

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados

Heloisa Helena Linhares

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS GAIVOTÕES AO LONGO DE UM GRADIENTE
LATITUDINAL**



Belo Horizonte

2019

Heloisa Helena Linhares

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS GAIVOTÕES AO LONGO DE UM GRADIENTE
LATITUDINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Vertebrados.

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas

Área de Concentração: Genética Animal

Belo Horizonte

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

L755d	<p>Linhares, Heloisa Helena</p> <p>Diversidade genética dos gaivotões ao longo de um gradiente latitudinal / Heloisa Helena Linhares. Belo Horizonte, 2019.</p> <p>54 f. : il.</p> <p>Orientadora: Gisele Pires de Mendonça Dantas</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados</p> <p>1. Aves marinhas - América do Sul. 2. Genética animal. 3. Gavião. 4. Citocromos b. 5. Albatroz. 6. Antártica, Península. I. Dantas, Gisele Pires de Mendonça. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados. III. Título.</p>
-------	---

SIB PUC MINAS

CDU: 639.127.3

Ficha catalográfica elaborada por Fernanda Paim Brito - CRB 6/2999

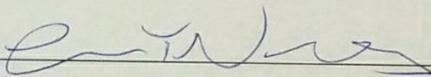
“Diversidade genética dos gaivotões ao longo de um gradiente latitudinal”

Heloísa Helena Linhares

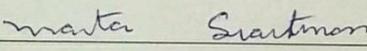
Defesa de Dissertação em 29/03/2019

Resultado: *Aprovada.*

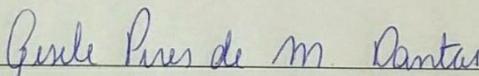
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Guilherme Tavares Nunes (UFRGS)



Profa. Dra. Marta Swartman (UFMG)



Profa. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas (Orientadora PUC Minas)

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento mais importante destes últimos dois anos de estudo e pesquisa: momento de agradecer e dedicar este trabalho lindo aqueles que foram fundamentais neste processo e, sem os quais, nada disso seria possível.

Primeiramente, quero agradecer as pessoas mais especiais que fazem parte da minha vida e contribuíram para o meu sucesso.

À Gisele Dantas, minha orientadora desde a iniciação científica e agora no mestrado. Obrigada por me acolher no seu laboratório e por todos os ensinamentos. Você é uma grande mulher e grande inspiração para esta nova geração de biólogos que está surgindo. Um exemplo de honestidade e profissionalismo que quero tomar para minha vida. Acredito que estes sejam os maiores aprendizados que levo do laboratório em todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e Evolução de Aves (LEEA): Thaís Maia, Thaís Siqueira, Amanda, Carol, Dani, Luana, Luara, Phillipe, Raiane, Luíz, Mari, Lorena e todos os outros que ficaram por pouco tempo. Vocês contribuíram com todos os momentos divertidos, todas as risadas, piadas, conselhos. Enfim, vocês tornaram o ambiente mais leve e ajudaram a suportar o estresse do dia a dia, sobretudo quando fazia um calor de 40 °C! Um agradecimento especial ao José por me ajudar nos experimentos.

A minha turma do mestrado 2017. Lembro do primeiro dia de aula, estava ansiosa e não conhecia praticamente ninguém. Mas, ainda assim, rapidamente fui acolhida pela turma e sempre me senti entre os meus. Um agradecimento especial à Amanda, Clara e Flávio, pela cerveja no Geraldinho, já que eu nunca podia pagar, rs. Vocês tornaram a experiência do mestrado inesquecível e sempre me lembrarei de vocês e das nossas prosas. Um agradecimento especial também à Rosi, pelos inúmeros convites para almoçar.

Agradeço a minha família pela força e suporte todo esse tempo. Um agradecimento especial a minha mãe, pelo suporte financeiro e ao meu pai pelas caronas para a PUC. Aos meus irmãos Flávio e Fabrício pelos conselhos e conversas sobre meu futuro. Obrigada por tudo, sem vocês eu estaria perdida!

Obrigada ao Joaquim Olinto Brando, Fausto Campos e Patricia Faria por disponibilizarem as amostras de tecido para o meu trabalho.

Quero agradecer também às instituições envolvidas: à CAPES pela bolsa taxa de mestrado; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (processos 03/01599-1, 05/55438-4, 2008/41287, 2010/52590); ao CEUA pela aprovação do projeto (Protocolo no. 010/2015); e à PUC Minas por ser minha instituição desde a graduação e onde guardo saudosas lembranças.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados por me acolher desde a iniciação científica e, posteriormente, no mestrado. Aos meus professores que passaram um pouco do seu conhecimento a nós, alunos, nos desafiando a sermos questionadores. À Cledma, o Rogerinho e à Geralda, sempre dispostos a ajudar.

Por fim, agradeço e dedico este trabalho a todas mulheres: àquelas que por opção ou necessidade se dedicam a educação dos filhos, tal como minha mãe, mas sobretudo àquelas que saíram de casa e escolheram outros destinos, senão aqueles pré-estabelecidos. A vocês cientistas, escritoras, professoras, filósofas, políticas. Vocês inspiram milhões de garotas no mundo todo e são a prova de que as mulheres são fundamentais na construção do conhecimento e de uma sociedade mais justa e igualitária.

*“(...) Dou respeito às coisas desimportantes
e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim um atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
para gostar de passarinhos (...).”*

(Manuel de Barros – O apanhador de desperdícios)

*“(...) porque a história da evolução é de que a vida escapa
a todas as barreiras. A vida se liberta, a vida se expande
para novos territórios. Dolorosamente, talvez até
perigosamente, mas a vida encontra um jeito. ”*

(Michael Crichton – Jurassic Park)

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Gaivotões (<i>Larus dominicanus</i>)	11
1.2 Propriedades do DNA mitocondrial	13
1.3 Diversidade genética e estudos com DNAm	15
1.4 Objetivo geral	19
2 METODOLOGIA	20
2.1 Área amostrada	20
2.2 Condições de PCR para Cytb	20
2.3 Análises	21
3 RESULTADOS	24
4 DISCUSSÃO	32
4.1 Variabilidade genética e história demográfica	32
4.2 Mudanças na cadeia polipeptídica	34
4.3 Diversidade populacional	35
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXO 1	49
ANEXO 2	54

RESUMO

Estudos de diversidade genética dos gaivotões (*Larus dominicanus*) são fundamentais para se entender as características ecológicas, genéticas e evolutivas que moldaram as populações dessa espécie ao longo do tempo. *Larus dominicanus* está amplamente distribuída em todo o Hemisfério Sul e é capaz de causar impactos a outras espécies de mamíferos e aves marinhas. Estudos prévios já haviam indicado uma possível seleção em genes mitocondriais dos gaivotões da América do Sul, bem como a eventos demográficos recentes e um isolamento das populações por distância. Pensando nisso, o objetivo deste trabalho é entender a história evolutiva e demográfica das populações de gaivotões na América do Sul e Península Antártica. Para tanto, foi analisado o gene citocromo b e avaliada a diversidade haplotípica (h_d), nucleotídica (π) e o theta (θ) e o desvio de neutralidade e equilíbrio através dos testes F e D de Fu e Li, F_s de Fu e D de Tajima. Foram analisadas também mudanças de aminoácidos, diversidade entre pares de populações, flutuações no tamanho populacional e estimativas de fluxo gênico. No total, 94 indivíduos do Brasil, Argentina e Península Antártica foram sequenciados e suas sequências comparadas com a sequência referência de *L. dominicanus* da Nova Zelândia. Foram identificados 18 haplótipos, com o haplótipo 18 exclusivo da Península Antártica. Sete mutações não sinônimas foram identificadas, com mudança de agrupamento polar e apolar. Uma variabilidade genética moderada foi observada nas populações da América do Sul, e a Argentina apresentou os maiores índices de variabilidade genética ($H_d=0,750$, $\pi=0,014$ e $\theta=0,0022$), resultados estes que diferem de estudos prévios de variabilidade genética para cytb de gaivotões. Os testes de neutralidade não indicaram desvio significativo de neutralidade, exceto para F_s de Fu em São Paulo e Argentina, sugerindo um processo de expansão populacional ocorrendo nessas populações, e a rede de haplótipos também indicou expansão recente. A maior parte da diversidade genética está distribuída dentro das populações e os valores de F_{ST} par a par indicaram diferenciação genética entre as populações brasileiras, argentina e antártica, possivelmente ocasionada por um isolamento por distância. A análise Bayesiana Skyline Plot indicou um aumento populacional de gaivotões há cerca de 150 anos. Assim, apesar da expansão populacional passada, as populações atuais já começam a apresentar diferenças genéticas provavelmente associadas à distância entre as localidades. A disponibilidade de alimento em regiões próximas às colônias também pode reduzir a dispersão de indivíduos.

