

Bruna Santos de Barros

VARIABILIDADE GENÉTICA DA GRAZINA-DE-BARRIGA-BRANCA *Pterodroma incerta* (Schlegel, 1863) (AVES: PROCELLARIIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Monografia apresentada à atividade de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Ott
Supervisora: Prof. Dra. Larissa Rosa de Oliveira

IMBÉ,
2017

BRUNA SANTOS DE BARROS

VARIABILIDADE GENÉTICA EM GRAZINA-DE-BARRIGA-BRANCA *Pterodroma incerta* (Schlegel, 1863) (PROCELLARIIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL, SUL DO BRASIL

Monografia apresentada à atividade de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Ott

Supervisora: Prof. Dra. Larissa Rosa de Oliveira

IMBÉ

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Santos de Barros, Bruna
VARIABILIDADE GENÉTICA EM PARDELA-DE-CAPUZ
Pterodroma incerta (Schlegel, 1863) (AVES:
PROCELLARIIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL, SUL DO BRASIL
/ Bruna Santos de Barros. -- 2017.
36 f.

Orientador: Paulo Henrique Ott.
Coorientadora: Larissa Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Ciências Biológicas:
Biologia Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Genética de Populações. I. Henrique Ott, Paulo,
orient. II. Oliveira, Larissa, coorient. III. Título.

BRUNA SANTOS DE BARROS

VARIABILIDADE GENÉTICA EM GRAZINA-DE-BARRIGA-BRANCA *Pterodroma incerta* (Schlegel, 1863) (PROCELLARIIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL, SUL DO BRASIL

Monografia apresentada à atividade de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr. Caio José Carlos

Dr. Guilherme Tavares Nunes

Dr. Ênio Lupchinski
Coordenador da atividade
Trabalho de Conclusão II - CBM

IMBÉ

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe que sempre apoiou minhas decisões pessoais e acadêmicas, além de criar eu e minha irmã com muito esforço e dedicação sempre priorizando a nossa educação. Não poderia deixar de agradecer também a minha irmã pela parceria desde o meu nascimento, laço esse que nunca poderá ser quebrado, e àquelas irmãs que eu escolhi durante a vida: Gisele, Nágilla, Gabi, Babi e Nathi. Ao meu namorado por fazer parte desse círculo de pessoas que só me fazem feliz. Ao meu conselheiro Maurício Tavares, que nunca mediu esforços para transmitir suas experiências pessoais e profissionais comigo.

Aos profissionais da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos) com quem eu tive a oportunidade de trabalhar nas etapas laboratoriais do presente trabalho. Ao Prof. Victor Viliati que me recebeu de braços abertos e sempre me ajudou durante todas as etapas da construção dessa pesquisa. À Giovana Gamino que me ensinou todos os processos de bancada, edição e análise de sequências, além de ter se tornado uma grande amiga e transformado a minha vivência da Unisinos muito mais divertida.

Aos meus colegas da Biologia Marinha, companheiros de coleção, DABMar, SABMar e de muita troca de experiência e coleguismo. Às pessoas que se tornaram grandes amigos durante essa trajetória: Gabi's, Marília, Cheiene, Aninha e todos os demais. Ao Nicholas Daudt que foi um grande incentivador desse trabalho e sempre se manteve disposto a me auxiliar.

Um agradecimento especial aos meus orientadores Paulo Ott, Larissa Oliveira e Victor Viliati, foi um prazer entrar nessa nova jornada de conhecimento com vocês!

Aos membros da banca Caio José Carlos e Guilherme Tavares Nunes, obrigada por ajudar na evolução desse trabalho.

A todos que de alguma forma tornaram a minha experiência da graduação mais divertida e gratificante, muito obrigada!

RESUMO

A grazina-de-barriga-branca, *Pterodroma incerta*, é uma espécie endêmica do Atlântico Sul e está classificada como “Em Perigo” pela IUCN, sendo essa categorização justificada pela restrição de áreas reprodutivas, pelo baixo sucesso reprodutivo de aproximadamente 20% e por tendências de declínio populacional. A espécie é usualmente encontrada debilitada ou morta ao longo das praias do sul do Brasil, mas após a passagem do furacão Catarina, no outono de 2004, centenas de *P. incerta* foram encontradas mortas na região. Com isso, o presente estudo objetiva comparar genotipicamente os indivíduos arrastados pelo furacão, em 2004, com indivíduos encontrados nas porções norte e média do litoral do Rio Grande do Sul. Além disso, busca avaliar se houveram eventos de expansão populacional, comparar os índices de variabilidade genética com dados previamente publicados de outros Procellariiformes, e determinar a proporção sexual dos espécimes encontrados na costa gaúcha. Para isso, foram utilizadas amostras de 53 espécimes que foram trazidos ao continente pelo furacão Catarina em 2004 (Grupo 1) e outros 11 coletados posteriormente entre os anos 2010 e 2014 no Rio Grande do Sul (Grupo 2). Com base no sequenciamento da região controladora do DNAm, a diversidade haplotípica foi estimada em 0,79 e a nucleotídica em 0,89%. Esses índices foram baixos quando comparados com valores previamente publicados para outras espécies de Procellariiformes. A comparação entre os Grupos 1 e 2 revelaram valores de F_{ST} e Φ_{ST} significativos, evidenciando uma alta diferenciação entre as duas amostragens, e assim sugerindo uma subdivisão populacional. Além disso, houve diferenças no que se refere às proporções sexuais: no Grupo 1 foram identificados 13 machos e 40 fêmeas (1:3,1), e no Grupo 2 cinco machos e seis fêmeas (1:1,2). A rede de haplótipos e a *mismatch distribution* não evidenciaram eventos de expansão populacional. O presente trabalho foi pioneiro na descrição da variabilidade genética da espécie, sendo importante para uma melhor compreensão do estado atual de conservação da espécie.

Palavras-chaves: Aves marinhas, DNA mitocondrial, Região Controladora, expansão populacional e proporção sexual.

ABSTRACT

The Atlantic Petrel, *Pterodroma incerta*, endemic to the southern Atlantic Ocean is an endangered species by IUCN, this categorization is justified because of the restriction of reproductive areas, by the low reproductive success of approximately 20% and by trends of population decline. The species is usually found debilitated or dead along the beaches of southern Brazil, but after of Hurricane Catarina in the fall of 2004, hundreds of *P. incerta* were found dead in the region. Thus, the present study aims to compare the domain I of the mtDNA control region of the individuals brought by the hurricane in 2004 with individuals found in the northern and middle portions of the coast of Rio Grande do Sul, to evaluate if there were events of population expansion, to compare the genetic variability indexes with previously published data of other Procellariiformes, and to determine the sexual proportion of the specimens found on the coast of Rio Grande do Sul. Were used 53 samples from individuals carried off by hurricane Catarina in 2004 (group 1) and 11 samples collected from individuals between 2010 and 2014 in Rio Grande do Sul (group 2). Based on the sequencing of the mtDNA control region, the haplotypic diversity was estimated at 0.79 and the nucleotide at 0.89%. These indices were low when compared to other species of Procellariiformes found in the literature. Comparison between the two samples of the species analyzed (i.e. Groups 1 and 2) revealed significant F_{st} and ϕ_{St} values, showing a high differentiation between the two samplings, and thus suggesting a population subdivision. In addition, different sexual proportions were observed: for Group 1, 13 males and 40 females (1: 3,1) were identified, while in Group 2 five males and six females (1: 1,2). The haplotype network and the mismatch distribution did not show events of population expansion. This study was pioneer in the description of the genetic variability of the species, being important for a better understanding of the current conservation status of the species.

Keywords: Seabirds, mitochondrial DNA, Control Region, population expansion and sexual proportion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Rede de haplótipos encontrados nos grupos de *Pterodroma incerta* amostrados no litoral do Rio Grande do Sul. O tamanho dos círculos é proporcional a frequência dos haplótipos na amostra, os círculos cinza representam os haplótipos encontrados no Grupo 1 e os pretos no Grupo 2. Os traços nos ramos entre os haplótipos correspondem a um passo mutacional, os losangos vermelho representam um vetor médio.

Figura 2 – Distribuição de frequências em pares (*mismatch distribution*) de todo o conjunto amostral de *Pterodroma incerta* amostrados no litoral do Rio Grande do Sul. A linha contínua indica a tendência do modelo e a linha pontilhada indica a tendência obtida pelos valores da análise.

Figura 3 – Bayesian skyline plot (BSP) do domínio I da Região controladora do DNAm_t apresentando a variação do tamanho da população efetiva histórica de fêmeas de *Pterodroma incerta*. A linha preta representa a média do parâmetro Nef e a área roxa os intervalos de confiança de 95%. Figura 4 – Áreas atingidas pelo furacão plotadas no mapa de densidade da espécie. Os círculos rosa médio, vermelho, vermelho escuro e rosa claro indicam a área estimada da localização do furacão nos dias 25/03, 26/03, 27/03 e 28/03, respectivamente.

Figura 4 – Imagens georeferenciadas de satélite do furacão Catarina nos dias 25/03, 26/03, 27/03, 28/03 de 2014 nas figuras A, B, C e D, respectivamente.

