. *Ornitol Neotrop* 12: 319-326.
- Baumgartner MF, Mullin KD, May LN, Leming TD (2001) Cetacean habitats in the northern Gulf of Mexico. *Fish B-NOAA* 99: 219-239.
- BirdLife International (2014) Species factsheet: *Fregata magnificens*. Accessed: <http://www.birdlife.org>. 25 january 2014.
- Bourne WRP (1955) The birds of Cape Verde Islands. *Ibis* 97:508–556.
- Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M, Deschepper CF (2001) M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele sizing methods. *BioTechniques* 31: 24-28.
- Briggs, J.C. (1974) *Marine zoogeography*. McGraw-Hill, New York.
- Brohede J, Møller AP, Ellegren H (2004) Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows. *Mutat Res Fund Mol Mech Mut* 545(1):73-80.
- Campos EJD, Lorenzetti JA, Stevenson MR, Stech JL, Souza RB (1996) Penetration of waters from Brazil–Malvinas confluence along South American continental shelf up to 23°S. *An Acad Bras Ci* 68: 49–58.
- Castello JP, Moller OO (1977) On the oceanographic conditions in the Rio Grande do Sul state. *Atlântica* 2: 25–110.
- Coulson JC (2002) Colonial breeding in seabirds. In: Schreiber EA, Burger J (eds) *Biology of Marine Birds* 87–113.

- Dearborn DC, Hailer F, Fleischer RC (2008) Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Mol Ecol* 8: 1399–1401.
- Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1992) Handbook of the birds of the World. Barcelona: Lynx Edicions 1, 696 p.
- Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (2005). Handbook of the birds of the World, Barcelona: Lynx Edicions 10, 895 p.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, et al.. (2011) Geneious v5.4. Available:<http://www.geneious.com/>.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.*Mol Ecol* 14(8): 2611-2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (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
- Falush D, Stephens M, Pritchard J (2003) Inference of population structure from multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- Faria PJ, Campos FP, Branco JO, Musso CM, Morgante JS *et al.* (2010). Population structure in the South American tern *Sterna hirundinacea* in the South Atlantic: two populations with distinct breeding phenologies. *Journal of avian biology*, 41(4): 378-387.
- Felsenstein J (2006) Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? *Mol Biol Evol*, 23(3):691-700
- Friesen VL, Burg TM, McCoy KD (2007) Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Mol Ecol* 16: 1765–1785.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

- Garcia-Moreno J. (2004). Is there a universal mtDNA clock for birds? *J Avian Biol* 465-468.
- Gibbons MJ (1997) Pelagic biogeography of the south Atlantic Ocean. *Mar Biol* 129(4): 757-768.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from: URL <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Accessed: 11 december 2013.
- Hailer F, Schreiber EA, Miller JM, Levin II, Parker PG, Chesser RT, Fleischer RC (2010) Long-term isolation of a highly mobile seabird on the Galapagos. *P Roy Soc Lond B Bio*: 278:817–825.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747–760.
- González-Jaramillo M, & Rocha-Olivares, A (2011) Barriers acting on the genetic structure of a highly aerial seabird: The magnificent frigatebird. *Biochemical Systematics and Ecology* 39(4): 392-396.
- Joyeux JC, Floeter SR, Ferreira CEL, Gasparini JL (2001) Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. *J Biogeogr* 28(7): 831-841.
- Kuhner M (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768–770.
- Kushlan JA, Steinkamp MJ, Parsons KC, Capp J, Acosta-Cruz *et al.* (2002) Waterbird Conservation for the Americas: The North American Waterbird Conservation Plan, Version 1. Waterbird Conservation for the Americas, Washington, DC, U.S.A.
- Lovette I J (2004) Mitochondrial dating and mixed support for the “2% rule” in birds. *The Auk*, 121(1):1-6.
- Masters BS, Johnson LS, Johnson BG, Brubaker JL, Sakaluk SK, *et al.* (2011) Evidence for heterozygote instability in microsatellite loci in house wrens. *Biol lett* 7(1):127-130.

- Matthiopoulos J, Harwood J, Thomas L (2005) Metapopulation consequences of site fidelity for colonially breeding mammals and birds. *J Anim Ecol* 74: 716–727.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8(1): 43.
- Morris-Pocock JA, (2012) Phylogeography of Brown and Red-footed Boobies: A Complex History of Isolation and Gene Flow. A thesis submitted to the Department of Biology to obtain the degree of Doctor of Philosophy in Queen's University Kingston, Ontario, Canada.
- Murphy RC (1936) Oceanic birds of South America. New York: Amer Mus Nat History 2: 1243 p.
- Nabholz B, Glémin S, Galtier N (2009) The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evol Biol* 9:54
- Nelson JB (2005) Pelicans, cormorants and their relatives: The Pelecaniformes. Oxford: Oxford University Press. 680 p.
- Nielsen R, Wakeley J (2001) Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, 158(2): 885-896.
- Ortego J, Aparicio JM, Cordero PJ, Calabuig G (2008) Characteristics of loci and individuals are associated with germline microsatellite mutation rates in lesser kestrels (*Falco naumanni*) *Mutat Res Fund Mol Mech Mut* 648(1):82-86.
- Palacio FJ (1982) Revisión zoogeográfica marina del sur del Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico*. 31(1): 69-92.
- Pennycuik CJ (1983) Thermal soaring compared in three dissimilar tropical bird species, *Fregata magnificens*, *Pelecanus occidentals* and *Coragyps atratus*. *J Exp Biol* 102(1): 307-325.
- Pennycuik CJ (1987) Flight of auks (Alcidae) and other northern seabirds compared with southern Procellariiformes: ornithodolite observations. *J Exp Biol* 128(1): 335-347.
- Pereira SL, Baker AJ (2006) A mitogenomics timescale for birds detects variable phylogenetic rates of molecular evolution and refutes the standard molecular clock. *Mol Biol Evol* 23: 1731–1740.

- Pook CE, Wuster W, Thorpe RS (2000) Historical biogeography of the western rattlesnake *Serpentes Viperidae (Crotalus viridis)*, inferred from mitochondrial DNA sequence information. *Mol Phylogenet Evol* 15(2): 269-282.
- Proietti MC, Reisser J, Marins LF, Rodriguez-Zarate C, Marcovaldi MA, *et al* (2014) Genetic Structure and Natal Origins of Immature Hawksbill Turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Brazilian Waters. *PLoS ONE* 9(2): e88746.
- Rousset F (2008) GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8: 103–106.
- Schreiber EA, Burger J (2002) *Biology of marine birds*. Boca Raton: CRC Press. 744 p.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. 862 p.
- Silveira ICA, Miranda LB, Brown WS (1994) On the origins of the North Brazil Current. *J Geophys Res* 99: 22501–22512.
- Silveira ICA, Schimidt ACK, Campos EJD, Godoi SS, Ikeda Y (2000) A Corrente do Brasil ao largo da costa brasileira. *Rev bras Oceanogr* 48: 171–183.
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP (1999) Primers for a PCR- based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol Phylogenet Evol* 12: 105–114.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- Takahata N, Slatkin M (1990) Genealogy of neutral genes in two partially isolated populations. *Theor Popul Biol* 38: 331–350.
- Tomczak M, Godfrey JS (1993) *Regional Oceanography: an Introduction*. Oxford: Pergamon Press. 422 p.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley PF (2004) MICROCHECKER. Micro-checker user guide. Hull: The University of Hull.
- Wakeley J, Hey J (1998) Testing speciation models with DNA sequence data. In: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution* (eds DeSalle R, Schierwater B): 157–175.
- Weimerskirch H, Chastel O, Barbaud C, Tostain O (2003) Flight performance: frigatebirds ride high on thermals. *Nature* 421(6921): 333-334.

- Weimerskirch H, Le Corre M, Marsac F, Barbraud C, Tostain O, et al. (2006) Postbreeding movements of frigatebirds tracked with satellite telemetry. *Condor* 108(1): 220–225.
- Weir JT, & Schluter D (2008) Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*, 17(10): 2321-2328
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163(3): 1177-1191.

Table 1. AMOVA Based on mtDNA data.

Level	Four groups ¹		Three groups ²	
	Φ -statistics	F-statistics	Φ -statistics	F-statistics
Among groups	0.831	0.488	0.737	0.440
Among populations within groups	0.027	0.042	0.039	0.042
Within populations	0.142	0.470	0.224	0.518

¹[Galapagos; Pacific; Caribbean; Brazil] ²[Pacific; Caribbean; Brazil]. See text for details.