Palavras-chave: *Larus dominicanus*. Aves marinhas. Variabilidade genética. América do Sul. Península Antártica. Seleção. Isolamento por distância. Citocromo b.

ABSTRACT

Studies of genetic diversity of kelp gulls (*Larus dominicanus*) are essential to understanding the ecological, genetic and evolutionary characteristics that shaped the populations of this species over time. *Larus dominicanus* is widely distributed in the Southern Hemisphere, being capable to cause impacts to mammals and other seabirds species. Previous studies had already indicated a possible selection in mitochondrial genes of kelp gulls from South America, as well as recent demographic events and isolation of populations by distance. Thinking of this, this study aims to understanding the evolutionary and demographic history of populations of kelp gulls on the Atlantic Coast of South America and Antarctica Peninsula. Therefore, it was analyzed the cytochrome b gene and evaluated haplotype diversity (hd), nucleotide diversity (π) and theta (θ), and deviation of neutrality and equilibrium was verified through Fu Fs' tests, Tajima D' tests, and Fu and Li tests. Also, were analyzed amino acids changes, pairwise differences, fluctuations of population size, and gene flow estimates. In total, 94 individuals from Brazil, Argentina and Antarctica Peninsula were sequenced and compared with reference sequence of *L. dominicanus* from New Zealand. 18 haplotypes were identified, with the haplotype 18 exclusive to the Antarctic Peninsula. Seven non-synonymous mutations were identified with change of polar and non-polar grouping. A moderate genetic variability was observed in the populations of South America, and Argentina showed the highest rates of genetic variability (Hd=0,750, π =0,014 and θ =0,0022), differing of previous studies about genetic variability of kelp gulls. The neutrality tests did not indicate significant deviation from neutrality, except for Fu Fs' test in São Paulo and Argentina, suggesting a process of population expansion occurring in these populations, and de haplotype network also indicate recent population expansion. Most of the genetic diversity is distributed inside of populations and the pairwise F_{ST} values indicated genetic differentiation between Brazilian, Argentina and Antarctica populations, possibly caused by isolation by distance. The Bayesian Slyline Plot indicated a population increase of kelp gulls about 150 years ago. Thus, despite past population expansion, the current populations are already showing genetic differences probably associated with the distances among localities. The availability of food in locates close to the colonies may also reduce the dispersion of individuals.

Keywords: *Larus dominicanus*. Seabirds. Genetic variability. South America. Antarctica Peninsula. Selection. Isolation by distance. Cytochrome b.

1 INTRODUÇÃO

As aves marinhas constituem um grupo de estudo fascinante, haja vista a grande diversidade de espécies existentes e sua incrível adaptação aos mais diferentes ambientes aquáticos. De fato, essas aves se adaptaram a praticamente todos os ambientes da Terra, desde os rigorosos invernos antárticos até os intensos verões das regiões tropicais, o que permitiu que pressões seletivas atuassem sobre o comportamento, a ecologia, a demografia e nas características morfofisiológicas destes animais (SCHREIBER & BURGER, 2001).

Schreiber e Burger (2001) definem as aves marinhas como aquelas que passam suas vidas no ambiente marinho, o qual incluem as áreas costeiras, ilhas, estuários, zonas úmidas e ilhas oceânicas. No Brasil, Sick (1997) distingue o ambiente marinho em ambientes costeiros ou praianos, onde ocorrem as aves que nidificam nas praias, como as gaivotas, os trinta-réis, os atobás e os tesourões; em ambientes pelágicos ou oceânicos encontram-se as aves que vivem no mar aberto e, ocasionalmente, aparecem na região costeira, como os pinguins e aves da ordem Procellariiforme; e o mar territorial brasileiro que corresponde a faixa de extensão de 200 milhas do litoral e ao redor das ilhas oceânicas.

As aves marinhas são caracterizadas por terem vida longa, de 20 a 60 anos, idade reprodutiva tardia, até os 10 anos de idade, ninhadas pequenas e, em muitos casos, com apenas um ovo, e períodos mais extensos de reprodução, até seis meses. Além disso, tendem a ser maiores, menos coloridas e sexualmente monomórficas, se comparadas às aves terrestres (SCHREIBER & BURGER, 2001).

Mais de 95% das aves marinhas são coloniais, sendo que algumas colônias podem ser muito pequenas e outras podem alcançar até milhões de pares (SCHREIBER & BURGER, 2001). Para as aves, o termo colônia se refere a um grupo de indivíduos em um local de reprodução, onde os pares têm os mesmos vizinhos nas mesmas posições espaciais durante a maior parte da estação reprodutiva, o que permite que os indivíduos desenvolvam interações mais complexas que poderão se acumular ao longo do tempo (COULSON, 2001). Algumas hipóteses levantadas para a formação de colônias seriam uma limitação do espaço, o que resultaria em agrupamentos de indivíduos; defesa contra predação, uma vez que uma grande quantidade de indivíduos confunde ou intimida os predadores; escolha por locais aparentemente seguros, sendo que a presença de filhotes nas colônias é um indicativo segurança no local; estimulação social na qual há uma sincronia entre os tempos de postura

dos ovos que seria vantajosa para os indivíduos; e um ajustamento da estação reprodutiva em relação às condições ambientais, sendo mais efetivo nos indivíduos que vivem em colônias, por conta da estimulação social (COULSON, 2001).

Como consumidores, as aves marinhas são encontradas na maioria dos níveis tróficos da cadeia alimentar marinha, desde petréis que se alimentam de zooplâncton, aos gansos e algumas espécies de pinguins que se alimentam de peixes pelágicos e lulas (SHEALER, 2001). No caso das gaivotas, estas são geralmente onívoras e se alimentam de peixes mortos, animais atropelados nas estradas e em depósitos de lixo, e os gaivotões (*Larus dominicanus*) têm por hábito deixar cair os ovos roubados para quebrá-los (SICK, 1997). Além disso, as aves marinhas são incapazes de eliminar todo o teor de cloreto de sódio consumido com a água salgada. Assim, estes animais apresentam glândulas supra-orbitais que funcionam como secretoras de sal, de forma a se eliminar o excesso de sais e manter o equilíbrio hídrico (SICK, 1997).

Diversos fatores ambientais influenciam no ciclo reprodutivo, tais como temperatura, importante sobretudo para as aves que se reproduzem em regiões polares, subpolares e temperadas; disponibilidade de alimento que não está igualmente distribuída em todo o período reprodutivo das aves, devido às flutuações sazonais que acabam por regular os ciclos de nidificação das aves marinhas; idade e experiência dos indivíduos; duração da luz do dia, dentre outros (HAMMER et al., 2001). Além disso, enquanto é comum às aves terrestres o uso do mesmo habitat para reprodução e forrageio, as aves marinhas utilizam habitats distintos, nidificando em terra e forrageando em águas estuarinas e oceânicas (HAMMER et al., 2001). No caso das gaivotas, estas permanecem muito tempo no ninho, tanto para não expor os ovos ao sol intenso, quanto para protegê-los dos ataques de outras gaivotas (SICK, 1997).