Figura 5 – Áreas atingidas pelo furacão Catarina em 2014, plotadas no mapa de densidade da de *Pterodroma incerta*. Os círculos rosa médio, vermelho, vermelho escuro e rosa claro indicam a área estimada da localização do furacão nos dias 25/03, 26/03, 27/03 e 28/03, respectivamente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distintos haplótipos encontrados na região controladora do DNA mitocondrial de *Pterodroma incerta* na costa do Rio Grande do Sul, com a indicação dos sítios variáveis, frequência haplotípica em cada grupo amostral, bem como suas diversidades haplotípicas (H_d) e nucleotídicas (π) e seus respectivos desvios padrão.

Tabela 2 – Tabela comparativa da Região Controladora do DNAMt entre diferentes espécies da ordem Procellariiformes. N= tamanho amostral, H= número de haplótipos, H/N= razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral, H_d = diversidade haplotípica, S/100pb= número de sítios variáveis por 100pb (via regra de três), π (%)= diversidade nucleotídica em porcentagem. Status de conservação: EN= Em Perigo, LC= Pouco Preocupante, CR= Criticamente Ameaçada, NT= Pouco Preocupante.

Tabela 3 – Resultados dos testes D de Tajima e F_s de Fu e seus respectivos níveis de significância para *Pterodroma incerta* amostrados no litoral do Rio Grande do Sul

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CECLIMAR/IB/UFRGS	Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos / Instituto de Biociências / Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CERAM	Centro de Reabilitação de Animais Marinhos
CR	<i>Critically Endangered</i> (Criticamente em Perigo)
DNAmt	DNA mitocondrial
EM	<i>Endangered</i> (Em Perigo)
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LC	<i>Least Concern</i> (Pouco Preocupante)
NT	<i>Near Threatened</i> (Quase ameaçada)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RC	Região Controladora
RC I	Região Controladora - Domínio I
RS	Rio Grande do Sul
VU	<i>Vulnerable</i> (Vulnerável)

LISTA DE SÍMBOLOS

Fst	Índice de fixação das subpopulações relativas à população total
H	Número de haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
N	Número amostral
S	Número de sítios variáveis
π	Diversidade nucleotídica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	16
2.1 Material e Métodos.....	16
2.1.1 Amostragem	16
2.1.2 Extração do DNA.....	16
2.1.3 Amplificação da região controladora do DNAm ^t	16
2.1.4 Análises de dados	17
2.1.5 Determinação molecular do sexo	18
2.1.6 Análises sobre o furacão Catarina	19
2.2 Resultados	19
2.2.1 Descrição e análises da RC I do DNAm ^t	19
2.2.2 Proporção sexual	25
2.2.3 Análises sobre o furacão Catarina.....	25
2.3 Discussão.....	27
2.3.1 Descrição e análises da RC I do DNAm ^t	27
2.3.2 Proporção sexual e inferências sobre o furacão Catarina.....	29
3 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A palavra biodiversidade, síntese de diversidade biológica, começou a ser frequentemente usada após a década de 1980. Foi citada primeiramente em uma publicação em 1988, pelo biólogo Edward O. Wilson em uma coletânea intitulada *Biodiversity* (WILSON, 1988, *apud* FRANCO, 2013). Porém, em 1982, Ernst Mayr já abordava a importância da diversidade em sua obra “O desenvolvimento do pensamento biológico: diversidade, evolução e herança”, onde afirmou:

“Difícilmente qualquer aspecto da vida é mais característico do que sua quase ilimitada diversidade” (MAYR, 1998, p. 161).

Embora existam vários conceitos de biodiversidade, a Convenção sobre Diversidade Biológica a define como a variação que existe entre as espécies de plantas, animais, microorganismos e outras formas de vida, como também dentro das espécies, sob forma de diversidade genética, e em nível ecossistêmico, nos quais as espécies interagem uma com as outras e com o ambiente físico (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2010).

A biodiversidade do planeta passou por modificações profundas com o crescimento da população humana e com a revolução industrial. Dentre outros motivos, a perda de habitat é a principal causa das extinções (PIMM; RAVEN, 2000). Por essa razão, estudos defendem a perpetuação e ampliação de áreas protegidas existentes e a criação de novas. Pimm e Raven (2000) estimaram uma perda de 40% da biodiversidade em *hotspots* de florestas tropicais, caso as áreas de proteção ambiental não sejam ampliadas.

As estimativas sobre perda de biodiversidade marinha também são alarmantes. Segundo o Panorama da Biodiversidade Mundial, a intensa exploração de espécies de peixes de grande porte está inviabilizando a recuperação do estoque pesqueiro, resultando em uma tendência de dominância de peixes menores e invertebrados, fenômeno esse conhecido como “esgotamento dos níveis tróficos” (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2010). Utilizando meta-análises de dados publicados, Worm *et. al.* (2003) estimam um colapso de 100% dos estoques pesqueiros em 2048. Embora haja deficiências nesse estudo, por ter sido baseado em trabalhos publicados com diferentes metodologias e esforços, seus

resultados mostram que caso não haja um esforço global em políticas estratégicas de gestão ambiental e pesqueira a segurança alimentar, a qualidade das águas costeiras e a estabilidade dos ecossistemas marinhos estão gravemente ameaçados.

Outros organismos diretamente afetados pelas ações antrópicas no ambiente marinho são as aves marinhas, definidas como espécies que além de dependerem de recursos marinhos, se alimentam exclusivamente de presas marinhas, se reproduzem em ilhas e/ou no litoral, e não forrageiam e migram em áreas continentais (ZOTIER *et al.*, 1999). Esse agrupamento é o mais ameaçado dentre as aves, com cerca de 30% de suas espécies globalmente ameaçadas e 5% categorizadas como “ criticamente em Perigo ” (CR), seguindo os critérios da IUCN (CROXALL *et al.*, 2012). Dentre as principais ameaças à sua conservação, destaca-se a introdução de espécies invasoras nas áreas reprodutivas, o que afeta aproximadamente 75% de todas as aves marinhas ameaçadas (CROXALL, *et al.*, 2012; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2008). Conforme uma compilação de dados feita por Croxall *et al.* (2012), o segundo grupo mais ameaçado dentre as aves marinhas são os petréis dos gêneros *Pterodroma* e *Pseudobulweria*, com uma espécie extinta (*Pterodroma rupinarum*) e outra considerada possivelmente extinta (*Pterodroma caribbaea*), ficando atrás apenas dos albatrozes.

A espécie alvo do presente estudo, grazina-de-barriga-branca *Pterodroma incerta*, distribui-se no Oceano Atlântico Sul, principalmente entre as latitudes 20°S e 55°S, com maior abundância próxima à Convergência Subtropical (ENTICOTT, 1991). A espécie se reproduz na Ilha de Tristão da Cunha (37°05’S e 12°17’W; 37°24’S e 12°45’W) e na Ilha Gough (40°02’S; 10°W) (CUTHBERT, 2004; ENTICOTT, 1991; SWALES, 1965). No Brasil, ocorre entre estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (BENCKE *et al.*, 2010; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016; BUGONI *et al.*, 2007), e pontualmente registrada no nordeste do país aos 01°31’S; 38°46’O (BOURNE; CURTIS, 1985). Contudo, um estudo a respeito da distribuição de *P. incerta* na costa brasileira, indicou uma maior abundância da espécie entre as latitudes 28°S e 31°S nos meses de outono e primavera (RONCONE, 2011).

Atualmente, essa espécie está categorizada como “ Em Perigo ” (EN) (BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2016) na classificação mundial de ameaça de extinção. Porém, a espécie não é registrada na ilha de Tristão da Cunha há 35 anos e se for constatada a extinção dessa população nesse local, a espécie poderá ser classificada como Criticamente e Perigo (CR) (BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2016). Esta categorização é justificada pela restrição de áreas de reprodução e introdução de ratos nas colônias (CUTHBERT; HILTON, 2004;

ANGEL; COOPOER, 2006; DILLEY *et al.*, 2015; WANLESS, *et al.* 2007; WANLESS, *et al.*, 2012), sendo, os últimos, responsáveis por um baixo sucesso reprodutivo da população, estimado em aproximadamente 20% (CUTHBERT, 2004; CUTHBERT; HILTON, 2004; WANLESS, *et al.*, 2012). O número de pares reprodutivos de grázina-de-barriga-branca foi estimado em 900.000 (REXER-HUBER *et al.*, 2014), porém, de acordo com tendências populacionais foi previsto um declínio anual entre 0,7% e 3,5% (WANLESS, *et al.*, 2012). No Brasil e no Estado do Rio Grande do Sul, *P. incerta* está classificada como “Em Perigo” (EN) (BRASIL. Portaria Nº 444, 2014; RIO GRANDE DO SUL. Decreto Nº 51.797, 2014).