Table 2. Pairwise F_{ST} (upper diagonal) and Φ_{ST} (lower diagonal) values for mtDNA data.

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1- Abrolhos		0.000	0.038	0.020	0.020	0.020	0.595	0.700	0.498	0.539	0.502	0.464	0.370	0.742	0.126	0.844	0.468
2- Alcatrazes	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.738	0.767	0.584	0.613	0.578	0.570	0.451	0.818	0.233	0.923	0.550
3- Currais	0.038	0.000		0.000	0.000	0.000	0.769	0.779	0.605	0.629	0.596	0.600	0.470	0.829	0.267	0.928	0.570
4- Moleques Do Sul	0.020	0.000	0.000		0.000	0.000	0.755	0.773	0.595	0.621	0.587	0.586	0.461	0.824	0.251	0.926	0.560
5- Cagarras	-0.024	0.000	0.000	0.000		0.000	0.719	0.761	0.571	0.604	0.568	0.552	0.439	0.812	0.213	0.920	0.538
6- Cabo Frio	-0.024	0.000	0.000	0.000	0.000		0.719	0.761	0.571	0.604	0.568	0.552	0.439	0.812	0.213	0.92	0.538
7- Barbuda	0.885	0.914	0.926	0.920	0.907	0.907		-0.040	-0.039	-0.050	-0.028	0.100	0.034	-0.025	0.207	0.771	-0.040
8- Bahamas	0.920	0.930	0.934	0.932	0.928	0.928	-0.010		0.064	0.021	0.057	0.265	0.165	-0.037	0.375	0.777	0.062
9- British Virgin Islands	0.856	0.868	0.876	0.872	0.863	0.863	-0.055	0.009		0.000	0.022	0.055	0.019	0.081	0.174	0.631	-0.018
10- Cayman	0.860	0.869	0.876	0.872	0.865	0.865	-0.012	0.007	-0.010		-0.021	0.071	0.053	0.031	0.238	0.646	0.010
11- Dry Tortuga	0.845	0.854	0.861	0.858	0.850	0.85	0.023	0.038	0.022	-0.018		0.049	0.046	0.068	0.223	0.616	0.024
12- Belize HC	0.857	0.874	0.885	0.880	0.867	0.867	0.084	0.190	0.045	0.035	0.026		0.003	0.289	0.182	0.636	0.082
13- Jamaica	0.785	0.791	0.801	0.797	0.786	0.786	-0.018	0.090	-0.001	0.059	0.091	0.051		0.179	0.125	0.498	0.030
14- Belize MW	0.940	0.954	0.957	0.956	0.953	0.953	0.024	-0.033	0.022	0.003	0.027	0.208	0.101		0.399	0.819	0.076
15- Grand Connétable	0.325	0.333	0.367	0.351	0.313	0.313	0.294	0.475	0.387	0.428	0.418	0.369	0.373	0.458		0.643	0.171
16- Galapagos	0.983	0.991	0.992	0.992	0.991	0.991	0.970	0.972	0.950	0.949	0.943	0.956	0.914	0.980	0.877		0.596
17- Isla Iguana	0.835	0.845	0.853	0.849	0.840	0.840	-0.047	0.030	-0.004	0.040	0.077	0.118	0.029	0.043	0.381	0.941	

Values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

Table 3. Genetic diversity values for STR data.

Population	N	N_A	AR	F_{IS}	H_O	H_E
Barbuda	29	8.13	5.219	0.102	0.630 ± 0.243	0.700 ± 0.231
Grand Connétable	37	7.13	4.681	0.131	0.583 ± 0.191	0.669 ± 0.247
Abrolhos	18	5.13	3.910	0.039	0.556 ± 0.288	0.578 ± 0.228
Cabo Frio	14	4.25	3.470	0.106	0.471 ± 0.238	0.524 ± 0.228
Cagarras	9	4.00	3.819	0.206	0.535 ± 0.242	0.581 ± 0.265
Alcatrazes	18	5.00	3.825	0.151	0.503 ± 0.233	0.591 ± 0.247
Currais	9	4.13	3.812	0.159	0.543 ± 0.270	0.560 ± 0.288
Moleques do Sul	22	4.88	3.595	0.231	0.415 ± 0.264	0.537 ± 0.248

N – sample size; N_A – Average number of alleles; AR – Allelic richness; H_O – Observed heterozigosity ± standard deviation; H_E – Expected heterozigosity ± standard deviation.

Table 4. Pairwise F_{ST} (upper diagonal) and R_{ST} (lower diagonal) values for STR data.

Population	1	2	3	4	5	6	7	8
1- Abrolhos		<0.001	0.001	<0.001	0.004	0.003	<0.001	<0.001
2- Cabo Frio	0.088		-0.004	-0.003	-0.001	-0.004	0.004	<0.001
3- Cagaras	0.001	<0.001		0.005	0.010	0.006	0.006	0.005
4- Alcatrazes	0.017	0.068	-0.020		0.004	0.003	0.001	-0.001
5- Currais	-0.039	<0.001	-0.020	0.022		0.004	0.003	0.003
6- Moleques do Sul	0.085	-0.021	0.019	0.072	0.066		0.003	0.002
7- Barbuda	0.036	0.138	0.040	0.063	0.005	0.159		<0.001
8- Grand Connétable	-0.021	0.060	-0.014	0.011	-0.059	0.084	0.017	

Values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

Table 5. Demographic estimates based on coalescent analysis

Population	N_E (95% CI)	m (95% CI)	T (95% CI)
Barbuda	1,021 (905 – 1,159)	-	-
Grand Connétable	906 (823 - 998)	-	-
Abrolhos	426 (371 – 491)	-	-
Cabo Frio	296 (243 – 365)	-	-
Cagarras	370 (299 – 464)	-	-
Alcatrazes	330 (283 – 390)	-	-
Currais	334 (267 – 425)	-	-
Moleques do Sul	360 (318 – 410)	-	-
Caribbean ¹	733 (449 – 1,158)	0.002 (0.001 – 0.009)	2,841
Brazil ²	128 (77 – 282)	0.005 (0.002 – 0.019)	(1,704 – 120,382)

1- Barbuda + Grand Connétable; 2 – All Brazilian populations; N_E – Effective population size; 95%CI – 95% Credible interval; m – migration rate backwards in time. T – Divergence time in years. All estimates assuming 15 years for generation time (see text for details).

Figure Legends

Figure 1. Map of sampled populations. 1- Barbuda; 2- Grand Connétable; 3- Abrolhos; 4- Cabo Frio; 5- Cagarras; 6- Alcatrazes; 7- Currais; 8- Moleques do Sul; Major oceanic currents discussed in the main text are shown. Currents shown in dark blue are associated with cold waters, while those in red are associated with warm waters.

Figure 2. Median-joining network of mtDNA haplotypes. Size of the circles are proportional to haplotype frequency in the sample.

Figure 3. Bayesian ancestry estimates for all individuals based on $K=2$ genetic clusters.