As aves marinhas são o grupo de aves mais ameaçado, sendo que, globalmente, 28% (97 espécies) estão categorizados como “ameaçados” e, dentro destes, 5% (17 espécies) estão classificadas como “criticamente em perigo” (LASCELLES et al., 2016). O declínio das populações de aves marinhas está associado, no mar, a captura acidental, poluição, sobrepesca, produção de energia e mineração, enquanto que em terra, a invasão de espécies exóticas, espécies nativas que se tornaram superabundantes, perturbação humana com desenvolvimento urbano e armadilhas, são as causas mais apontadas (CROXALL et al., 2012). Neste sentido, as aves marinhas desempenham um papel fundamental como indicadoras do funcionamento do ecossistema marinho, provendo serviços ecossistêmicos

como a ciclagem de nutrientes, através da predação, crescimento e manutenção da vegetação nas colônias por meio da deposição de guano, dispersão de sementes e consumo de animais em decomposição (LASCELLES et al., 2016).

1.1 Gaivotões (*Larus dominicanus*)

Os gaivotões fazem parte da Família Laridae, na qual também fazem parte as espécies de trinta-réis. As gaivotas possuem uma cauda arredondada e bico curvado, sendo que no Brasil, há apenas três espécies residentes, *Larus dominicanus*, *L. maculipennis* e *L. cirrocephalus* e três visitantes setentrionais, *L. delawarensis*, *L. pipixcan* e *L. atricilla* (SICK, 1997). Por muito tempo, *L. dominicanus* (Lichtenstein, 1823) foi tratada como uma espécie monotípica, porém, reconhece-se hoje pelo menos seis subespécies distribuídas em todo o Hemisfério Sul: na África Meridional (*L. d. vetula* e *L. d. melisandae*), ilhas subantárticas (*L. d. judithae* e *L. d. austrinus*), Austrália e Nova Zelândia (*L. d. antipodus*), e na América do Sul (*L. d. dominicanus*) (BURGER et al., 2019). Sternkopf (2011, Tese PhD – University Greifswald, Alemanha) analisando três genes mitocondriais, produziu uma árvore filogenética da espécie, onde indivíduos de origem geográfica similar foram agrupados. Neste estudo, Sternkopf (2011) sugere que o grupo argentino e o grupo namibiano-chileno formariam um único grupo monofilético de aves africanas e sul americanas. Além disso, duas linhagens distintas foram encontradas, sendo a linhagem da Argentina mais relacionada às linhagens encontradas à leste. Por sua vez, Jiguet e colaboradores (2012) analisaram variações fenotípicas geográficas de *L. dominicanus* baseadas em biometria e padrões de ponta de asa e observaram que não há diferenças entre as aves que se reproduzem nas regiões da Argentina e Brasil com aquelas ocorrentes do Equador ao centro do Chile, podendo estas serem consideradas a mesma subespécie. Assim, os autores levantam a possibilidade *L. d. dominicanus* se reproduzir na costa leste da América do Sul e *L. d. vetula* no sul da África e no norte do Chile.

L. dominicanus é a espécie de gaivota mais abundante e disseminada do Hemisfério Sul, com colônias na América do Sul, África, Nova Zelândia, Austrália, ilhas subantárticas e Península Antártica (BURGER & GOCHFELD, 1996). Na América do Sul, essa espécie é encontrada na costa Atlântica desde a Terra do Fogo, no Chile, até o Rio de Janeiro, no Brasil,

e na costa do Pacífico, ocorre até Piura, no Peru (YORIO et al., 2016). Estima-se que haja entre 3,3 e 4,3 milhões de indivíduos e uma tendência ao aumento populacional, o que configura a espécie como “Pouco Preocupante” de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (2018).

O gaivotão é considerado a única espécie de grande porte, com aproximadamente 58 cm de comprimento (SICK, 1997). É branca de dorso negro, com asas na parte superior negra e pontas brancas, e bico amarelo com uma mancha ante-apical vermelha na mandíbula (SICK, 1997). As gaivotas são comumente onívoras, generalistas e oportunistas, sendo capazes de se alimentar de diferentes tipos de presas e de explorar fontes artificiais de alimentos provindos de rejeitos humanos, tais como lixos domésticos, esgotos, sobras de pescado e restos animais de abatedouros (FORDHAM & COMARCK, 1970; COULSON & COULSON, 1993; GIACCARDI et al., 1997; YORIO et al., 1998). Coulson e Coulson (1993) relataram a presença de rejeitos orgânicos e não orgânicos em pelotas recém-regurgitadas de gaivotões, na Tasmânia. Em Rawson, Argentina, foram observados gaivotões se alimentando de rejeitos domésticos em lixões na cidade (GIACCARDI et al., 1997). Já nas cidades de Itajaí e Navegantes, em Santa Catarina, foram observados um consumo significativo da ictiofauna descartada pelas embarcações voltadas para a captura de camarão (EBERT & BRANCO, 2009). Este fácil acesso a alimentos descartados livremente no ambiente tem sido associado ao aumento desordenado das populações de gaivotões, como mostra Fordham e Cormack (1970), ao observarem que na cidade de Wellington, Nova Zelândia, a expansão populacional de gaivotões ocorreu em decorrência da abundância de alimentos no local e que após um declínio na disponibilidade de comida, houve um aumento da mortalidade desses animais. Assim como, Yorio e colaboradores (1998) relataram um aumento populacional de gaivotões em Punta León, Argentina, de 3.664 a 6.500 pares reprodutivos em um período de 13 anos. Os autores atribuem o acesso a fontes artificiais de comida por estes animais como responsável por esse aumento populacional.

O aumento significativo das populações de gaivotas ocasionado pela facilidade de acesso a alimentos provindos de fontes humanas, pode trazer algumas consequências, como danos ao patrimônio, perigos para aeronaves e aeroportos e até aparecimento de parasitas e patógenos (BELANT, 1997; YORIO, 1996; YORIO et al., 1998). Belant (1997) relatou o número de ninhos de gaivotas em telhados de construções urbanas, levando a danos estruturais aos edifícios e incômodos para as pessoas que vivem nas redondezas. Yorio e colaboradores (1998) relataram problemas ocasionados por gaivotões que, de alguma forma,

interferem no tráfego de aeronaves em aeroportos da Argentina. Belant (1997) também descreve as gaivotas como portadoras de bactérias como *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. Em Rawson, Argentina, foram analisadas fezes de gaivotões e foi constatada a presença de *E. coli*, *Proteus* e *Salmonella* (GIACCARDI, 1993 apud YORIO et al. 1996). Isto sugere que as gaivotas, de um modo geral, podem ser importantes vetores de doenças entéricas para humanos (BELANT, 1997).

Gaivotões também podem influenciar outras espécies, sendo uma das principais espécies predadoras de ovos de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), na região de Punta Tombo, Argentina (YORIO & BOERSMA, 1994), competindo com os trinta-réis (*Sterna máxima* e *S. eurygnatha*) por sítios de nidificação (QUINTANA & YORIO, 1998), e predando ovos e filhotes de Biguá-de-olhos-azuis (*Phalacrocorax atriceps*) (QUINTANA & YORIO, 1998). Foram observados também ataques de gaivotões às baleias francas (*Eubalaena australis*) quando estas vêm à superfície para respirar (THOMAS, 1988). Em 2009, Sironi e colaboradores relataram ataques em 41,2% de baleias que estavam acompanhadas dos filhotes, na região da Península Valdés, Argentina. Entre 2003 e 2009, 672 baleias, das quais 91% eram filhotes, foram encontradas mortas nesta região (SIRONI et al.; 2014). Foi levantada a hipótese de que as mortes poderiam estar relacionadas às injúrias ocasionadas pelos gaivotões (MARÓN et al., 2015). Os danos nas camadas mais superficiais da pele das baleias prejudicam sua integridade e impermeabilidade, afeta sua capacidade de termorregulação, leva a desidratação e a um maior gasto de energia por causa da defesa e fuga dos gaivotões e menor tempo de repouso (THOMAS et al., 2013).