O declínio populacional está diretamente relacionado com a diversidade genética das espécies, ou seja, a perda de variabilidade genética é inversamente proporcional ao tamanho efetivo populacional (FRANKHAM, 1996; MONTGOMERY, 2000). A manutenção da variabilidade genética é um importante pilar para a biologia na conservação por dois motivos. Primeiro, o ambiente está em constante transformação, assim, essa variabilidade é necessária para que as populações se adaptem a essas mudanças. Além disso, a perda dessa diversidade está frequentemente associada ao endocruzamento e à redução da aptidão reprodutiva (FRANKHAM, 2003). Por essas razões, a diversidade genética é um dos três níveis de biodiversidade que a IUCN recomenda para a conservação (MCNEELY, *et al.*, 1990). Espécies que estão ameaçadas de extinção, mais frequentemente têm baixa variabilidade genética, especialmente quando comparadas com espécies filogeneticamente próximas e que não estão ameaçadas (SPIELMAN *et al.*, 2004; REED, FRANKHAM, 2003). Evans e Sheldon (2008) relacionaram níveis de heterosigozidade de 194 espécies de aves com suas respectivas categorias de ameaça e detectaram uma queda de 39% na heterosigozidade média das espécies com maior risco de extinção, quando comparadas com aquelas que não estavam ameaçadas.

A diversidade genética, uma vez perdida, só é recuperada lentamente (por mutação ou migração), de modo que uma espécie pode continuar ameaçada de extinção mesmo com ações que colaborem para o aumento do seu tamanho populacional (SOLÉ-CAVA, 2001). Do ponto de vista da conservação, a prioridade deve ser dada a estudos que quantifiquem e caracterizem os níveis da diversidade genética para essas espécies ameaçadas. Essa avaliação da diversidade pode ajudar em estimativas da probabilidade de mudanças populacionais futuras, e pode ser um guia de gestão de conservação que visa manter os atuais níveis de diversidade (SOLÉ-CAVA, 2001).

Os estudos genéticos com *P. incerta* são poucos e nenhum trata sobre variabilidade genética. Nunn e Stanley (1998) analisaram a correlação entre tamanho corporal e as taxas de evolução do gene mitocondrial citocromo b em 85 espécies de Procellariiformes, incluindo *P. incerta*. Welch *et al.* (2011) utilizaram três *loci* de íntrons nucleares e o citocromo b para investigar a magnitude e o momento da divergência entre dois petréis (*P. phaeopygia* e *P. sandwichensis*) e utilizaram amostras de *P. incerta*, *P. ultima* e *P. mollis* para compor o grupo externo.

No entanto, para algumas espécies de *Pterodroma* existem estudos abordando a diversidade genética. Por exemplo, Lawrence *et al.* (2008 a) reportaram uma variabilidade genética mitocondrial de 21 haplótipos no citocromo b e em dois fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial (DNAMt) em *P. magentae*, a qual está classificada como CR (BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2016). Esse resultado foi surpreendente (LAWRENCE *et al.*, 2008 a), considerando o pequeno tamanho populacional de apenas 25 pares reprodutivos e 11 filhotes conhecidos (STEPHENSON, 2006). Entretanto, os filhotes compartilharam poucos haplótipos com adultos, evidenciando uma perda na diversidade haplotípica. Nesse estudo, os autores sugerem que a população manteve uma proporção significativa de sua diversidade genética do passado (LAWRENCE *et al.*, 2008 a). Porém, Lawrence *et al.* (2008 b) compararam regiões do citocromo b entre subfósseis amostrados e populações modernas de *P. magentae* e não obtiveram diferenças significativas na variabilidade genética entre essas populações. Os autores sugeriram que essa alta variabilidade pode ser explicada por áreas de reprodução ainda não conhecidas, por causa do difícil acesso a esses locais (LAWRENCE *et al.*, 2008 c). Para *P. macroptera gouldi*, Lawrence *et al.* (2014) encontraram uma alta diversidade de haplótipos na região controladora do DNAMt ao identificarem 79 haplótipos em 310 indivíduos, sendo que *P. macroptera* está classificada como “Pouco Preocupante” (LC) (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

Tendo em vista a restrição da espécie a poucas colônias, o baixo sucesso reprodutivo, as estimativas de declínio populacional e a falta de estudos genéticos para *P. incerta*, fez-se necessária a realização deste trabalho. Sendo assim, o presente estudo objetiva testar as seguintes hipóteses: *P. incerta* tem uma menor diversidade genética quando comparada a espécies de Procellariiformes pertencentes a níveis inferiores de *status* de ameaça, os espécimes amostrados no RS pertencem a diferentes populações, a espécie passou por eventos de expansão populacional e de que existe uma diferente proporção sexual da espécie no

estado. Os resultados geraram dados inéditos e pioneiros, fundamentais para que futuras pesquisas moleculares e revisão do *status* de conservação da espécie sejam realizadas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Amostragem

A amostragem foi dividida em dois grupos (Grupo 1 e Grupo 2) devido à diferença entre os anos de coleta dos espécimes. O Grupo 1 é formado por 54 indivíduos que foram coletados em diferentes regiões do Rio Grande do Sul após a passagem do furacão Catarina, em março de 2004. Esse evento deslocou mais de 300 espécimes para zonas continentais no sul do Brasil, sendo que alguns indivíduos foram encontrados a 420 km da costa e 1100 m acima do nível do mar (BUGONI *et al.*, 2007). Os outros 10 indivíduos foram coletados vivos (exceto um), entre os anos de 2010 e 2014 nos meses de dezembro a fevereiro, nas porções norte e médio-leste do litoral do Rio Grande do Sul. Esses animais foram levados ao Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CERAM) pertencente ao Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CECLIMAR/IB/UFRGS) e posteriormente foram a óbito, os mesmos compõem o que foi chamado neste trabalho de Grupo 2. No total, foram coletadas 64 amostras de tecido muscular estriado esquelético de *P. incerta*, sendo esse material armazenado em álcool 96°.

2.1.2 Extração do DNA

A extração do DNA total foi realizada utilizando-se do *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (protocolo disponível em: www.promega.com).

2.1.3 Amplificação da região controladora do DNAm_t

Para a amplificação do domínio I da região controladora (CR I) do DNAm_t foram utilizados os seguintes oligonucleotídios iniciadores (*primers*): F1AF 5' AATGGCCCATGTGCGGTTGT - 3' e HCRP_tb 5' - CTAGGGGTGTAGGGGGAAAG - 3' (LAWRENCE *et al.* 2008 a). O volume final das reações de amplificação foi de 25 µl contendo 1X *GoTaq Green Master Mix*, 0,4 µM de cada primer, 8,5 µl de água ultra pura e 100 ng de DNA. As amplificações foram executadas seguindo as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por dois minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 45 segundos,

anelamento a 62 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por cinco minutos (LAWRENCE *et al.* 2008a).

Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado em luz ultravioleta. Os produtos da PCR, das duas regiões do genoma mitocondrial, foram purificados de duas maneiras: (i) com acetato de sódio nas ampliações com produtos de PCR com concentrações maiores do que 100 ng/μl; e (ii) enzimaticamente (enzimas - Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) e Exonuclease I (EXO)), quando as concentrações foram menores do que 100 ng/μl. Os sequenciamentos dos amplicons foram realizados pela empresa Advancing through Genomics MACROGEN (Coreia do Sul), sendo sequenciadas em ambas as direções (senso e anti-senso), no sequenciador automático 3730XL DNA sequencer.

2.1.4 Análises de dados

As sequências foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW no programa MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013), corrigidas e editadas no programa *Bioedit* 7.2.5. A diversidade nucleotídica (π), que é a probabilidade de que um nucleotídeo retirado ao acaso de dois indivíduos no mesmo sítio seja diferente um do outro, e a diversidade haplotípica (h), que representa a probabilidade de que dois indivíduos retirados ao acaso de uma amostra possuam haplótipos distintos, foram calculadas para a espécie como um todo e para os diferentes Grupos utilizando o programa DNAsp (ROZAS *et al.* 2003). A relação filogenética entre os distintos haplótipos foi reconstruída através de uma rede de haplótipos por meio do método de *median joining* no programa Network (BANDELDT, *et al.* 1999).

A fim de proporcionar uma melhor interpretação dos resultados das diversidades haplotípica e nucleotídica do marcador molecular escolhido, foi realizada uma comparação de diferentes parâmetros de diversidade gênica entre *P. incerta* e outras espécies de Procellariiformes, utilizando dados publicados. Além dos valores de H_d e π , foram comparados os resultados da razão entre o número de haplótipos encontrados e o tamanho amostral e o número de sítios variáveis a cada 100 pb (Tabela 2).

O grau de dissimilaridade existente entre os Grupos 1 e 2 foi avaliado pelo programa Arlequin por meio de dois índices: um utilizando apenas a frequência dos haplótipos encontrados em cada população (F_{ST} , WEIR; COCKERHAM, 1984), com 10000 permutações; e outro pela frequência e o número de diferenças nucleotídicas existentes entre

cada par de haplótipos considerados (ϕ_{ST}), utilizando como modelo de substituição Kimura 2P (KIMURA, 1980) com parâmetro de taxa α de 0,47 (Marshall; Baker, 1997; Smith *et al.*, 2007) e 10000 permutações. O nível de significância para ambas as estimativas foi de 0,05.