Figure 1

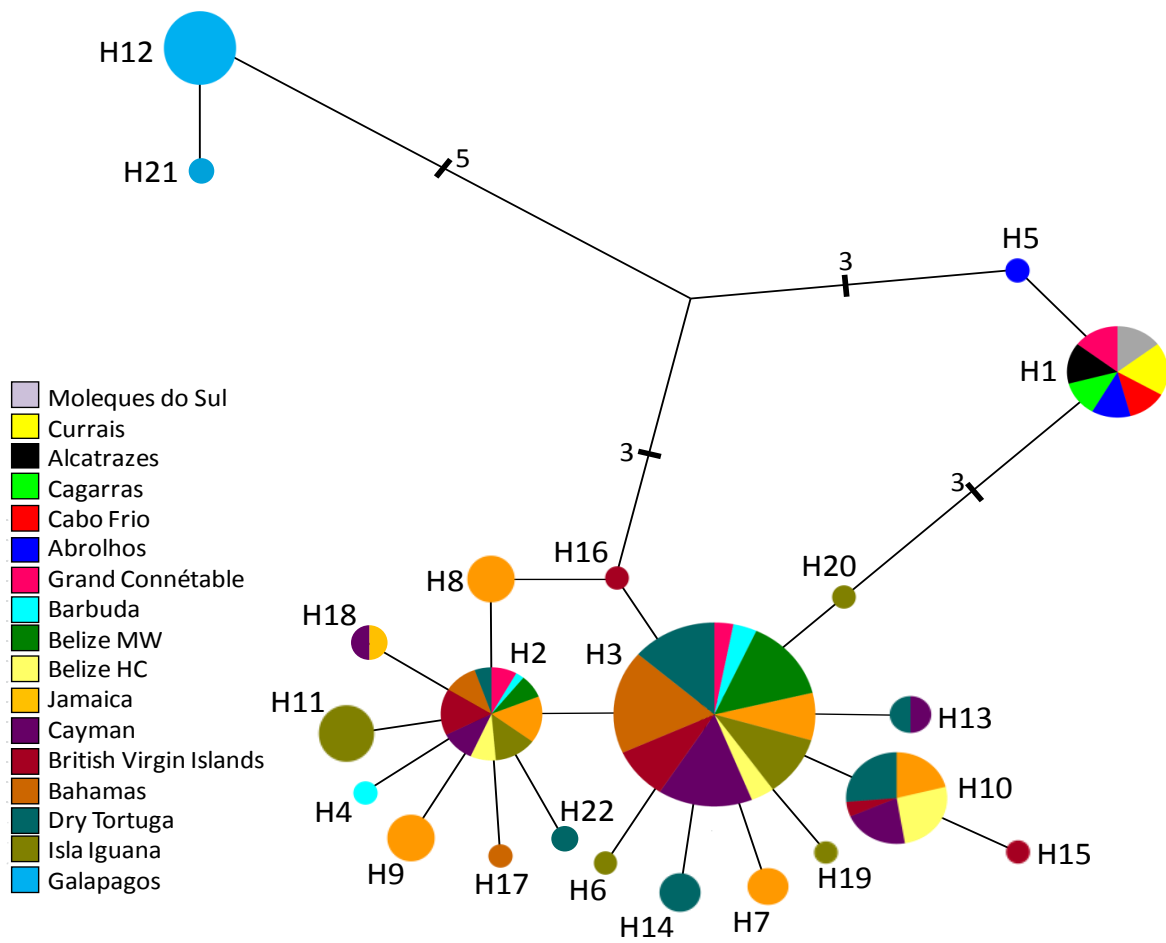


Figure 2

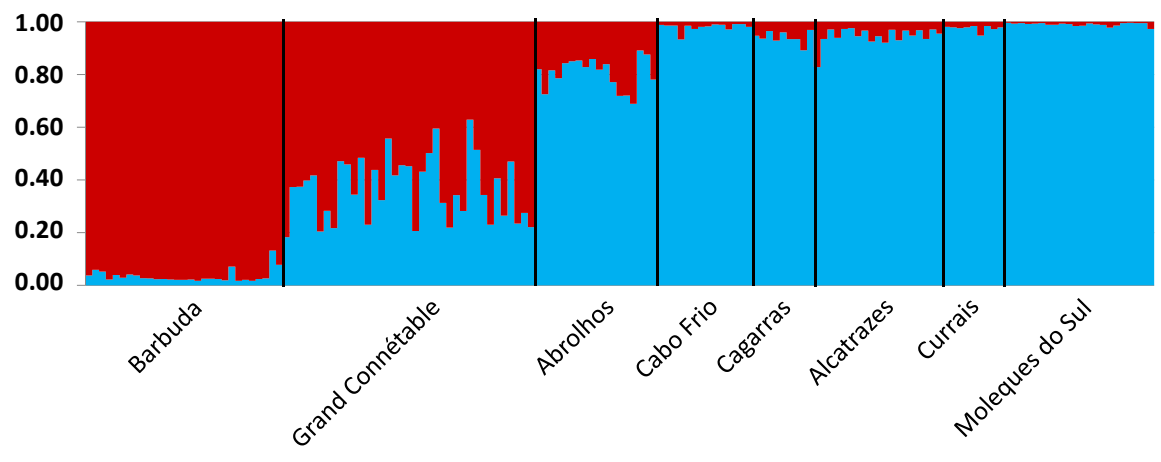


Figure 3

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Haplotype diversity and distribution in all sampled populations.

Population	N	Hd	H1	H2	H3	H4	H5
Barbuda	7	0.524 ± 0.209	0	1	5	1	1
Grand Connétable	14	0.670 ± 0.082	7	3	4	0	0
Abrolhos	7	0.286 ± 0.196	6	0	0	0	1
Cabo Frio	6	0.000	6	0	0	0	0
Cagarras	6	0.000	6	0	0	0	0
Alcatrazes	7	0.000	7	0	0	0	0
Currais	9	0.000	9	0	0	0	0
Moleques do Sul	8	0.000	8	0	0	0	0

N – sample size; Hd – Haplotype diversity ± standard deviation; H1 – H5 – mtDNA haplotypes (see text and Figure 2 for details).

Table S2. Genetic diversity values for STR data excluding locus Fmin17.

Population	N	N_A	AR	F_{IS}	H_O	H_E
Barbuda	29	8.57	5.381	0.048	0.677 ± 0.222	0.710 ± 0.248
Grand Connétable	37	7.43	4.760	0.112	0.589 ± 0.206	0.662 ± 0.266
Abrolhos	18	5.57	4.129	-0.028	0.628 ± 0.223	0.611 ± 0.224
Cabo Frio	14	4.29	3.447	0.002	0.499 ± 0.242	0.501 ± 0.235
Cagarras	9	4.14	3.936	0.116	0.600 ± 0.186	0.577 ± 0.286
Alcatrazes	18	5.14	3.833	0.094	0.520 ± 0.246	0.571 ± 0.261
Currais	9	4.14	3.821	0.076	0.592 ± 0.259	0.547 ± 0.309
Moleques do Sul	22	5.14	3.724	0.155	0.457 ± 0.255	0.538 ± 0.267

N – sample size; N_A – Average number of alleles; AR – Allelic richness; H_O – Observed heterozigosity ± standard deviation; H_E – Expected heterozigosity ± standard deviation.

Table S3. Pairwise F_{ST} (upper diagonal) and R_{ST} (lower diagonal) values for STR data excluding locus Fmin17.

Population	1	2	3	4	5	6	7	8
1- Abrolhos		<0.001	<0.001	<0.001	0.004	0.002	<0.001	<0.001
2- Cabo Frio	0.086		-0.007	-0.005	-0.004	-0.003	0.005	0.002
3- Cagarras	<0.001	<0.001		0.004	0.010	0.006	0.005	0.007
4- Alcatrazes	0.012	0.069	-0.020		0.004	0.001	<0.001	<0.001
5- Currais	-0.041	<0.001	-0.020	0.023		0.003	0.003	0.004
6- Moleques do Sul	0.084	-0.020	0.019	0.073	0.066		0.004	0.003
7- Barbuda	-0.004	0.124	0.021	0.049	-0.016	0.147		<0.001
8- Grand Connétable	-0.027	0.062	-0.013	0.012	-0.060	0.088	<0.001	

Values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

Table S4. Bayesian estimates for migration using BayesAss.

Population	1	2	3	4	5	6	7	8
1- Barbuda	0.8498 ± 0.0410	0.0638 ± 0.0373	0.0253 ± 0.0177	0.0093 ± 0.0090	0.0093 ± 0.0090	0.0096 ± 0.0096	0.0093 ± 0.0090	0.0236 ± 0.0179
2- Grand Connétable	0.0154 ± 0.0143	0.8322 ± 0.0360	0.0939 ± 0.0330	0.0076 ± 0.0074	0.0076 ± 0.0074	0.0079 ± 0.0080	0.0075 ± 0.0073	0.0279 ± 0.0190
3- Abrolhos	0.0130 ± 0.0124	0.0226 ± 0.0208	0.8713 ± 0.0397	0.0123 ± 0.0118	0.0122 ± 0.0117	0.0126 ± 0.0124	0.0124 ± 0.0119	0.0437 ± 0.0273
4- Cabo Frio	0.0152 ± 0.0144	0.0256 ± 0.0208	0.0819 ± 0.0347	0.6828 ± 0.0154	0.0152 ± 0.0144	0.0165 ± 0.0177	0.0152 ± 0.0145	0.1476 ± 0.0387
5- Cagarras	0.0193 ± 0.0183	0.0250 ± 0.0228	0.0883 ± 0.0387	0.0195 ± 0.0183	0.6879 ± 0.0197	0.0206 ± 0.0204	0.0196 ± 0.0184	0.1199 ± 0.0401
6- Alcatrazes	0.0125 ± 0.0120	0.0184 ± 0.0166	0.1216 ± 0.0332	0.0122 ± 0.0117	0.0122 ± 0.0118	0.6810 ± 0.0173	0.0121 ± 0.0116	0.1300 ± 0.0353
7- Currais	0.0196 ± 0.0184	0.0197 ± 0.0186	0.1060 ± 0.0390	0.0195 ± 0.0184	0.0196 ± 0.0185	0.0209 ± 0.0206	0.6877 ± 0.0196	0.1070 ± 0.0399
8- Moleques do Sul	0.0122 ± 0.0117	0.0126 ± 0.0121	0.0388 0.0234	0.0104 ± 0.0102	0.0104 ± 0.0101	0.0118 ± 0.0149	0.0104 ± 0.0102	0.8933 ± 0.0327