1.2 Propriedades do DNA mitocondrial

A mitocôndria é uma organela esférica e alongada distribuída no citoplasma da célula, tendendo a se acumular nos locais do citoplasma onde o gasto energético é mais intenso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A síntese de ATP está diretamente relacionada ao consumo de oxigênio, tanto que em regiões de clima mais frio, os animais tendem a consumir mais oxigênio do que os que vivem nas regiões tropicais, uma vez que aqueles requerem maiores taxas metabólicas para manter sua temperatura corporal constante (PALOKANGAS & HISSA 1971).

A mitocôndria contém seu próprio genoma, correspondente, nos animais, a uma molécula de DNA circular dupla, com exceção de alguns poucos grupos, como em algumas classes dentro do filo Cnidaria que apresentam a estrutura do DNAm linear (BRIDGE et al., 1992; CUROLE & KOCHER, 1999). Sabe-se, porém, que vertebrados, equinodermos e insetos apresentam 37 genes dos quais dois correspondem a RNA ribossômico (RNAr), 22 genes de RNA transportador (RNAt) e 13 genes de proteínas responsáveis por codificar enzimas que participam do processo de transporte de elétrons (MORITZ et al., 1987; HARRISON, 1989).

O DNA mitocondrial (DNAm) evolui mais rápido que o DNA nuclear (DNAn), sendo estimada uma taxa de evolução de cinco à 10 vezes maior que o DNAn de primatas (BROWN et al., 1979). Essa taxa de evolução rápida do DNAm é atribuída, mais possivelmente, a uma elevada taxa de mutação e de fixação, uma vez que, de acordo com um princípio elementar da evolução, esta resulta de dois processos básicos: ocorrência de mutações no DNA e fixação de mutações em populações de organismos, onde a taxa de evolução (E) será M, isto é, o produto da taxa de mutação por população, e F que representa a fração das mutações fixadas ($E = MF$) (BROWN et al., 1979; BROWN et al., 1982).

A recombinação no DNAm raramente ocorre, visto que, se a herança é somente materna, os genomas não são recombinados durante a reprodução e mesmo que eventos de recombinação ocorram, provavelmente estes novos recombinantes não representarão novos genótipos do DNAm (HARRISON et al., 1989). A falta de recombinação, erros de replicação, danos oxidativos e um sistema de reparo não muito eficaz, podem favorecer a fixação de mutações deletérias, o que leva a uma elevada taxa de evolução no DNAm (BROWN et al., 1982; WILSON et al.; 1985).

Por apresentarem herança materna, apenas as fêmeas passam seu DNAm aos seus descendentes, o que implica num tamanho efetivo populacional para DNAm menor que para o DNAn (MORITZ et al., 1987; HARRISON et al., 1989). Neste sentido, processos estocásticos representarão fatores importantes, pois irão determinar a frequência genotípica do DNAm das populações que passaram por eventos demográficos recentes (HARRISON et al., 1989; AVISE et al., 1984). Pelo fato do DNAm refletir apenas uma filogenia matriarcal, a variação do DNAm não será determinada pelo padrão de distribuição dos machos, ou seja, comparando as variações do DNAm com DNAn (transmitido por ambos os sexos), pode-se obter diferenças na estrutura das populações de machos e fêmeas (HARRISON et al., 1989).

As mutações pontuais são aquelas em que ocorrem uma mudança em um único par de bases do DNA, que poderá resultar numa **transição**, onde uma purina é substituída por outra purina (A ou G), ou uma pirimidina é substituída por outra pirimidina (T ou C), ou poderá resultar em uma **transversão**, em que uma purina é substituída por uma pirimidina, e vice-versa. Se qualquer tipo de substituição de base ocorrer em uma região codificadora de um gene, a mutação muda o códon que será lido. Assim, as mudanças na primeira e na segunda posições de um códon quase sempre trocam o aminoácido, porém, as mudanças na terceira posição quase nunca produzem troca de aminoácidos (FREEMAN, 2009). Aquelas mutações que ocasionam a troca de aminoácidos são chamadas de **substituições não-silenciosas**, ou **não-sinônimas**, e aquelas em que não ocorre mudança no aminoácido, são denominadas **mutações silenciosas** ou **sinônimas** (FREEMAN, 2009). Todos os genes mitocondriais têm taxa de substituição alta na 3ª porção do códon, porém a taxa de substituição dos aminoácidos irá variar entre eles. Portanto, todos os genes mitocondriais fornecem informações semelhantes (a cada par de base sequenciado), para táxons muito próximos (indivíduos dentro de uma espécie, por exemplo). Para os táxons mais distantes (espécies dentro de um gênero ou comparação entre várias ordens de aves, por exemplo), genes muito variáveis acumulam mais informação sobre variação na 1ª e 2ª posição do códon (SORESON, 2003).

Os aminoácidos são classificados em cinco classes principais com base em sua polaridade na cadeia lateral R. Os grupos R apolares alifáticos são hidrofóbicos e correspondem aos aminoácidos *glicina*, *alanina*, *prolina*, *valina*, *leucina*, *isoleucina* e *metionina*; os grupos R aromáticos correspondem a *fenilalanina*, *tirosina* e *triptofano* e são relativamente hidrofóbicos; os grupos R polares não carregados são mais solúveis em água e correspondem a *serina*, *treonina*, *cisteína*, *asparagina* e *glutamina*; os grupos R carregados positivamente são básicos e mais hidrofílicos, correspondendo aos aminoácidos *lisina*, *arginina* e *histidina*; e, por fim, os grupos R carregados negativamente são ácidos solúveis e correspondem ao *aspartato* e *glutamato* (NELSON & COX, 2014).

1.3 Diversidade genética e estudos com DNAm

Historicamente, a genética tem sido definida como “o estudo das diferenças entre os indivíduos” (STURTEVANT & BEADLE, 1939 apud ALLENDORF & LUIKART, 2007).

Por sua vez, a transformação da variação dos indivíduos dentro das populações para o surgimento de diferenças entre populações ou espécies pelo processo de seleção natural, será a base da mudança adaptativa evolutiva descrita por Darwin (ALLENDORF & LUIKART, 2007). Neste sentido, a genética de populações irá se ocupar da origem, quantidade e distribuição de variação genética presente em populações de organismos, bem como o destino dessa variação através do espaço e do tempo, base fundamental da mudança evolutiva (TEMPLETON, 2006).

A variabilidade genética é fundamental para se manter a aptidão dos indivíduos frente às mudanças ambientais, e a variação genética que ocorre dentro e entre as populações exerce um importante papel na manutenção dos processos evolutivos (ZINK et al., 1987; MORITZ, 2002). Em populações grandes, onde espécies são naturalmente exogâmicas, a variabilidade genética é alta, no entanto, em populações pequenas, essa variação é reduzida, levando a um perigo para a espécie (FRANKHAM et al., 2008). Além disso, em estudos filogeográficos, a variabilidade genética pode revelar informações valiosas sobre a natureza demográfica e histórica da evolução intraespecífica (AVISE, 2009). A filogeografia busca entender o padrão de distribuição de linhagens intraespecíficas ou filogeneticamente próximas, como forma de inferir histórias evolutivas dos grupos (AVISE, 2004; DANTAS et al. 2013). Dessa forma, os estudos genéticos auxiliam nas inferências de diversidade genética, de estrutura populacional e de fluxo gênico, indicando o potencial evolutivo dos indivíduos (FRANKHAM et al., 2002; LYONS et al., 2015). Neste sentido, o uso de marcadores mitocondriais e nucleares tem se mostrado muito eficaz para inferir história evolutiva de populações naturais (DANTAS et al. 2009).