As estatísticas D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997) foram calculadas no mesmo programa em 1000 simulações, tanto para a amostragem total quanto para cada grupo amostral, com o objetivo de verificar sinais de expansão populacional significativa na espécie. Valores negativos de ambos os testes sugerem expansão populacional, enquanto valores positivos indicam a existência de gargalo populacional ou alguma forma de seleção balanceadora (TAJIMA, 1989; FU, 1997). Outra análise realizada para testar a hipótese de expansão populacional foi a frequência da distribuição de diferenças par a par entre sequências de DNA (*mismatch distribution*), essa distribuição é multimodal para populações em equilíbrio demográfico e unimodal para populações que passaram por expansão demográfica (SLATKIN; HUDSON 1991, ROGERS; HARPENDING 1992).

2.1.5 Determinação molecular do sexo

A determinação molecular do sexo foi realizada a partir da amplificação dos genes CHD1W e CHD1Z, encontrados nos cromossomos W e Z, respectivamente. A presença de íntrons de tamanhos diferentes nesses genes diferencia os produtos dos cromossomos W e Z no gel de agarose durante a eletroforese. As fêmeas, por representarem o sexo heterogamético (ZW), foram identificadas por duas bandas no gel de agarose, enquanto os machos, homogaméticos (ZZ), por uma única banda (FRIDOLFSSON; ELLEGREN, 1999).

Os *primers* utilizados para a determinação molecular do sexo foram 2550F 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3' e 2718R 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3' (FRIDOLFSSON; ELLEGREN, 1999). O volume final das reações de amplificação foi de 25 μ l contendo 1X *GoTaq Green Master Mix*, 0,4 μ M de cada primer, 8,5 μ l de água ultra pura e 100 ng de DNA. As amplificações dos genes CHD1W e CHD1Z foram realizadas no termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad), sob as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida de 29 ciclos a 94 °C por 1 min, anelamento a 51 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 5 mins. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com GelRedTM (Biotium) e visualizado em luz ultravioleta.

A razão sexual foi calculada pela divisão entre o número total de machos e fêmeas identificados em toda a amostra e nos diferentes grupos amostrais.

2.1.6 Análises sobre o furacão Catarina

Com o objetivo de verificar se o trajeto do furacão Catarina coincidiu com áreas de grande abundância da espécie, utilizou-se imagens de satélites georeferenciadas do evento (Figura 3) para plotar as áreas atingidas pelo furacão no mapa da densidade da espécie (Figura 4).

2.2 Resultados

2.2.1 Descrição e análises da RC I do DNAm

Foram analisadas sequências de 391 pares de base (pb) do domínio I da Região Controladora do DNAm de 43 indivíduos do Grupo 1 e 11 indivíduos do Grupo 2. No total, foram encontrados 31 haplótipos (h), com 20 sítios variáveis (Tabela 1). No Grupo 1 foram encontrados 22 haplótipos e no Grupo 2 11 haplótipos foram amostrados. Os índices de diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) para a amostragem total, foram de $0,793 \pm 0,054$, e $0,00835 \pm 0,00075$, respectivamente. As diversidades nucleotídicas e haplotípicas, calculadas para cada grupo amostral, estão demonstradas na Tabela 1. (Tabela 1).

O domínio I da Região Controladora do DNAm em *P. incerta* mostrou-se relativamente pouco variável quando comparado com outras espécies da mesma ordem e pertencentes a diferentes categorias de ameaça.

Tabela 1. Haplótipos encontrados na região controladora do DNA mitocondrial de *Pterodroma incerta* na costa do Rio Grande do Sul, com a indicação dos sítios variáveis, frequência haplotípica em cada grupo amostral, bem como suas diversidades haplotípicas (H_d) e nucleotídicas (π) e seus respectivos desvios padrão.

	Sítios variáveis																	Frequência				
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	Grupo 1	Grupo 2
	5	8	9	0	0	0	2	3	3	3	3	4	8	8	9	9	0	1	2	3		
	0	1	7	4	5	7	6	2	6	7	8	2	2	7	2	4	9	9	2	0		
Hap_1	T	A	G	G	A	T	A	T	G	A	T	T	T	T	A	G	G	A	G	A	0	1
Hap_2	.	.	.	A	C	C	G	.	.	.	G	.	G	1	1

Hap_3	. . . A C G G	0	1	
Hap_4	. . . A C C	0	1	
Hap_5	. G A A G . C C . G A G	0	1	
Hap_6	. . . A G G C C C G . G	0	1	
Hap_7	. . . A . G G	0	1	
Hap_8	. G . A C C . G A . G . G	0	1	
Hap_9	. . . A A . . C C A G	0	1	
Hap_10	. . . A C C . G A A . . G	0	1	
Hap_11	. G . A G . C G	0	1	
Hap_12	. . . A C . G A G	1	0	
Hap_13	. . . A C C . G A G	4	1	
Hap_14	C . . A G . C C . G A G	1	0	
Hap_15	. . . A G G G . G	1	0	
Hap_16	. . . A . . G C C G . G	1	0	
Hap_17	. . . A C . G A	1	0	
Hap_18	C . . A C . . . C C . G A . G . G	1	0	
Hap_19	. . . A C . . G A . G . G	1	0	
Hap_20	. . . A . G G G	1	0	
Hap_21	. G . A C C C G . G	1	0	
Hap_22 C . . G . . G . G	1	0	
Hap_23	. . . A C . . G . . G . G	1	0	
Hap_24	. . . A G . C C . G A	1	0	
Hap_25	. G A A C C . G A G	1	0	
Hap_26	. . . A C . G G	1	0	
Hap_27	. . . A C C . G A G	1	0	
Hap_28 C G . G	1	0	
Hap_29	. . . A C . . . C C . G A . G . G	1	0	
Hap_30	. . . A C C . G A G	1	0	
Hap_31 C C G	29	0	
		Hd	0,701	1
		Desvio padrão	± 0,071	± 0,039
		Π	0,00726	0,01218

Desvio padrão	$\pm 0,00089$	$\pm 0,00109$
---------------	---------------	---------------

Fonte: Autora, 2017.

Tabela 2. Tabela comparativa da Região Controladora do DNAm entre diferentes espécies da ordem Procellariiformes. N= tamanho amostral, H= número de haplótipos, H/N= razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral, Hd= diversidade haplotípica, S/100pb= número de sítios variáveis por 100pb (via regra de três), π (%)= diversidade nucleotídica em porcentagem. Status de conservação: EN= Em Perigo, LC= Pouco Preocupante, CR= Criticamente Ameaçada, NT= Quase Ameaçada.