For each cell, $m[i][j]$ is the fraction of individuals in population i that are migrants derived from population j (per generation). Values are presented as (estimate ± standard deviation). Values in bold are statistically significant considering an interval of $1.96 \times \text{SD}$ (see main text for details).

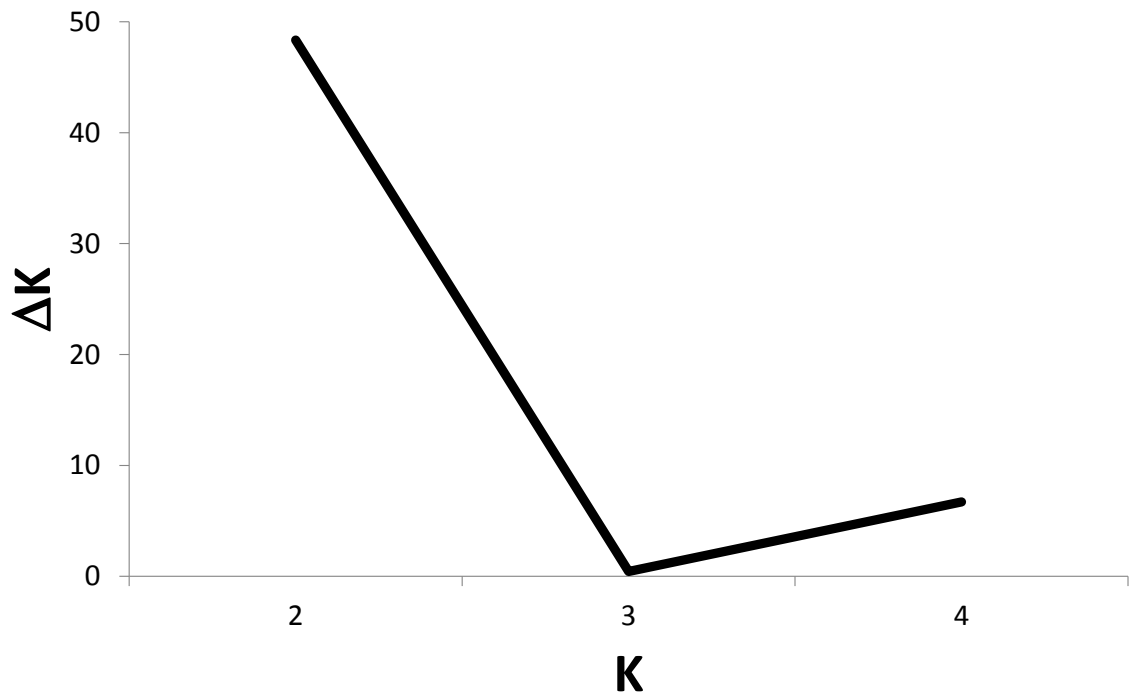


Figure S1. ΔK estimate of the best number of genetic clusters in Structure (see text for details).

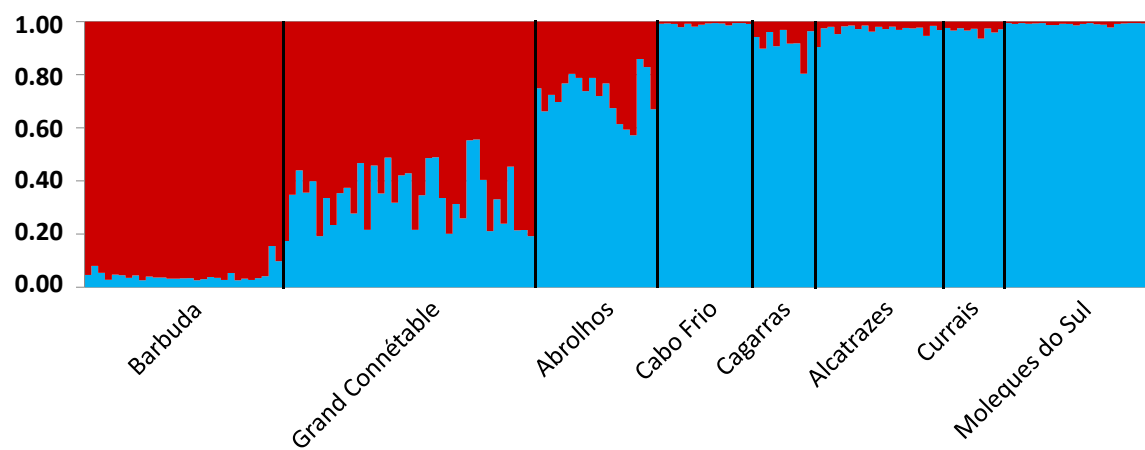


Figure S2. Bayesian ancestry estimates for all individuals based on $K=2$ genetic clusters, excluding locus *Fmin17*.

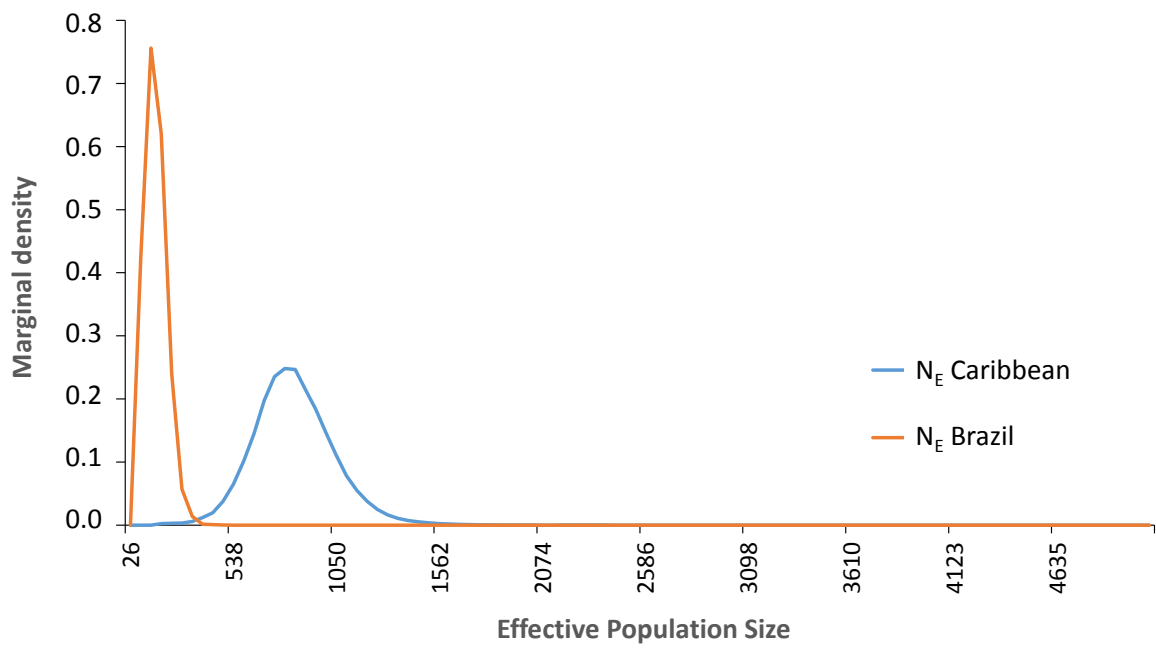


Figure S3. Estimates of Effective population size for “Caribbean” (Barbuda + Grand Connétable) and “Brazil”. See text for details.