A variação nos genes mitocondriais tem sido considerada neutra, isto é, isenta de seleção natural (DANTAS et al. 2015), porém, muitos trabalhos vêm contradizendo essa hipótese da neutralidade nos genes mitocondriais (BAZIN et al. 2006, YU et al. 2011, RAMOS et al. 2018). O modelo de neutralidade prediz que há um equilíbrio entre o aumento de variabilidade genética através de mutações e a perda de variabilidade através da deriva (TEMPLETON, 2006). No entanto, quando populações naturais fogem desse padrão, através de cruzamentos não aleatórios, diferença de sucessos reprodutivos associados a genótipos, redução ou expansão das populações, este modelo desvia da neutralidade e, conseqüentemente, esses eventos acabam por marcar os genomas das espécies (FREEMAN & HERRON, 2009). Bazin e colaboradores (2006) evidenciaram uma possível fixação de mutações benéficas no genoma mitocondrial de alguns vertebrados, um indicativo de seleção

positiva em alguns grupos. Yu e colaboradores (2011) estudaram o gene mitocondrial NADH2 e NADH6 em macacos *Rhinopithecus*, encontrando também evidências de seleção positiva. Dessa forma, sendo as mitocôndrias fundamentais para a produção de energia dos organismos, é esperado que se encontre diferenças ao longo da área de ocorrência das espécies de ampla distribuição.

A variabilidade genética é essencial no processo de manutenção das populações, sendo que as mudanças que ocorrem na composição genética das espécies são fundamentais, pois irão permitir que os organismos respondam às mudanças ambientais (ALLENDORF & LUIKART, 2007; FRANKHAM et al., 2008). Ramos e colaboradores (2018) demonstraram isso quando correlacionaram dados genéticos a dados ambientais de várias espécies de pinguins, como níveis de produção de clorofila nos oceanos e a temperatura na superfície do mar, constatando que alguns genes mitocondriais poderiam estar sob efeito de seleção relacionada a adaptação destes animais às diferentes condições climáticas. Por outro lado, a perda de diversidade genética irá levar à redução do potencial evolutivo dos indivíduos e, conseqüentemente, devido ao surgimento de alelos raros, à redução do sucesso reprodutivo (FRANKHAM et al., 2008). Neste sentido, as estimativas de diversidade genética permitem compreender que eventos moldaram a história evolutiva das espécies, possibilitando o monitoramento e o manejo adequado das populações naturais, minimizando a endogamia e permitindo o fluxo gênico entre populações que estejam em perigo (FRANKHAM et al., 2008).

Quantificar a variação genética dentro e entre as populações pode fornecer informações muito importantes sobre a história evolutiva da espécie em estudo. Divergências genéticas significativas entre populações são um indicativo de que não está ocorrendo fluxo gênico entre essas populações e pouca variação dentro da população mostra que esta pode ter passado por gargalos populacionais e efeitos fundadores. Por outro lado, populações em que não haja diferenciação genética significativa indicam um alto fluxo gênico ocorrendo entre elas, o que favorece a manutenção do fitness dos indivíduos e aumenta seu valor adaptativo (MORITZ, 2002; DANTAS, 2007; ALLENDORF & LUIKART, 2007).

Poucos são os processos de vicariância ou barreiras extrínsecas que possam impedir a dispersão das aves marinhas, levando à expectativa de baixa ou nenhuma estrutura populacional, com homogeneização da variabilidade genética das populações (CONGDON et al., 2000). Além disso, muitas espécies são voadoras vigorosas, sendo capazes de se dispersar

por longas distâncias, reduzindo à diferenciação genética entre as populações (GENOVART et al. 2003; SANTOS et al. 2016). Por outro lado, as aves marinhas apresentam o comportamento filopátrico, muitas são ditas monogâmicas, e ocorrem em ampla distribuição geográfica, fatores estes que podem levar à diferenciação genética substancial entre as populações (GENOVART et al. 2003; MORRIS-POCOCK et al. 2008) Assim, os gaivotões tornam-se um importante modelo para estudos filogeográficos, uma vez que sua ampla distribuição e crescimento rápido (DANTAS et al., 2012), associados aos diferentes ambientes em que esses indivíduos vivem, nos permitem traçar a história evolutiva dessa espécie.

Alguns estudos têm evidenciado uma forte diferenciação genética entre populações de aves marinhas (FARIA et al., 2010; LYONS et al., 2015; NUSS et al., 2016; NUNES et al., 2018). Enquanto espécies fragmentadas por extensões de terra e gelo irão provavelmente exibir clara estrutura populacional associada às barreiras físicas, populações não separadas por barreiras geográficas também poderão exibir estrutura genética, sugerindo a existência de outras barreiras, como as correntes oceânicas, que impedem o fluxo gênico (BURG & CROXALL, 2001; LIEBERS et al., 2001; LIEBERS & HELBIG, 2002).

Por apresentarem comportamento colonial, vida longa e serem cosmopolitas, as gaivotas são um bom modelo de estudo de processos evolutivos em aves marinhas (CROCHET et al., 2000). As aves marinhas são comumente k-estrategistas, investindo mais na sobrevivência dos indivíduos, com proles pequenas e cuidado parental (SCHREIBER & BURGER, 2002). O fato de *L. dominicanus* ser uma espécie oportunista (THOMAS, 1988; QUINTANA & YORIO, 1998) e generalista (COULSON & COULSON, 1993; GIACCARDI et al., 1997), levou a uma rápida expansão populacional, tornando os gaivotões uma praga nos ambientes costeiros, devido aos impactos causados em outras espécies. Assim, os gaivotões têm se comportado como uma espécie r-estrategista, pela sua capacidade de se reproduzir rapidamente, ao contrário de uma espécie k-estrategista cuja população é limitada pela competição (BEGON et al., 2007). Essas características, então, fazem de *L. dominicanus* a espécie adequada para estudo de variabilidade genética. Estudos anteriores com *L. dominicanus* indicaram um possível caso de varredura seletiva no DNAmT dessa espécie (DANTAS et al. 2012). Dantas e colaboradores (2012) encontraram baixa variabilidade genética em dois loci mitocondriais, o Cytb e ATPase 8 e 6, em contraste com a alta variabilidade genética no gene de DNA nuclear (DNAn - Intron7 do β -Fibriogênio). Além disso, foi constatada que *L. dominicanus* apresentava o tempo de divergência de

aproximadamente 241.200 anos atrás, e teria passado por um evento de expansão populacional há cerca de 10.000 anos. Assim esses autores propuseram a hipótese de que poderia ter ocorrido uma varredura seletiva para o DNA mitocondrial dessa espécie. Outra hipótese considerada seria decorrente o efeito fundador recente, seguido de expansão populacional, ou de perda da diversidade devido a gargalo na população fundadora, ambos processos que levariam a redução drástica da diversidade genética dos gaivotões. Santos e colaboradores (2016), empregando análises multilocus de microssatélites, evidenciaram diferenciação genética entre as populações de gaivotões da Antártica, Chile, Argentina, e Brasil, no entanto, houve baixa diferenciação dentro das populações de cada região. Os autores então atribuíram estes resultados a um possível isolamento por distância, onde há alto fluxo gênico entre as colônias mais próximas e baixo fluxo gênico entre populações mais distantes. No entanto, as hipóteses de seleção do DNAm e eventos demográficos ocorridos durante os períodos glaciais não foram descartadas.