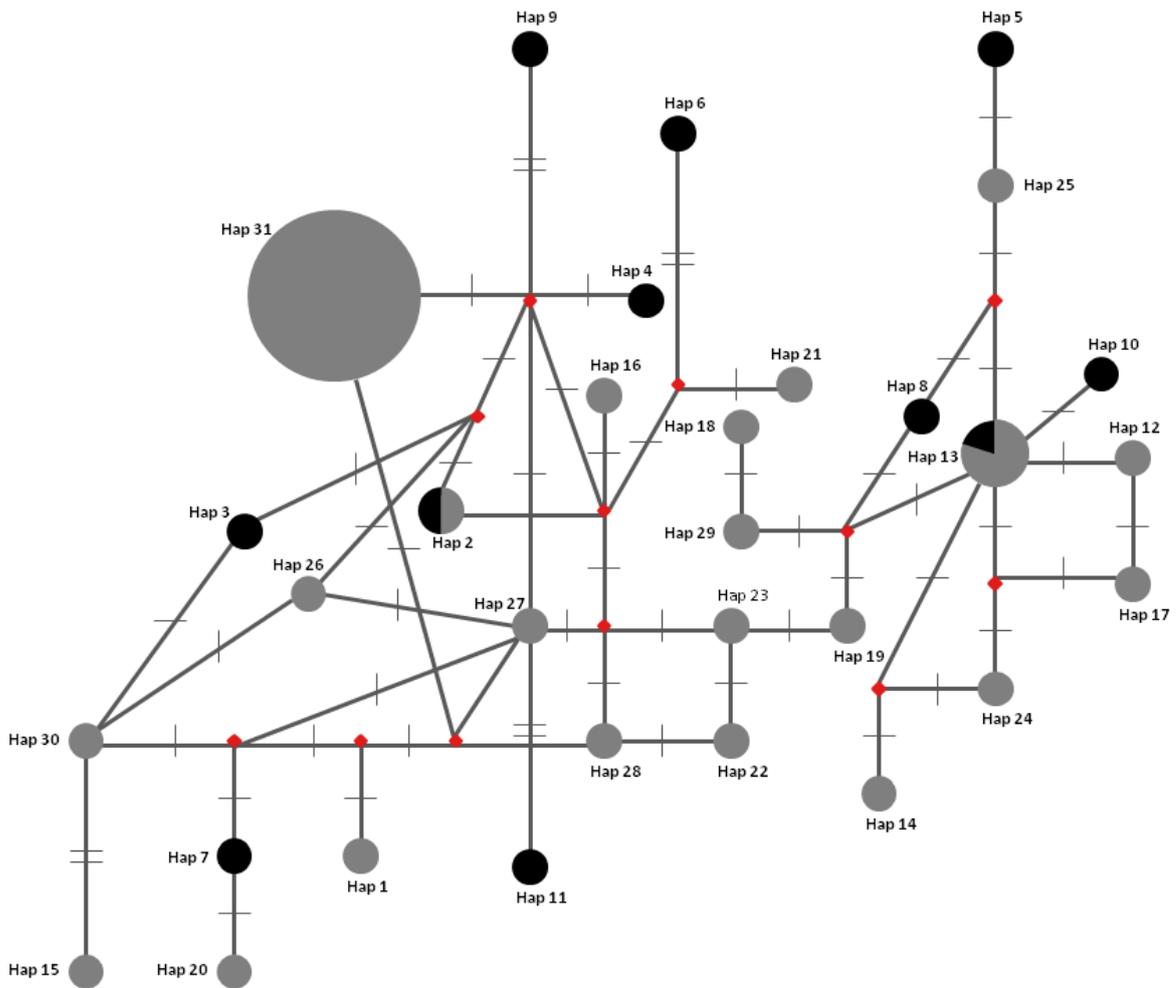
Família	Nome científico	Status de conservação**	N	Marcador	H	H/N	Hd	S/100pb	π (%)	Referências
Procellariidae	<i>Pterodroma incerta</i>	EN	64	CR I (390pb)	31	0,48	0,79	5,12	0,84	Autora, 2017
	<i>Pterodroma macroptera</i>	LC	390	CR I (373pb)	79	0,20	0,96	13,14	1,90	LAWRENCE <i>et al.</i> , 2014
	<i>Pterodroma magentae</i>	CR	90	CR I (315pb)	20	0,22	0,92	10,16	2,23	LAWRENCE <i>et al.</i> , 2008
	<i>Puffinus mauretanicus</i>	CR	70	CR (300pb)	34	0,48	0,96	14,33	2,80	GENOVART <i>et al.</i> , 2006
	<i>Calonectris</i> spp. (<i>C. diomedea diomedea</i> e <i>C. diomedea borealis</i>)*	LC	241	CR I(293 pb)	134	0,56	0,84 - 1,00	19,45	1,80 - 3,40	GÓMEZ-DÍAZ <i>et al.</i> , 2009
	<i>Fulmarus glacialis</i> (Atlantic population)	LC	78	CR (228 pb)	30	0,38	-	10,96	0,85	KERR; DOVE <i>et al.</i> , 2013
	<i>Fulmarus glacialis</i> (Pacific population)	LC	53	CR (228 pb)	32	0,60	-	9,65	1,31	KERR; DOVE <i>et al.</i> , 2013
Hydrobatidae	<i>Oceanodroma castro</i>	LC	64	CR I II (446 pb)	47	0,73	0,98	9,87	1,00 - 1,40	SMITH; FRIESEN, 2007
Diomedidae	<i>Thalassarche melanophris</i>	NT	56	CR I (219pb)	42	0,75	0,91	24,66	2,21	BURG; CROXALL, 2001
	<i>Thalassarche chrysostoma</i>	EN	50	CR I (220pb)	39	0,78	0,97	18,18	3,00	BURG; CROXALL, 2001

* No ano da publicação do trabalho de Gómez (2009) *C. diomedea diomedea* e *C. diomedea borealis* eram tratados como subespécies. Atualmente, são consideradas espécies ** Fonte: BirdLife International (2016).

Fonte: Autora, 2017.

Dentre todas as amostras, apenas três haplótipos foram encontrados em mais de um indivíduo (Hap_2 , Hap_11 e Hap_31), mas o Hap_31 representou mais da metade dos espécimes do Grupo 1. No Grupo 2, todos os haplótipos foram exclusivos para cada indivíduo e somente dois haplótipos foram compartilhados com o Grupo 1 (Hap_2 e Hap_11) (Tabela 1). Contudo, a rede de haplótipos indica que todos os indivíduos se agrupam em um único grupo sem uma clara separação entre eles (Figura 1).

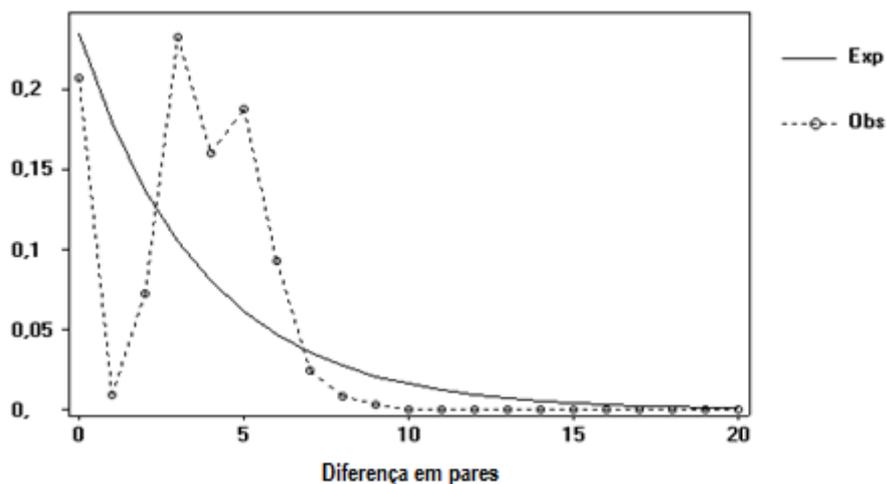
Figura 1. Rede de haplótipos encontrados nos grupos de *Pterodroma incerta* amostrados no litoral do Rio Grande do Sul. O tamanho dos círculos é proporcional a frequência dos haplótipos na amostra, os círculos cinza representam os haplótipos encontrados no Grupo 1 e os pretos no Grupo 2. Os traços nos ramos entre os haplótipos correspondem a um passo mutacional, os losangos vermelho representam um vetor médio.



Fonte: Autora, 2017.

O valor de F_{st} foi de 0,1685 ($P < 0,001$), indicando uma grande diferenciação genética entre os grupos segundo Wright (1978). O valor de ϕ_{St} foi de 0,07337 ($P < 0,05$), evidenciando também uma alta diferenciação entre os grupos. Foram encontrados valores negativos para os testes D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997), porém, somente os P -valores de F_s foram significativos (Tabela 3), sugerindo uma possível expansão do tamanho populacional. Contudo, o gráfico gerado a partir dos dados obtidos pela análise da distribuição de *mismatch* apresentou um padrão multimodal característico de populações com tamanhos estáveis (Figura 2) (SLATKIN; HUDSON 1991, ROGERS; HARPENDING 1992). A rede de haplótipos (Figura 1) também não apresentou indícios de expansão por não possuir um formato estrelar.

Figura 2. Distribuição de frequências em pares (*mismatch distribution*) de todo o conjunto amostral de *Pterodroma incerta* amostrados no litoral do Rio Grande do Sul. A linha contínua indica a tendência do modelo (Exp) e a linha pontilhada indica a tendência obtida pelos valores da análise (Obs).



Fonte: Autora, 2017.

Tabela 3. Resultados dos testes D de Tajima e Fs de Fu e seus respectivos níveis de significância para *Pterodroma incerta* amostrados no litoral do Rio Grande do Sul.

	D de Tajima		Fs de Fu	
	D	P	Fs	P
Amostra total	-0,701114	P>0,01	-24,546	P<0,01
Grupo 1	-0,78400	P>0,01	-13,145	P<0,01
Grupo 2	-0,57038	P>0,01	-7,253	P<0,01

Fonte: Autora, 2017.