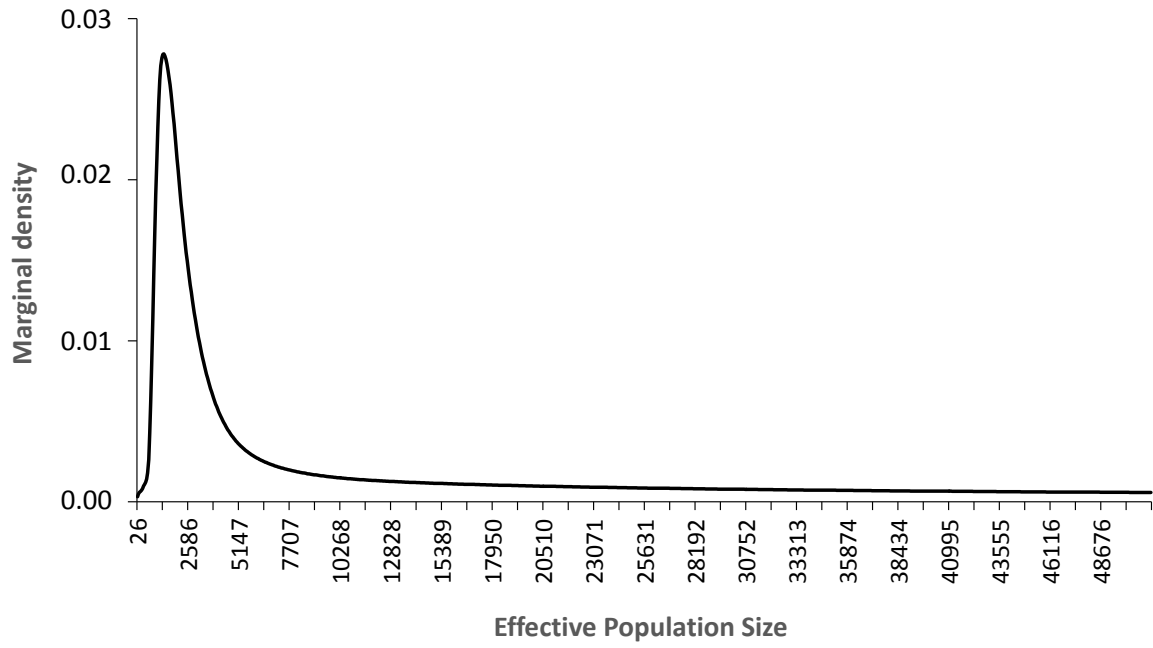


Figure S4. Estimates of Effective population size for the Ancestral population of the “Caribbean” (Barbuda + Grand Connétable) and “Brazil”. See text for details.

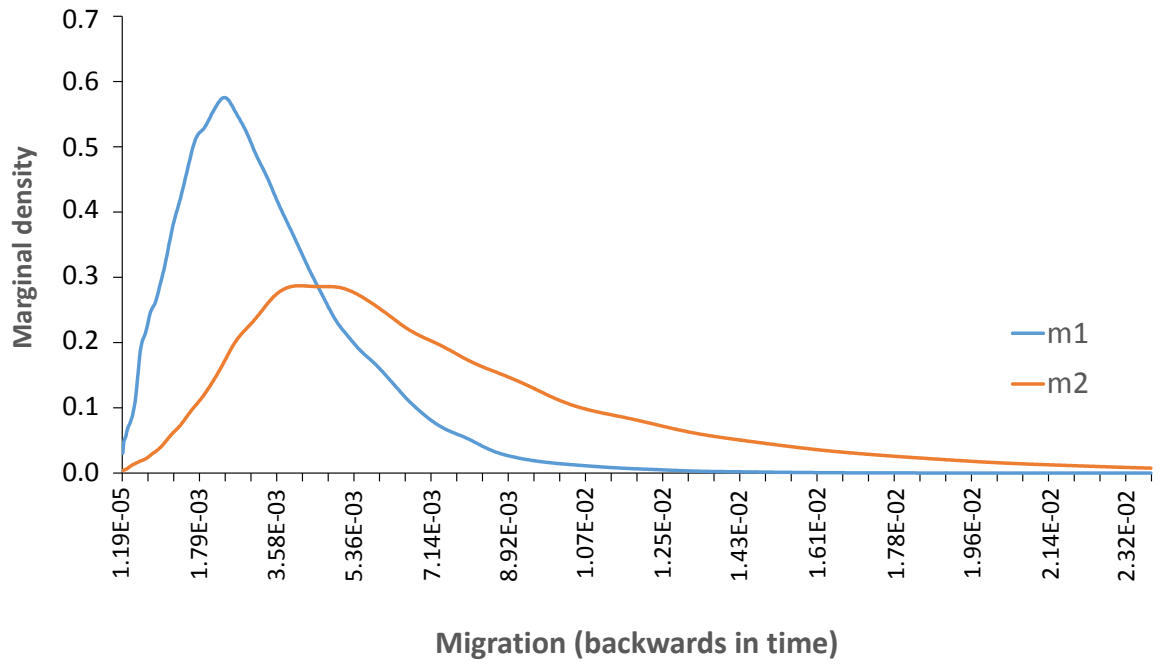


Figure S5. Estimates of backwards migration rate between “Caribbean” (Barbuda + Grand Connétable) and “Brazil”. m1 – backwards migration rate from the Caribbean to Brazil; m2 – backwards migration rate from Brazil to the Caribbean. See text for details.

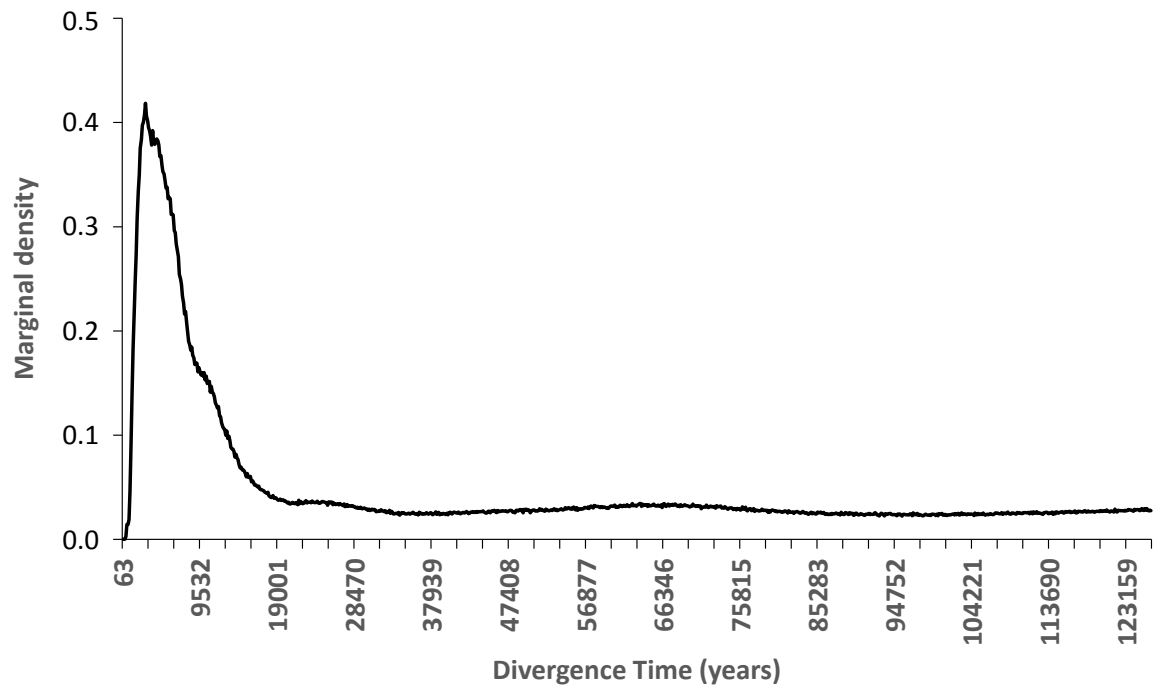


Figure S6. Estimates of divergence time (in years) between “Caribbean” (Barbuda + Grand Connétable) and “Brazil”. See text for details.

4. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho é o primeiro a caracterizar a diversidade genética e suas implicações na estruturação filogeográfica para as populações de *Fregata magnificens* no Atlântico Sul, uma vez que o único estudo até o momento abordando tais aspectos foi feito por Hailer *et al.* (2010) e incluía apenas populações do Atlântico Norte e do Pacífico. Nossos resultados foram consistentes com outros relatados na literatura para organismos marinhos, e contribuem em uma área pouco estudada no Brasil, a filogeografia de aves marinhas. Os resultados obtidos, suportados tanto pelos dados mitocondriais como os de microssatélites, sugerem uma maior diversidade genética na região do Caribe. Porém, há pouca estruturação entre populações nessa região. Tal fato podemos explicar pela sua formação distinta, com ilhas próximas e distribuídas de forma circular, formando uma bacia que pode favorecer a migração entre populações para aves, como a fragata, dependente das termas. Essa distribuição de colônias reprodutivas é distinta daquela da costa brasileira, onde a disposição das ilhas se dá de forma vertical ao longo da costa.

Para as populações brasileiras, encontramos variabilidade genética reduzida e apenas um haplótipo de mtDNA para toda a população brasileira com exceção de um indivíduo de Abrolhos, tal efeito sobre a diversidade haplotípica poderia ser explicada por uma possível colonização recente de migrantes do Caribe. Palacio (1982) aborda em detalhes o Caribe como um potencial centro de biodiversidade, capaz de dispersar indivíduos, dado o aparecimento de espécies que antes só havia na fauna caribenha, em áreas adjacentes como a costa do litoral brasileiro, o autor discute ainda como consequência dessa colonização a diversificação da fauna e o surgimento de novos táxons oriundos do Caribe. Interessantemente, uma das hipóteses para explicar a baixa variação genética em atobás estudados na costa brasileira (Baumgarten *et al.*, 2001) é algum tipo de efeito fundador. Considerando o hábito de cleptoparasitismo da fragata em relação a atobás, uma hipótese que pode ser levantada é a de uma colonização recente do litoral brasileiro por ambas as espécies. Nesse caso, o valor de ~3.000 anos encontrado para a divergência entre uma meta-população brasileira e outra do Caribe + Guiana Francesa, poderia marcar esse evento.

Grand Connétable aparece em nossos resultados como uma população “intermediária”, compartilhando haplótipos mitocondriais com Brasil e Caribe, suportando a ideia de um “interposto migratório” para essa espécie. Esses resultados são suportados

pela análise de estrutura no programa STRUCTURE. Curiosamente, estudos de telemetria realizados na colônia da Guiana Francesa mostraram que aves dessa colônia podem voar para leste, pela costa da América do Sul, chegando até a ilha de Trindade, a mais de 1400km de distância de sua colônia original (Weimerskirch et al., 2006). O fato de não termos detectado migração nessa direção, mas apenas na direção oposta (de Abrolhos para Guiana Francesa), pode refletir uma falta de poder estatístico dos nossos dados, uma vez que essas aves teriam potencial biogeográfico de dispersão (Weimerskirch *et al.*, 2006, Antas, 1986; Nelson, 2005). Isso também explicaria o fato de não termos detectado migração entre as outras ilhas brasileiras. Nesse caso, nossos dados mostram apenas os padrões principais de migração, a favor dos ventos predominantes. Populações que possuem diferentes picos reprodutivos, diferentes áreas de nidificação e, assim, diferentes distribuição pelágicas, parecem encontrar nessas características uma barreira ao fluxo gênico (Friesen *et al.*, 2007). Para a população brasileira, existem de fato as duas primeiras características, mas não há detecção de nenhuma estruturação genética para esses marcadores, podendo ser esse fator resultante de um alto fluxo gênico, colonização recente, ou ambos. Os dados disponíveis de dispersão e comportamento filopátricos de fragatas em colônias reprodutivas localizadas na Costa Pacífica do Norte do México, revelou um maior sucesso de nidificação de fêmeas em ilhas próximas, mas nenhuma evidência de migração inter-oceânica, enquanto machos aparecem com um comportamento um pouco mais filopátrico, somente forrageando mas não nidificando em outras ilhas (González-Jaramillo & Rocha-Olivares, 2011). Entretanto, as pressões seletivas que favoreceriam a filopatria nesse caso não são conhecidas.

Os grandes padrões de correntes marinhas explicam bastante bem nossos resultados principais. Em primeiro lugar, a diferenciação entre Caribe (e, em parte, Guiana Francesa) e Brasil, como resultado da bifurcação da Corrente Sul Equatorial (CSE) que ao atingir a plataforma continental do Brasil na costa do Recife, bifurca-se num ramo mais forte, o qual flui para o Noroeste, como Corrente das Guianas (Silveira et al., 1994) e outro mais fraco para o Sul, que dá origem a Corrente do Brasil (Silveira et al., 2000). Em segundo lugar, a evidência de conexão entre Abrolhos e Grand Connétable, na mesma direção do fluxo da Corrente das Guianas. E em terceiro lugar, a falta de evidências diretas de conexão entre as populações brasileiras de Abrolhos e Moleques do Sul, que pode ser explicado pela dinâmica da Zona da Confluência Brasil/Malvinas (Castello & Moeller 1977, Silveira *et al.*, 2000). Essa dinâmica traz ventos predominantes de sul durante o outono e inverno

austrais, com a influência da Corrente das Malvinas chegando até a costa do Rio de Janeiro (Campos *et al.*, 1996). Já durante o verão, com os ventos de nordeste, a Corrente do Brasil novamente domina a circulação costeira. Nesse caso, a conexão genética entre Abrolhos e Moleques do Sul seria realizada utilizando as outras ilhas brasileiras como pontes genéticas. Novamente, nossos dados podem estar refletindo apenas os padrões mais importantes, a favor dos ventos predominantes, embora migração bidirecional (embora assimétrica) deva existir devido à sazonalidade dos ventos. Essas hipóteses podem ser testadas com marcadores genéticos mais poderosos, como aqueles gerados por estudos de sequenciamento de nova geração (ver Tautz *et al.*, 2009).

A Política Nacional da Biodiversidade tem como objetivos levantar, identificar, catalogar e caracterizar os componentes da biodiversidade brasileira (ecossistemas, espécies e diversidade genética intraespecífica), para gerar informações que possibilitem a proposição de medidas para a gestão desta, enquadra-se nos objetivos deste decreto promover pesquisas para identificar as características ecológicas, a diversidade genética e a viabilidade populacional das espécies. Portanto, uma das diretrizes embutidas na Política Nacional da Biodiversidade (Brasil, 2002) é promover a conservação *in situ* dos componentes da biodiversidade, incluindo variabilidade genética, de espécies e de ecossistemas, em unidades de conservação (Brasil, 2002); conservar amostras representativas e suficientes da totalidade da biodiversidade, do patrimônio genético nacional, da diversidade de ecossistemas e da flora e fauna brasileira como reserva estratégica para usufruto futuro. Nesse contexto, estudos filogeográficos são importantes, pois fornecem subsídios indispensáveis para guiar, não apenas investigações envolvendo reconstruções filogenéticas e hipóteses biogeográficas, mas também programas de conservação da biodiversidade, contribuindo para o conhecimento sobre a história evolutiva da espécie estudada além dos processos evolutivos responsáveis pela diversificação da fauna.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antas PTZ (1986) Migração de aves no Brasil. In: Anais do Encontro Nacional de Anilhadores de Aves 2:153-187.
- Avise JC, Aquadro CF (1982) A comparative summary of genetic distances in the vertebrates. *Evol Biol* 15:151–184.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489-522.
- Avise JC, Nelson WS, Bowen BW, Walker D (2000) Phylogeography of colonially nesting seabirds, with special reference to global matrilineal patterns in the sooty tern (*Sterna fuscata*). *Mol Ecol* 9:1783-1792.
- Baumgartner MF, Mullin KD, May LN, Leming TD (2001) Cetacean habitats in the northern Gulf of Mexico. *Fish B-NOAA* 99:219-239.
- Bazin E, Glemin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312(5773):570-572.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17:3754-3774.
- Berlin S, Tomaras D, Charlesworth B (2007). Low mitochondrial variability in birds may indicate Hill–Robertson effects on the W chromosome. *Heredity* 99:389–396.
- Bourne WRP (1955) The birds of Cape Verde Islands. *Ibis* 97:508–556.
- Branco JO (2001) Descartes da pesca do camarão sete-barbas como fonte de alimento para aves marinhas. *Revta Bras Zool* 18:293-300.
- Brasil (2002) Decreto n° 4.339, de 22 de agosto de 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4339.htm. Acesso em: 25 fev. 2014
- Briggs JC (2003) Marine centres of origin as evolutionary engines. *J Biogeogr* 30:1-18.
- Burg TM, Croxall JP (2004) Global population structure and taxonomy of the Wandering Albatross species complex. *Mol Ecol* 13:2345–2355.