Dentro deste contexto, *L. dominicanus* se torna um excelente modelo para estudos de processos evolutivos nos genes mitocondriais, associado à sua ampla distribuição ao longo de um gradiente latitudinal, permitindo uma análise mais precisa acerca do quanto pressões seletivas como temperatura, umidade e radiação solar podem influenciar nesses processos microevolutivos específicos que ocorrem nas populações em diferentes latitudes (HUEY et al., 2000). Dessa forma, buscando elucidar a história evolutiva e demográfica de *L. dominicanus* ao longo da América do Sul e Península Antártica, levantamos as seguintes hipóteses:

- I. As populações de *L. dominicanus* da costa Atlântica da América do Sul e Antártica apresentam diferenças relacionadas a possível seleção do DNAm.
- II. As populações de *L. dominicanus* da costa Atlântica da América do Sul e Antártica apresentam diferenças relacionadas a eventos demográficos recentes, como gargalos populacionais e efeitos fundadores.
- III. As populações de *L. dominicanus* da costa Atlântica da América do Sul e Antártica apresentam diferenças devido a um isolamento por distância.

1.4 Objetivo geral

Investigar a variação genética do gene citocromo b (Cytb), que é associado ao metabolismo energético em *L. dominicanus* ao longo de um gradiente latitudinal, na costa Atlântica da América do Sul e Península Antártica. Para tanto, temos como objetivos específicos:

- I. Avaliar se há sinais de seleção purificadora no gene mitocondrial Cytb das populações de *L. dominicanus* de colônias do Brasil (Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina), Argentina (Porto Deseado) e Península Antártica;
- II. Estimar a diversidade genética no gene mitocondrial do Cytb ao longo do gradiente latitudinal das populações de *L. dominicanus* de colônias do Brasil (Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina), Argentina (Porto Deseado) e Península Antártica;
- III. Estimar o fluxo gênico entre as populações estudadas.

2 METODOLOGIA

2.1 Área amostrada

As amostras de sangue foram coletadas de filhotes de *L. dominicanus* nas colônias durante o período reprodutivo entre os anos de 2003 e 2011 provenientes do litoral brasileiro, da costa argentina e da Península Antártica (Figura 1). Foram selecionados sete indivíduos do Rio de Janeiro, 35 de São Paulo (ilha Guararitama), 28 de Santa Catarina (Ilha Moleques do Sul e Ilha dos Lobos), 17 de Porto Deseado (Ilha Quiroga), na Argentina, e sete da Ilha Rei George, na Península Antártica.

As amostras foram conservadas em álcool 70% para análises posteriores em laboratório. Todas as amostras se encontram depositadas no Laboratório de Ecologia e Evolução das Aves (LEEA) do Programa de Pós-graduação em Biologia dos Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas (PPGBV-PUC Minas).

2.2 Condições de PCR para Cytb

Para este estudo de variabilidade genética, foi selecionado o loco mitocondrial Cytb (950 pb), amplificado através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando os

primers específicos (tabela 1). As reações foram preparadas para um volume final de 20 μ l por tubo contendo 10X tampão da *Taq polimerase* (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 2,5mM de dNTPs, 1 pmol de primer, 0,5u de *Taq polimerase* e 25 ng de DNA. Os ciclos ocorreram a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 59°C e 1 minuto a 72°C, e 7 minutos de extensão final a 72°C. Os produtos da PCR foram corridos em gel de eletroforese a 2% e aqueles que apresentarem ampliações positivas foram purificados através de PEG 8000 (20%). Para o sequenciamento, foram utilizados os mesmos primers utilizados nas PCRs e o kit de sequenciamento BigDye terminator (version 3.1) (Applied Biosystems) nas condições sugeridas pelo fabricante.

Tabela 1: Primers utilizados na reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e nas reações de sequenciamento da região mitocondrial do citocromo b (Cytb ~950pb) em *L. dominicanus*

Primers	Sequência (5' – 3')	Referência
L15008	AACTTCGGATCTCTACTAGG	Desjardins e Morais, 1990
H1532b	GAATAAGTTGGTGATGACTG	Desjardins e Morais, 1990
L14967	CATCCAACATCTGTGCTTGATGAA	Crochet et al., 2003
H15932	ATGAAGGGATGTTCTACTGGTTG	Desenhados para este estudo
L15725	AARCCMGAATGRTAYTTYCTWTTYGC	Soreson, 2003
CytbLdomR	TTTCTAGGGCTCCAATGGC	Desenhados para este estudo
CytbLdomL	CCAATGGCCCCAAATCTACG	Desenhados para este estudo
H15646	GGNGTRAAGTTTCTGGGTCNCC	Soreson, 2003

2.3 Análises

As sequências foram visualizadas no Chromaslite 2.6.6 (Technelysion) e alinhadas manualmente no Bioedit 7.0 (HALL, 1999). Posteriormente, as sequências da América do Sul foram comparadas a sequência do genoma completo de *L. dominicanus* proveniente da Nova Zelândia depositadas no Genbank (AY293619), a fim de se verificar se houve mudanças na cadeia polipeptídica. As análises descritivas de variabilidade genética, como a diversidade haplotípica (Hd), que se refere a probabilidade de duas sequências, escolhidas ao acaso na população, apresentem haplótipos distintos (NEI, 1987), a diversidade nucleotídica (π), índice que mede o grau de polimorfismo dentro de uma população, calculando as diferenças de nucleotídeos por sítio, entre duas sequências escolhidas ao acaso na população (NEI & TAJIMA, 1981), e o Theta por sítio (θ) que leva em conta o tamanho efetivo populacional e a

taxa de mutação, foram estimadas no DNAsp v.6.12.01 (ROZAS et al., 2017). Os testes de neutralidade avaliam se há um equilíbrio entre o surgimento de novas mutações e a perda de diversidade através da deriva genética, ou seja, se os polimorfismos observados fogem à neutralidade esperada. Assim, dentre os testes de neutralidade, testamos o D de Tajima, que calcula as diferenças entre os polimorfismos e o número de diferenças de nucleotídeos, baseado num modelo de infinitos sítios (TAJIMA, 1989), o D e F de Fu e Li, que também testa se todas as mutações ocorridas são neutras (FU & LI, 1993), e o F_s de Fu baseado também em um modelo de infinitos sítios, onde é testada a probabilidade de se observar uma amostragem aleatória neutra, levando em consideração o número de alelos e se estes são seletivamente neutros (FU, 1997). Todas essas análises foram estimadas no software DNAsp v.6.12.01 (ROZAS et al., 2017). Estimando as variações, é possível comparar as diferenças genéticas nas populações distribuídas latitudinalmente.

Na observação de mudanças na cadeia de proteínas, as sequências foram analisadas no software MEGA 7.0.26 (KUMAR et al., 2016), com tipo de dado selecionado para sequências de nucleotídeos, e para o código genético foi selecionado o DNA mitocondrial de vertebrados, com contagem dos aminoácidos a partir da 2ª região do códon da sequência.

Para distribuição da variação genética entre as populações, foi feita a análise de variância molecular (*Analysis of Molecular Variance* - AMOVA), que estima a variância genética em níveis hierárquicos de diferenciação, isto é, como a diversidade genética está particionada dentro e entre as populações (EXCOFFIER et al., 1992). A AMOVA irá fornecer os índices de fixação que são análogos à estatística-F de Wright (1965), sendo estes os níveis hierárquicos de diferenciação populacional: F_{CT} , correspondente a variância entre os grupos; F_{ST} , cujo valor é a variância entre populações dentro dos grupos; e o F_{SC} , que corresponde a variância dentro das populações (EXCOFFIER et al., 1992; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). O F_{ST} par a par foi utilizado para calcular a diferenciação genética entre os pares de populações, usado como uma estimativa de distância genética (EXCOFFIER et al., 1992). Para ambas as análises, foi utilizado o software ARLEQUIM v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006). As relações filogenéticas foram determinadas pela construção da rede de haplótipos no Network 5.0.1.1 (POLZIN & DANESCHMAND, 2003).