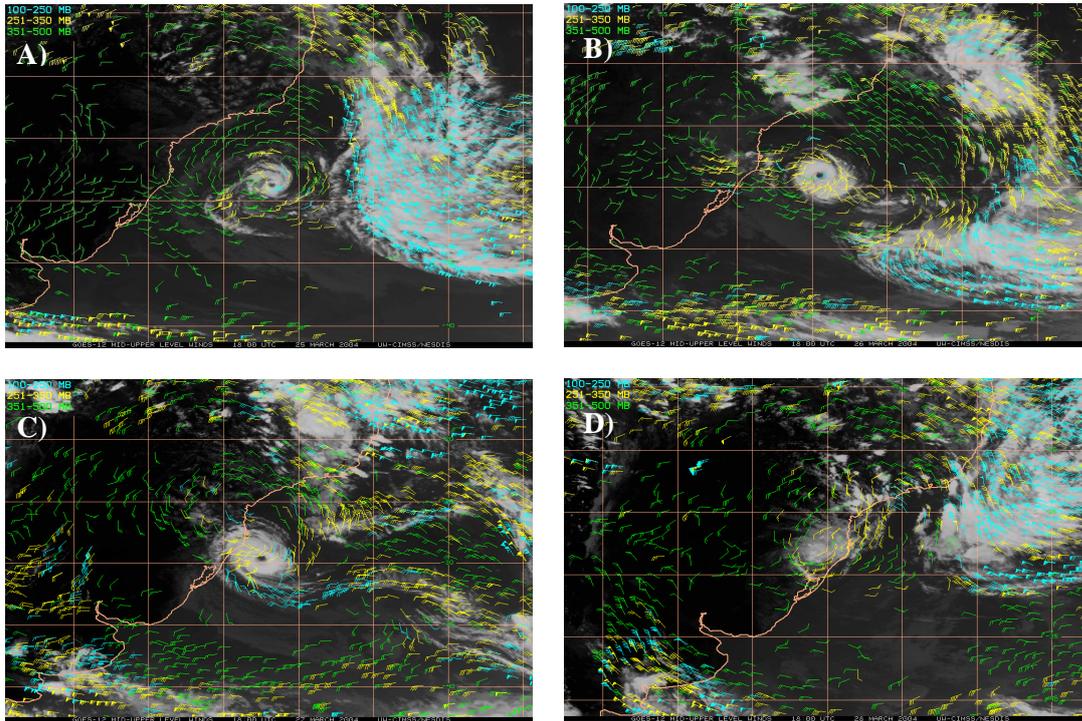
2.2.2 Proporção sexual

Foi realizada a determinação molecular do sexo de todos os indivíduos, totalizando 18 machos e 46 fêmeas resultando em uma proporção sexual de 1:2,4 (machos:fêmeas). Entretanto, quando os grupos foram analisados separadamente essa proporção mudou. No Grupo 1 foram observados 13 machos e 40 fêmeas (1:3,1), já no Grupo 2 cinco machos e seis fêmeas (1:1,2).

2.2.3 Análises sobre o furacão Catarina

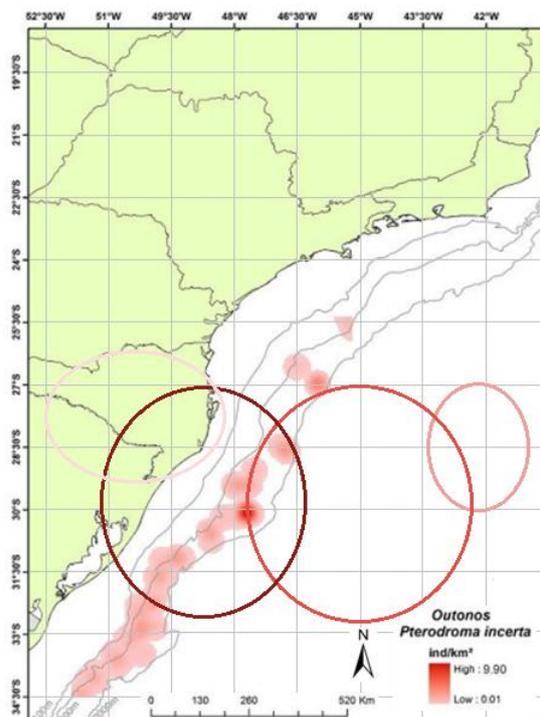
Quando as áreas atingidas pelo furacão Catarina (Figura 3) foram plotadas no mapa de densidade da espécie no Sul do Brasil (RONCONI, 2011), ficou evidente que o furacão passou pelas áreas de maior abundância da espécie, levando os indivíduos utilizados nesse estudo (Grupo 1) ao continente. Vale ressaltar que esse evento climático ocorreu em 2004 e o mapa elaborado por Roncone (2011) compreende os anos entre 2009 e 2011 (Figura 4), porém, as expedições de outono compreenderam o mês que ocorreu o furacão (março).

Figura 3. Imagens georeferenciadas de satélite do furacão Catarina nos dias 25/03, 26/03, 27/03, 28/03 de 2014 nas figuras A, B, C e D, respectivamente.



Fonte: http://tropic.ssec.wisc.edu/storm_archive/brazil/brazil.html

Figura 4. Áreas atingidas pelo furacão Catarina em 2014, plotadas no mapa de densidade da de *Pterodroma incerta*. Os círculos rosa médio, vermelho, vermelho escuro e rosa claro indicam a área estimada da localização do furacão nos dias 25/03, 26/03, 27/03 e 28/03, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Ronconi (2011).

2.3 Discussão

2.3.1 Descrição e análises da RC I do DNAm_t

A variabilidade genética tem sido um parâmetro bastante utilizado em estudos que visam avaliar o estado de conservação das espécies e suas probabilidades de persistência em longo prazo (SPIELMAN *et al.*, 2004; REED, FRANKHAM, 2003; EVANS *et al.* (2008)). No caso de *P. incerta*, embora 31 haplótipos distintos tenham sido encontrados, a Região Controladora do DNAm_t se mostrou pouco variável em comparação a outros Procellariiformes. Mais do que isso, a comparação com dados da literatura evidencia que esta região é notavelmente variável dentro dos Procellariiformes, independentemente do *status* de conservação das espécies. Por exemplo, *P. magentae*, considerada CR (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016), apresentou uma Hd de 0,92 e π de 2,23% (LAWRENCE, 2008a). Posteriormente, um novo estudo mostrou que os índices de Hd não eram significativamente diferentes entre populações modernas e subfósseis (LAWRENCE, 2008b). Porém, essa variabilidade, que se manteve constante entre populações ancestrais e modernas, tende a diminuir em apenas uma geração, pois, filhotes apresentaram uma menor Hd quando comparados com os adultos na população atual (LAWRENCE, 2008a).

Outra espécie considerada CR (BIRDLIFE INTERNACIONAL, 2016), *Puffinus mauretanicus*, apresentou altos valores de diversidade gênica e nucleotídica (Hd = 0,96 e π = 2,80%) (GENOVART, 2006) com tamanho populacional estimado entre 23.780 e 26.535 indivíduos (ARROYO *et al.* 2016). Essa alta variabilidade é explicada pelo fato de que não houve tempo de latência necessário para que houvesse a diminuição da variabilidade genética após o decréscimo populacional (GENOVART, 2006).

Embora o domínio I da Região Controladora do DNAm_t em *P. incerta* tenha se mostrado pouco variável em comparação com outras espécies da mesma ordem e pertencentes a diferentes categorias de ameaça, quando os grupos amostrais foram analisados separadamente, o Grupo 1 teve índices de Hd e π menores do que o Grupo 2. Houve apenas dois haplótipos compartilhados entre os grupos, sendo que o haplótipo que representou mais da metade nos espécimes do Grupo 1 (Hap_31) não esteve presente no Grupo 2. Além de exibirem diferentes índices de Hd e π , os dois grupos amostrais se mostraram geneticamente altamente diferenciados, segundo os valores de Fst e ϕ St, esses resultados podem indicar uma

subdivisão populacional (HARTL; CLARK, 2010). Embora a rede de haplótipos não tenha apresentado uma separação clara entre os grupos amostrais, a espécie pode estar populacionalmente estruturada na ausência de barreiras físicas ou não físicas reconhecíveis, ou até mesmo por processos comportamentais, como a filopatria e diferentes áreas de forrageamento durante o período não reprodutivo, esses aspectos podem limitar o fluxo de genes (FRIESEN *et al.*, 2006; 2007). Por exemplo, populações geneticamente distintas de *Pterodroma cokii* apresentaram diferentes áreas de forrageamento no período não reprodutivo, esse fator aliado a filopatria restringiu o fluxo gênico entre as populações (RAYNER *et al.*, 2010; 2011).

Apesar de *P. incerta* ter uma distribuição mais ampla, há indícios de que a espécie se reproduza somente na ilha Gough, pois, a espécie não foi mais registrada na ilha de Tristan da Cunha há 35 anos (BIRDLEFE INTERNATIONAL, 2016; RICHARDSON, 1984). Ela também está ausente na ilha Nighthgale, onde não existe um habitat adequado à reprodução, e provavelmente também na ilha Inaccessible, embora ainda faltem pesquisas na estação reprodutiva de inverno (ANGEL; COOPER, 2006). Sendo assim, considerando que a espécie parece reproduzir apenas na ilha Gough e observando a alta diferenciação genética encontrada em *P. incerta* nesse estudo nos diferentes grupos amostrais, possivelmente essa ilha é utilizada por distintas subpopulações ou populações dessa espécie que podem apresentar diferentes padrões de migração, incluindo diferenciadas áreas preferenciais de alimentação. A utilização da mesma colônia por diferentes populações é comumente registrada em outras espécies de aves marinhas. Por exemplo, populações de *Oceanodroma castro* utilizam as mesmas ilhas para reprodução em diferentes períodos do ano (HARRIS, 1969; SNOW; SNOW, 1966). Essas populações sazonais apresentam níveis baixos, porém significativos, de diferenciação da região controladora do DNAm (SMITH; FRIESEN, 2007). Entretanto, ainda são necessárias novas pesquisas sobre a distribuição espacial e temporal de *P. incerta* na colônia aliadas a estudos genéticos, assim será possível definir quantas populações utilizam essa colônia.