- Calderón L, Quintana F, Cabanne GS, Lougheed SC, Tubaro PL (2014) Phylogeography and genetic structure of two Patagonian shag species (Aves: Phalacrocoracidae). *Mol Phylogenet Evol* 72:42–53.
- Calixto-Albarrán I, Osorno JL (2000) The diet of the magnificent frigatebird during chick rearing. *Condor* 102:569-576.
- Campos EJD, Lorenzetti JA, Stevenson MR, Stech JL, Souza RB (1996) Penetration of waters from Brazil–Malvinas confluence along South American continental shelf up to 23°S. *An Acad Bras Ci* 68:49–58.
- Castello JP, Moller OO (1977) On the oceanographic conditions in the Rio Grande do Sul state. *Atlântica* 2:25–110.
- Clobert J, Danchin E, Dhont AA, Nichols JD (2001) *Dispersal*. Oxford University Press, New York.
- Coulson JC (2002) Colonial breeding in seabirds. In: Schreiber EA, Burger J (eds) *Biology of Marine Birds* 87–113.
- Couto ECG, Silveira FL, Rocha GRA (2003) Marine biodiversity in Brazil: the current status. *Gayana* 67(3):327-340.
- Croxall JP, Silk JRD, Phillips RA, Afanasyev V, Briggs DR (2005) Global circumnavigations: tracking year-round ranges of non-breeding albatrosses. *Science* 307:249-250.
- Davies JL (1963) The antitropical factor in cetacean speciation. *Evolution* 17:107-116.
- Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1992) *Handbook of the birds of the World*. Lynx Edicions 1, Barcelona.
- Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (2005). *Handbook of the birds of the World*, Lynx Edicions 10, Barcelona.
- Diamond, AW (1972) Sexual dimorphism in breeding cycles and unequal sex ratio in Magnificent Frigatebirds. *Ibis* 114(3):395-398.
- Diamond AW (1973) Notes on the breeding biology and behavior of the Magnificent Frigatebird. *Condor* 75:200-209.
- Diamond AW (1975) Biology and behaviour of frigatebirds *Fregata* spp. on Aldabra Atoll. *Ibis* 117(3):302-323.

- Driscoll NW, Haug GH (1998) A short circuit in thermohaline circulation: a cause for northern hemisphere glaciation? *Science* 282:436-438.
- Eisenmann E (1962) Magnificent frigatebird 367-380. In: Palmer RS (Ed.) *Handbook of North American birds* 1, Yale.
- Fernandez P, Anderson DJ, Sievert PR, Huyvaert K (2001) Foraging destinations of three low-latitude albatross (*Phoebastria*) species. *J Zool* 254:391-404.
- Floeter SR, Gasparini JL (2000) The south-western Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. *J Fish Biol* 56: 1099-1114.
- Friesen VL, Burg TM, McCoy KD (2007) Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Mol Ecol* 16:1765-1785.
- Hailer F, Schreiber EA, Miller JM, Levin II, Parker PG, Chesser RT, Fleischer RC (2010) Long-term isolation of a highly mobile seabird on the Galapagos. *Proc R Soc B* 278:817-825.
- Hare MP, Cipriano F, Palumbi SR (2002) Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution* 56:804-816.
- Harris MP (1973) The biology of the waved albatross *Diomedea irronata* of Hood Island, Galápagos. *Ibis* 115:483-510.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF, Yoder AD (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol Phylogenet Evol.* 54:291-301.
- Johns GC, Avise JC (1998) A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol Biol Evol* 15(11):1481-1490.
- Joyeux JC, Floeter SR, Ferreira CEL, Gasparini JL (2001) Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. *J Biogeogr* 28(7):831-841
- Juola FA, Hausmann MF, Dearborn DC, Vleck CM (2006) Telomere shortening in a long-lived marine bird: cross-sectional analysis and test of an aging tool. *The Auk* 123(3):775-783.
- Krul R (2000) Interação de aves marinhas com a pesca: performance reprodutiva de *Sula leucogaster* e *Fregata magnificens* em relação à disponibilidade de alimento provida

- por descartes da pesca do camarão no Arquipélago de Currais, litoral do Paraná. In: VIII Congresso Brasileiro de Ornitologia, Florianópolis. Resumos:164-165.
- Lessons HA (2008) The great american schism: divergence of marine organisms after the rise of Central American Isthmus. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39:63-91.
- Matthiopoulos J, Harwood J, Thomas L (2005) Metapopulation consequences of site fidelity for colonially breeding mammals and birds. *J Anim Ecol* 74:716–727.
- Milot E, Weimerskirch H, Bernatchez L (2008) The seabird paradox: dispersal, genetic structure and population dynamics in a highly mobile, but philopatric albatross species. *Mol Ecol* 17:1658–1673.
- Min XJ, Hickey DA (2008) An evolutionary footprint of age-related natural selection in mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 67:412–417.
- Morris-Pocock JA, Taylor SA, Birt TP, Friesen VL (2010a) Concerted evolution of duplicated mitochondrial control regions in three related seabird species. *Evol Biol* 10:14.
- Morris-Pocock JA, Steeves TE, Estela FA, Anderson DJ, Friesen VL (2010b) 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. *Mol Phylogenet Evol* 54:883–896.
- Murphy RC (1936) Oceanic birds of South America. *Amer Mus Nat History* 2:1243.
- Muss A, Robertson DR, Stepien CA, Wirtz P, Bowen BW (2001) Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55(3):561–572.
- Nabholz B, Glémin S, Galtier N (2009) The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evol Biol* 9:54.
- Nelson JB (1975) The breeding biology of frigatebirds: a comparative review. *Living bird* 14:113-155.
- Nelson JB (1983) Seabirds, their biology and ecology. Hamlyn's, London.
- Nelson JB (2005) Pelicans, cormorants and their relatives: The Pelecaniformes. Oxford University Press, Oxford.

- Norris RD (2000) Pelagic species diversity, biogeography, and evolution. *Paleobiology* 26:236-258.
- Palacio FJ (1982). Revisión zoogeográfica marina del sur del Brasil. *Boletim do Instituto Oceanográfico*. 31(1): 69-92.
- Pastene LA, Goto M, Kanda N, Zerbini AN, Kerem DAN, Watanabe K, Bessho Y, Hasegawa M, Nielsen R, Larsen F, Palsbøll PJ (2007) Radiation and speciation of pelagic organisms during periods of global warming: the case of the common minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *Mol Ecol* 16:1481-1495.
- Pennycuik CJ (1983) Thermal soaring compared in three dissimilar tropical bird species, *Fregata magnificens*, *Pelecanus occidentalis* and *Coragyps atratus*. *J Exp Biol* 102(1):307-325.
- Pennycuik CJ (1987) Flight of auks (Alcidae) and other northern seabirds compared with southern Procellariiformes: ornithodolite observations. *J Exp Biol* 128(1):335-347.
- Pinaud D, Weimerskirch H (2005) Scale dependent habitat use in a long ranging central place predator. *J Anim Ecol* 74(5):852-863.
- Prince PA, Rothery P, Croxall JP, Wood AG (1994) Population dynamics of black-browed and grey-headed albatrosses *Diomedea melanophris* and *D. chrysostoma* at Bird Island, South Georgia. *Ibis* 136:50–71.
- Rezende MA (1987) Comportamento associativo de *Fregata magnificens* (Fregatidae, Aves) e *Sula leucogaster* (Sulidae, Aves) no litoral Centro–Norte do Estado de São Paulo. *Bol Inst Ocean* 35:1-5.
- Sagar PM, Stahl J-C, Molloy J (1998) Sex determination and natal philopatry of southern Buller's mollymawks (*Diomedea bulleri bulleri*). *Notornis* 45:271–278.
- Scheiber RW, Hansley DA (1976) The diets of *Sula dactylatra*, *Sula sula*, and *Fregata minor* on Christmas Island, Pacific Ocean. *Pacific Sci* 30:241-248.
- Schreiber EA, Burger J (2002) *Biology of marine birds*. CRC Press, Boca Raton.
- Sibley CG, Monroe Jr BL (1990) *Distribution and taxonomy of birds of the world*. Yale University Press, New Haven.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