Para verificar flutuações no tamanho populacional dos gaivotões, foi utilizado o método *Skyline Plot Bayesian*, no software BEAST v. 2.5.2 (*Bayesian evolutionary analysis by sample trees*, BOUCKAERT et al., 2014). O pacote de programas do BEAST permite

fazer inferências bayesianas usando dados moleculares e estimar tempo de divergência, dentre outras aplicabilidades. A abordagem *Skyline Plot* permite a avaliação de padrões históricos de tamanhos populacionais a partir de sequências de DNA. Neste estudo, a demografia histórica da linhagem dos gaivotões foi feita a partir do *Coalescent Bayesian Skyline*. Nós assumimos um modelo de substituição HKY estimado, um relógio molecular restrito (restricted molecular clock) com taxa de substituição de 2% por milhão de anos, para citocromo b de aves ($\pm 0,1\%$, 95% intervalo de confiança, WEIR & SCHLUTER, 2008), e um comprimento de cadeias MCMC de 20 milhões amostrando a cada 1000 gerações. O programa BEAUTi 2 (BOUCKAERT et al., 2014) gerou o input data que foi rodado no BEAST. No Tracer v.1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018) foi observada a qualidade da corrida analisando as estimativas ESS (*Effective sample size*) acima de 200 e a construção do gráfico no *Bayesian Skyline Reconstruction*.

O programa DNAsp v.6.12.01 (ROZAS et al., 2017) também foi utilizado para analisar a distribuição *mismatch*, isto é, a distribuição do número de diferenças entre pares de haplótipos testando a hipótese de expansão populacional. O método de distribuição *mismatch* sugere que uma expansão populacional tende a acumular o número médio de diferenças par a par maior do que o esperado em uma situação de estabilidade populacional. Assim, uma distribuição unimodal de diferenças par a par de nucleotídeos com variância relativamente pequena, é um indicativo de expansão demográfica recente, e picos multimodais associados a uma alta variância, indicam populações demograficamente estáveis, tendo atingido o equilíbrio entre deriva e mutação (ROGERS & HARPENDING, 1992).

Para estimar fluxo gênico entre as populações, foi utilizado o método que leva em consideração a estatística F de Wright (1969) em que através do valor do F_{ST} , é possível medir a quantidade de indivíduos migrantes por geração. O fluxo gênico é a contribuição genética dos indivíduos de uma população para outra, levando em conta seu sucesso reprodutivo e a introdução dos novos alelos nessa população (HAMILTON, 2009). Assim, a medida de fluxo gênico pode ser estimada através da seguinte equação:

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

onde Nm representa o número de migrantes, sendo N correspondente ao tamanho efetivo populacional e m à taxa média de migração. F_{ST} é a divergência entre as populações (SLATKIN & BARTON, 1989). O valor de Nm está relacionado à deriva genética, em que:

$Nm > 1 \rightarrow$ indica que o fluxo gênico é a força evolutiva que determina as frequências alélicas, levando a homogeneização das populações.

$Nm < 1 \rightarrow$ a deriva genética é a força evolutiva atuante, levando à diferenciação entre populações.

3 RESULTADOS

No total, 94 indivíduos foram sequenciados para fragmentos de aproximadamente 950 pb do gene Cytb, estes sendo pertencentes a 70 indivíduos das colônias brasileiras, 17 indivíduos de Porto Deseado, na Argentina, e sete indivíduos da ilha Rei George, na Península Antártica. As sequências foram comparadas com a sequência referência do Cytb de *L. dominicanus* da Nova Zelândia, sendo observados 16 sítios polimórficos e 18 haplótipos, estes variando entre dois e cinco polimorfismos na sequência. Os haplótipos mais frequentes foram o número 3, aparecendo em 46 indivíduos e em todas as populações, exceto na Antártica, e o número 8, aparecendo em 22 indivíduos, sendo encontrado nas populações de São Paulo, Santa Catarina e Argentina. O haplótipo 18 é exclusivo da Antártica e apareceu nos sete indivíduos amostrados. O haplótipo 4 apareceu somente nas populações do Rio de Janeiro e São Paulo, em total de cinco indivíduos. Os demais haplótipos apareceram uma única vez (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Frequência de haplótipos por região. Os pontos pretos são os locais onde foram feitas as coletas. No Brasil: Ilha de São Pedro (Rio de Janeiro), Ilha de Guararitama (São Paulo) e ilhas de Moleque e Lobos (Santa Catarina). Na Argentina: Ilha Quiroga (Porto Deseado Deseado). Península Antártica: Ilha Rei George.