Além disso, é necessário entender a história demográfica dessa espécie. O valor negativo de F_s com P significativo para a amostragem total indicou expansão populacional. No sentido oposto, o padrão bimodal da distribuição *mismatch* e a configuração não estrelar da rede de haplótipos suportaram a hipótese de uma estabilidade do tamanho da população. Seria de grande importância uma estimativa histórica do tamanho efetivo populacional para possa determinar se a espécie passou ou não por eventos de expansão ou decréscimo

demográfico. Recentemente, foram realizadas estimativas que inferiram uma estabilidade no tamanho populacional em *P. incerta*, por meio de monitoramentos realizados entre 2001 e 2012 da densidade de ninhos em na Ilha Gough (REXER-HUBER, 2015). Entretanto, a densidade e a distribuição de ninhos em toda a ilha ainda são desconhecidas, não havendo assim, uma estimativa detalhada da área de reprodução total da espécie (REXER-HUBER, 2015).

2.3.2 Proporção sexual e inferências sobre o furacão Catarina

As diferentes proporções sexuais encontradas, maior incidência de fêmeas no Grupo 1, podem ser explicadas pela possível existência de distintas zonas de distribuição para fêmeas e machos de *P. incerta* (BUGONI *et al.*, 2007). Esse padrão já foi observado em outras espécies de aves marinhas que apresentam dimorfismo sexual de tamanho, as mesmas possuem diferentes estratégias e áreas de forrageamento (por exemplo, LEWIS *et al.*, 2002; PHILIPS *et al.*, 2011; WEIMERSKIRCH *et al.*, 2012). Foi comprovado que os machos de *P. incerta* são levemente maiores que as fêmeas, por apresentarem diferenças significativas em nove tipos de medidas morfométricas (DAUDT, 2014) e, portanto, é possível que haja essa distinta distribuição espacial entre machos e fêmeas para a espécie (DAUDT, 2014; BUGONI *et al.*, 2007).

Por outro lado, também é possível que exista uma diferente distribuição temporal entre machos e fêmeas de *P. incerta* no litoral do RS, pois, os grupos amostrais foram coletados em diferentes épocas do ano. As distintas necessidades energéticas para machos e fêmeas, além de explicar diferenciação entre zonas de forrageamento entre os sexos na fase do êxodo pré-postura (PINET *et al.*, 2012), também poderiam explicar a permanência das fêmeas na zona de forrageamento, pois, as mesmas podem precisar de uma maior reposição energética para posteriormente produzir ovócitos e ovos (DAUDT, 2014). Porém, é necessário saber se machos e fêmeas da espécie chegam ao mesmo tempo na colônia reprodutiva, padrão observado em *P. axillaris* (RAYNER *et al.*, 2012), ou se os machos chegam antes que as fêmeas, como observado em *P. macroptera* (FALLA, 1934 *apud* IMBER, 1974). Caso a segunda opção seja verdadeira para *P. incerta*, a proporção de 1:3,1 encontrada no Grupo 1 poderia ser explicada, pois, os machos já estariam rumo à ilha Gough no final de março. Já os espécimes do Grupo 2 coletados nos meses de verão estariam no período não reprodutivo de forrageamento na costa Sul do Brasil (RAMOS *et al.*, 2017), e por essa razão, não houve uma

discrepância entre o número de fêmeas e machos nesse grupo. Deste modo, é evidente a necessidade da realização de novos estudos para que se possa compreender a distribuição espaço-temporal de ambos os sexos de *P. incerta* no oceano.

Ramos *et al.* (2017) estudaram a distribuição de oito espécies do gênero *Pterodroma*, utilizando geolocalizadores, no Oceano Atlântico em estações reprodutivas e não reprodutivas. Entre os anos de 2010 e 2014, 15 indivíduos de *P. incerta* foram monitorados. A data de chegada na colônia reprodutiva variou entre os dias 29 de fevereiro e 18 de abril. Sendo assim, baseado nesses dados e em estudos anteriores onde foi constatado que a grande maioria dos espécimes trazidos pelo furacão estava com penas primárias em muda, e que as fêmeas apresentaram ovócitos em maturação e os machos possuíam um tamanho considerável dos testículos (DAUDT, 2014), acredita-se que a grande maioria desses indivíduos estavam no período de êxodo pré-postura, e portanto, preparados para voltar à colônia quando foram atingidos pelo Catarina (DAUDT, 2014; BUGONI *et al.* 2007).

3 CONCLUSÃO

Houve uma alta diferenciação genética entre os grupos amostrais (Grupo 1 e Grupo 2) sugerindo uma subdivisão populacional, aparentemente não houve eventos de expansão populacional na amostra total. Esses resultados sugerem que a Ilha Gough é utilizada por mais de uma subpopulação ou população dessa espécie e esses diferentes grupos podem estar distribuídos em áreas distintas no oceano no período não reprodutivo. Além disso, houve uma marcante diferença entre essas amostragens no que se refere a proporção sexual, essa discrepância pode estar associada a diferentes distribuições espaço-temporal entre os sexos no oceano. O presente trabalho foi pioneiro na descrição da diversidade genética para essa espécie e será uma importante ferramenta na reavaliação do *status* de conservação da mesma. Mesmo assim, sugerimos que novos estudos sejam realizados com marcadores nucleares, pois, a análise exclusiva do DNAm_t pode não representar a real estruturação populacional da espécie, por considerar somente a herança matrilinear. Portanto, ainda é necessária a combinação de estudos genéticos com levantamentos da distribuição espacial e temporal em todas as colônias reprodutivas, para que assim, se possa analisar se a espécie está estruturada populacionalmente e como essas populações se distribuem e utilizam os locais de reprodução.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. L. *et al.* An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche* albatrosses. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 11, p. 3605-3613, 2005.

ANGEL, A.; COOPER, J. **A Review of the Impacts of Introduced Rodents on the Islands of Tristan da Cunha and Gough**. Sandy: Royal Society for the Protection of Birds, 2006.

ARROYO, G. M. *et al.* New population estimates of a critically endangered species, the Balearic Shearwater *Puffinus mauretanicus*, based on coastal migration counts. **Bird Conservation International**, v. 26, n. 1, p. 87-99, 2016.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16: 37-48, 1999.

BOURNE, W. R. P.; CURTIS, W. F. South Atlantic Ocean. **Sea Swallow**, Chesham, England, v. 34, p. 18-28, 1985.

BURG, T. M.; CROXALL, J. P. Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 11, p. 2647-2660, 2001.

BENCKE, G. A. *et al.* Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 100, n. 4, p. 519-556, 2010.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. *Pterodroma incerta*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: T22698084A95224555. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22698084A95224555.en>. Downloaded on 05 July 2017.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. *Pterodroma macroptera*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: .T45048812A95139999. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T45048812A95139999.en>. Downloaded on 05 July 2017.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. *Pterodroma magentae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: .T22698049A93658301. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22698049A93658301.en>. Downloaded on 05 July 2017

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. *Thalassarche melanophris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: .T22698375A93680491. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22698375A93680491.en>. Downloaded on 05 July 2017

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2017. *Thalassarche chrysostoma*. (amended version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22698398A112041443. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-1.RLTS.T22698398A112041443.en>. Downloaded on 05 July 2017.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. *Puffinus mauretanicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: .T22728432A94984883. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22728432A94984883.en>. Downloaded on 05 July 2017.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2017. *Calonectris borealis*. (amended version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22732244A111148655. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-1.RLTS.T22732244A111148655.en>. Downloaded on 05 July 2017

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2017. *Fulmarus glacialis*. (amended version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22697866A110669972. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-1.RLTS.T22697866A110669972.en>. Downloaded on 05 July 2017

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. *Hydrobates castro*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22735803A86227647. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22735803A86227647.en>. Downloaded on 05 July 2017.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **A range of threats drives declines in bird populations. Presented as part of the BirdLife State of the world's birds website**, 2008. Disponível em: <<http://www.birdlife.org/datazone/sowb/casestudy/120>>. Acessado em: 13/11/2014

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção. Portaria Nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da União, Nº 245, 18 de dezembro de 2014.

BUGONI, L.; *et al.* Effects of the first southern Atlantic hurricane on Atlantic petrels (*Pterodroma incerta*). The Wilson **Journal of Ornithology**, v. 119, n. 4, p. 725-729, 2007.

CARLOS, C. J. Seabird diversity in Brazil: A review. **Sea Swallow**, v. 58, p. 17-46, 2009.

CROXALL J. P. *et al.* Seabird conservation status, threats and priority actions: a global assessment. **Bird Conservation International**, 22, pp 1-34 doi:10.1017/S0959270912000020, 2012.

CUTHBERT, R. Breeding biology of the Atlantic petrel, *Pterodroma incerta*, and a population estimate of this and other burrowing petrels on Gough Island, South Atlantic Ocean. **Emu**, v. 104, n. 3, p. 221-228, 2004.