- Silveira ICA, Miranda LB, Brown WS (1994) On the origins of the North Brazil Current. *J Geophys Res* 99:22501–22512.
- Silveira ICA, Schimidt ACK, Campos EJD, Godoi SS, Ikeda Y (2000) A Corrente do Brasil ao largo da costa brasileira. *Rev bras Oceanogr* 48: 171–183.
- Smith AL, Friesen VL (2007) Differentiation of sympatric populations of the band-rumped storm-petrel in the Galapagos Islands: an examination of genetics, morphology, and vocalizations. *Mol Ecol* 16:1593-603.
- Smith AL, Monteiro L, Hasegawa O, Friesen VL (2007) Global phylogeography of the bandrumped storm-petrel (*Oceanodroma castro*; Procellariiformes: Hydrobatidae). *Mol Phylogenet Evol* 43:755-773.
- Stanley SE, Harrison RG (1999) Cytochrome b evolution in birds and mammals: an evaluation of the avian constraint hypothesis. *Mol Biol Evol* 16:1575-1585.
- Steeves TE, Anderson DJ, McNally H, Kim MH, Friesen VL (2003) Phylogeography of *Sula*: the role of physical barriers to gene flow in the diversification of tropical seabirds. *J Avian Biol* 34(2):217-223.
- Steeves TE, Anderson DJ, Friesen VL (2005a) The Isthmus of Panama: a major physical barrier to gene flow in a highly mobile pantropical seabird. *J Evol Biol* 18:1000-1008.
- Steeves TE, Anderson DJ, Friesen VL (2005b) A role for nonphysical barriers to gene flow in the diversification of a highly vagile seabird, the masked booby (*Sula dactylatra*). *Mol Ecol* 14:3877-3887.
- Tautz D, Ellengren H, Weigel D (2010) Next Generation Molecular Ecology. *Mol Ecol* 19: 1-3.
- Tomczak M, Godfrey JS (1993) *Regional Oceanography: an Introduction*. Pergamon Press, Oxford.
- Tomczak M, Godfrey JS (2003) *Regional Oceanography: an Introduction*. Daya, New Delhi.
- Trivelpiece WZ, Ferraris JD (1987) Notes on the behavioural ecology of the magnificent frigatebird *Fregata magnificens*. *Ibis* 129:168-174.

- Weimerskirch H, Doncaster CP, Cuenotchaillet F (1994) Pelagic seabirds and the marine environment: foraging patterns of wandering albatrosses in relation to prey availability and distribution. *P Roy Soc B Bio* 255:91–97.
- Weimerskirch H, Brothers N, Jouventin P (1997) Population dynamics of wandering albatross *Diomedea exulans* and Amsterdam albatross *D. amsterdamensis* in the Indian Ocean and their relationships with long-line fisheries: conservation implications. *Biol Conserv* 79:257–270.
- Weimerskirch H, Chastel O, Barbraud C, Tostain O (2003) Flight performance: frigatebirds ride high on thermals. *Nature* 421(6921):333-334.
- Weimerskirch H, Le Corre M, Jaquemet S, Potier M, Marsac F (2004) Foraging strategy of a top predator in tropical waters: great frigatebirds in the Mozambique Channel. *Mar Ecol-Prog Ser* 275:297-308.
- Weimerskirch H, Le Corre M, Marsac F, Barbraud C, Tostain O, Chastel O (2006) Postbreeding movements of frigatebirds tracked with satellite telemetry. *Condor* 108(1):220–225.
- Zink RM (1997) Phylogeographic studies of North American birds. In: Mindell DP (ed.) *Avian Molecular Evolution and Systematics*. pp 301-324.

6. ANEXO I

6.1. Breve descrição das ilhas amostradas

As amostras foram obtidas ao longo da distribuição da espécie no Atlântico Sul, provenientes das seguintes populações: Ilhas Moleques do Sul (SC); Arquipélago de Currais (PR); Arquipélago das Cagarras (RJ), Ilha de Cabo Frio (RJ); Arquipélago de Alcatrazes (SP); Arquipélago de Abrolhos (BA); Grand Connétable (Guiana Francesa) e Barbuda (Caribe).

As colônias reprodutivas abrangidas pelo estudo estão descritas em mais detalhes a seguir:

a) As Ilhas Moleques do Sul são consideradas o maior abrigo para reprodução de aves marinhas na costa catarinense; pertencem ao Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. Esse Arquipélago é composto por três ilhas situadas entre as coordenadas 27°51' S e 48°26' W, aproximadamente a 12 km da praia do Pântano do Sul ao sul de Florianópolis. Em torno de 540 a 600 casais de *Fregata magnificens* nidificam por temporada nas Ilhas Moleques do Sul, porém a ocorrência das fragatas nessa ilha é anual, tendo os meses entre junho e agosto como início do período reprodutivo e a maioria das eclosões dos filhotes entre novembro e dezembro (Branco, 2004).

b) O Arquipélago de Currais (25°44' S e 48°22' W) é composto por três ilhotas situadas a 6 milhas náuticas do Balneário de Praia de Leste, litoral centro-sul paranaense. A maior das ilhas, Ilha Grapirá, possui área emersa de 54.700m² e altitude máxima de 55m. Pela sua composição vegetal e características geológicas, torna-se propícia a servir como colônia de nidificação. *Fregata magnificens* tem a maior população dessa ilha, onde se contam, em média, 2.640 casais no pico reprodutivo nos meses de maio a agosto. A população de *F. magnificens* ocupa áreas revestidas por associações lenhosas, preferencialmente no topo da ilha, onde o padrão de altura da cobertura vegetal oscila entre 0,5 e 1 metro, formando denso emaranhado de galhos (Krul, 2004, Carniel & Krul, 2010).

c) Arquipélago das Cagarras (23°02' S, 43°12' W) dista 5 km da costa do Rio de Janeiro, sendo formado pelas ilhas: Cagarra (a mais alta com 79 metros), Palmas (46 m) e Comprida (76 m) (Alves *et al.*, 2004b). Duas ilhas isoladas, Redonda e Rasa, foram recentemente incluídas como parte do Arquipélago (Rangel *et al.*, 2007). Nas ilhas

Cagarras e Redonda, em janeiro de 1982, Antas (1991) estimou que houvesse 2000 ninhos de *F. magnificens*.

d) A Ilha de Cabo Frio ou Ilha do Farol (22°59' S e 41°59' W) está localizada no Município de Arraial do Cabo, no Estado do Rio de Janeiro e dista cerca de 160 metros do continente. Possui cerca de 6,8 km² de área, com os dois pontos mais altos alcançando 390 metros. Uma vegetação mais arbórea é observada nas partes mais altas da ilha, sendo característica da Floresta Atlântica (Coelho *et al.*, 2004).

e) O Arquipélago dos Abrolhos está localizado a 35 milhas da costa sul da Bahia (17°50' S e 38°42' W) sendo formado por cinco ilhas: Santa Barbara, Redonda, Siriba, Sueste e Guarita. Em Abrolhos devido à ausência de grandes árvores, as fragatas constroem os ninhos sobre touceiras de ciperáceas compactadas com suas próprias fezes (Alves *et al.*, 2004a). É nas encostas abruptas da Ilha Redonda que as fragatas costumam fazer seus ninhos (Cesar Musso, com. pes.).

f) A Ilha Grand Connétable faz parte da Guiana Francesa sendo uma reserva natural situada em 4°49'30'' N, 51°56'00'' W. Constitui-se de uma ilha rochosa localizada ao Norte da Costa atlântica da América do Sul que hospeda uma única população de *Fregata magnificens*, sendo considerada uma das colônias mais importantes da região (Thoisy *et al.*, 2009).

g) A Ilha de Barbuda pertence ao Caribe distando cerca de 56 km de Antígua. Localizada nas coordenadas 17°35' N e 61°45' W, é uma ilha de baixa altitude possuindo uma grande extensão de pântano cercado por mangues baixos e incorporando lagoas e arbustos de no máximo 2,5m de altura. Possui importante área pra nidificação das fragatas, tendo aproximadamente 2500 casais no pico reprodutivo (Diamond, 1973).