- CUTHBERT, R.; HILTON, G. Introduced house mice *Mus musculus*: a significant predator of threatened and endemic birds on Gough Island, South Atlantic Ocean. **Biological Conservation**, v. 117, n. 5, p. 483-489, 2004.
- DAUDT, N. W. **Proporção e dimorfismo sexual de tamanho em pardela-de-capuz *Pterodroma incerta* (Aves: Procellariidae) no extremo sul do Brasil.** (Monografia) Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha. Osório: Universidade Estadual do Rio Grande do Sul; 2014
- DE ANDRADE FRANCO, J. L. O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade. **História (São Paulo)**, v. 32, n. 2, p. 21-48, 2013.
- DILLEY, B. J. *et al.* Effects of mouse predation on burrowing petrel chicks at Gough Island. **Antarctic Science**, v. 27, n. 6, p. 543-553, 2015.
- ENTICOTT, J. W. Distribution of the Atlantic Petrel *Pterodroma incerta* at sea. **Atlantic**, v. 49, p. 60, 1991.
- EVANS, S. R.; SHELDON, B. C. Interspecific patterns of genetic diversity in birds: correlations with extinction risk. **Conservation Biology**, v. 22, n. 4, p. 1016-1025, 2008.
- EXCOFFIER L, LISCHER H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour** 10:564–567, 2010.
- FALLA, R. A. The distribution and breeding habits of petrels in northern New Zealand. **Records of the auckland institute and museum**, v. 1, n. 5, p. 245-260, 1934.
- FU, Yun-Xin; LI, Wen-Hsiung. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693-709, 1993.
- FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1500-1508, 1996.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. 22-29, 2003.
- FRIESEN, V. L.; GONZÁLEZ, J. A.; CRUZ-DELGADO, F. Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). **Conservation Genetics**, v. 7, n. 1, p. 105-115, 2006.
- FRIESEN, V. L.; BURG, T. M.; MCCOY, K. D. Mechanisms of population differentiation in seabirds. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 9, p. 1765-1785, 2007.
- FRIDOLFSSON, A. K.; ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of avian biology**, p. 116-121, 1999.

GENOVART, M. *et al.* What genetics tell us about the conservation of the critically endangered Balearic Shearwater?. **Biological Conservation**, v. 137, n. 2, p. 283-293, 2007.

GÓMEZ-DÍAZ, E.; *et al.* Population structure in a highly pelagic seabird, the Cory's shearwater *Calonectris diomedea*: an examination of genetics, morphology and ecology. **Marine Ecology Progress Series**, v. 382, p. 197-209, 2009.

HARRIS, Michael Philip. The biology of storm petrels in the Galapagos Islands. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 37, n. 4, p. 95-166, 1969.

HARTL, Daniel L.; CLARK, Andrew G. **Princípios de Genética de Populações -4**. Artmed Editora, 2010.

IMBER, M. J. Breeding biology of the grey-faced petrel *Pterodroma macroptera goldi*. **Ibis**, v. 118, n. 1, p. 51-64, 1976.

KERR, Kevin CR; DOVE, Carla J. Delimiting shades of gray: phylogeography of the Northern Fulmar, *Fulmarus glacialis*. **Ecology and evolution**, v. 3, n. 7, p. 1915-1930, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LAWRENCE, H. A. *et al.* High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the Chatham Island Taiko (*Pterodroma magentae*). **Conservation Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1293-1301, 2008. A

LAWRENCE, H. A. *et al.* Ancient genetic variation in one of the world's rarest seabirds. **Heredity**, v. 101, n. 6, p. 543-547, 2008. B

LAWRENCE, H. A. *et al.* New genetic approach to detecting individuals of rare and endangered species. **Conservation biology**, v. 22, n. 5, p. 1267-1276, 2008. C

LAWRENCE, H. A. *et al.* Genetic panmixia in New Zealand's Grey-faced Petrel: implications for conservation and restoration. **Emu**, v. 114, n. 3, p. 249-258, 2014.

LEWIS, S. *et al.* Sex-specific foraging behaviour in a monomorphic seabird. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1501, p. 1687-1693, 2002.

MARSHALL, H. D.; BAKER, A. J. Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of fringilline finches (*Fringilla* spp.) and the Greenfinch (*Carduelis chloris*). **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 2, p. 173-184, 1997.

MAYR, Ernst. O Desenvolvimento do Pensamento Biológico. Brasília: UnB, 1998.

MCNEELY, J. A. *et al.* Conserving the worlds biological diversity. 1990.

- MONTGOMERY, M. E. *et al.* Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. **Conservation Genetics**, v. 1, n. 1, p. 33-43, 2000.
- NUNN, G. B.; STANLEY, S. E. Body size effects and rates of cytochrome b evolution in tube-nosed seabirds. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 10, p. 1360-1371, 1998.
- PHILLIPS, R. A. *et al.* Sexual segregation in distribution, diet and trophic level of seabirds: insights from stable isotope analysis. **Marine Biology**, v. 158, n. 10, p. 2199-2208, 2011.
- PIMM, S. L.; RAVEN, P.. Biodiversity: extinction by numbers. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 843-845, 2000.
- PINET, P. *et al.* Sex-specific foraging strategies throughout the breeding season in a tropical, sexually monomorphic small petrel. **Animal Behaviour**, v. 83, n. 4, p. 979-989, 2012.
- RAMOS, R. *et al.* It is the time for oceanic seabirds: Tracking year-round distribution of gadfly petrels across the Atlantic Ocean. **Diversity and Distributions**, v. 23, n. 7, p. 794-805, 2017.
- RAYNER, M. J. *et al.* Mitochondrial DNA analysis reveals genetic structure in two New Zealand Cook's petrel (*Pterodroma cookii*) populations. **Conservation genetics**, v. 11, n. 5, p. 2073-2077, 2010.
- RAYNER, M. J. *et al.* Contemporary and historical separation of transequatorial migration between genetically distinct seabird populations. **Nature Communications**, v. 2, p. 332, 2011.
- RAYNER, M. J. *et al.* The breeding cycle, year-round distribution and activity patterns of the endangered Chatham Petrel (*Pterodroma axillaris*). **Emu**, v. 112, n. 2, p. 107-116, 2012.
- REED, H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation biology**, v. 17, n. 1, p. 230-237, 2003.
- REXER-HUBER, K. *et al.* Burrow occupancy and population size in the Atlantic petrel *Pterodroma incerta*: a comparison of methods. **Marine Ornithology**, v. 42, p. 137-141, 2014.
- RICHARDSON, M. E. Aspects of the ornithology of the Tristan da Cunha group and Gough Island, 1972-1974. **Marine Ornithology**, v. 12, p. 123-201, 1984.
- RIO GRANDE DO SUL. Decreto N° 51.797, de 08 setembro 2014. DOE n.º 173, de 09 de setembro de 2014.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H.. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.
- RONCONI, L. **Distribuição e densidade de aves marinhas ao longo da plataforma externa e talude continental do sudeste-sul do Brasil**. 54f. (Monografia) Graduação em Oceanografia – Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

- ROZAS, J. *et al.* DnaSP, DNA polymorphisms analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19 (18): 2496-2497, 2003.
- SECRETARIADO, DA CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. Panorama da biodiversidade global 3. **Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas**, 2010.
- SNOW, D. W.; SNOW, B. K. The breeding season of the Madeiran Storm Petrel *Oceanodroma castro* in the Galapagos. **Ibis**, v. 108, n. 2, p. 283-284, 1966.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Genética da Conservação. Em **Biologia Molecular e Evolução**. Ed. S.R. Matioli. Pág. 171-192. Editora Holos, São Paulo, 2001.
- SPIELMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R.. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 42, p. 15261-15264, 2004.
- SLATKIN, M.; HUDSON, R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population. **Genetics**, v. 129, p. 555-562, 1991.
- STEPHENSON, B. 2006. Petrel head. **Forest and Bird**: 32-33.
- SWALES, M. K. The sea-birds of Gough Island. **Ibis**, v. 107, n. 1, p. 17-42, 1965.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- WANLESS, R. M. *et al.* Can predation by invasive mice drive seabird extinctions?. **Biology letters**, v. 3, n. 3, p. 241-244, 2007.
- WANLESS, R. M. *et al.* Predation of Atlantic Petrel chicks by house mice on Gough Island. **Animal Conservation**, v. 15, n. 5, p. 472-479, 2012.
- WEIMERSKIRCH, H. *et al.* Changes in wind pattern alter albatross distribution and life-history traits. **Science**, v. 335, n. 6065, p. 211-214, 2012.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38: 1358-1370, 1984.
- WELCH, A. J. *et al.* Mitochondrial and nuclear DNA sequences reveal recent divergence in morphologically indistinguishable petrels. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 7, p. 1364-1377, 2011.
- WILSON, E. O. *et al.* The current state of biological diversity. **Biodiversity**, v. 521, n. 1, p. 3-18, 1988.

WORM, B. *et al.* Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. **Science**, v. 314, n. 5800, p. 787-790, 2006.

WRIGHT, Sewall. **Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations.** University of Chicago Press, 1978.

ZOTIER, R. *et al.* Biogeography of the marine birds of a confined sea, the Mediterranean. **Journal of Biogeography**, v. 26, n. 2, p. 297-313, 1999.