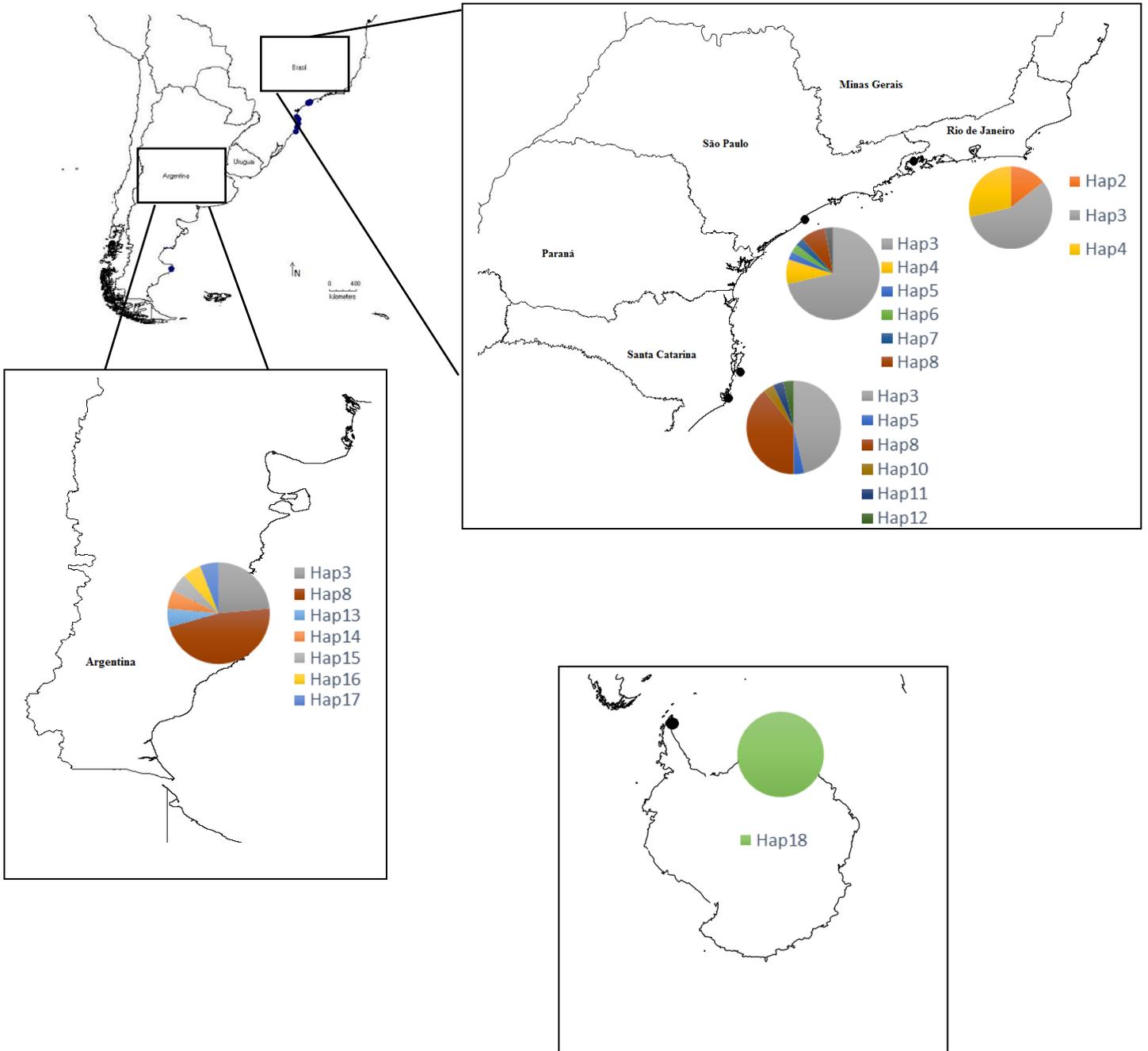
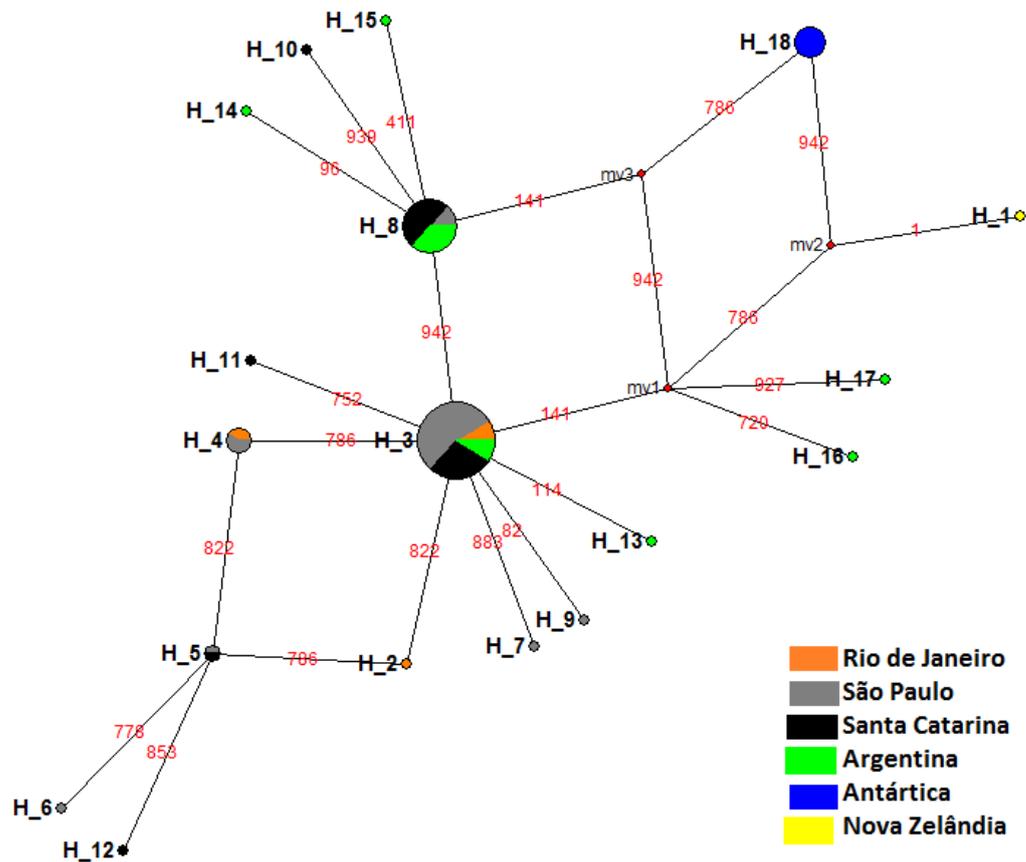


Figura 2: Rede de haplótipos representando as relações entre os haplótipos de *L. dominicanus* das regiões estudadas. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que possuem esse haplótipo. Os números em vermelho entre os ramos se referem a localização onde ocorre a mutação. As cores representam as localidades, conforme identificado na legenda



Também foram observadas mudanças na cadeia polipeptídica, em que algumas mudanças de base ocasionaram mudanças de aminoácidos, quando comparado com a sequência referência do haplótipo 1 da Nova Zelândia (Tabela 2, Anexo 1). Ao todo, houve a mudança de sete aminoácidos nos indivíduos da América do Sul e Antártica. Destes, não houve mudança de agrupamento R com a mudança do aminoácido em A280G e L289M, estes dentro do grupo R alifático apolar. Uma mudança de aminoácido ocorreu em Q342H, com mudança de agrupamento, porém ambos polares, com a glutamina no grupo R polar neutro (sem carregamento) e a histidina no grupo R polar básico. Em L324F houve a mudança de agrupamento de R alifático apolar (leucina) para um grupo R aromático (fenilalanina), que é menos hidrofóbico que o grupo alifático apolar, mas, ainda assim, participam de interações hidrofóbicas. Por fim, três mudanças de aminoácidos levaram a mudanças de agrupamento de

acordo com a polaridade: T30A e T57P, mudança de uma treonina (grupo R polar neutro), para uma alanina (grupo R alifático, apolar) em todos os haplótipos na posição 30 e uma prolina (grupo R alifático, apolar) no haplótipo 9; e R314G, com mudança de uma arginina positivamente carregada para uma glicina, do agrupamento apolar, no haplótipo 12.

Tabela 2: Posição dos aminoácidos das amostras de *L. dominicanus* para o Cytb. O haplótipo 1 é referente à sequência da Nova Zelândia. A América do Sul e Antártica Consenso corresponde a todos os haplótipos que tiveram apenas uma mudança de aminoácido, na posição 30. O H6, H7 e H8 são de indivíduos de São Paulo, e o H10, H11 e H12 são de indivíduos de Santa Catarina.

	30	57	280	289	314	324	342
Nova Zelândia	T	T	A	L	R	L	Q
Am. Sul e Ant. Consenso	A
H6	A	.	.	M	.	.	.
H7	A	F	.
H9	A	P
H10	A	H
H11	A	.	G
H12	A	.	.	.	G	.	.

T= Treonina; A= Alanina; P= Prolina; L= Leucina; M= Metionina; R= Arginina; G= Glicina; F= Fenilalanina; Q= Glutamina; H= Histidina

No que se refere às populações do Brasil e a população da Argentina, pode-se observar uma variabilidade genética moderada nas populações (Tabela 3). No Rio de Janeiro, a diversidade haplotípica ($H_d=0,667$) foi relativamente alta para sete indivíduos que apresentaram três haplótipos e dois sítios polimórficos, no entanto, a diversidade nucleotídica e o theta foram baixos ($\pi=0,0009$ e $\theta=0,0009$, respectivamente). Em contrapartida, São Paulo, num tamanho amostral de 37 indivíduos, apresentou seis sítios polimórficos e sete haplótipos, com uma diversidade haplotípica menor que no Rio de Janeiro ($H_d=0,486$). Em Santa Catarina, dos 28 indivíduos amostrados, foram observados seis sítios polimórficos e seis haplótipos, com uma diversidade haplotípica ($H_d=0,648$), nucleotídica ($\pi=0,0011$) e o theta ($\theta=0,0016$) maiores que os valores das colônias de São Paulo e Rio de Janeiro (exceto para a diversidade haplotípica no Rio de Janeiro, que ainda foi maior). A população Argentina apresentou os maiores índices de variabilidade genética ($H_d=0,750$, $\pi=0,014$ e $\theta=0,0022$), se comparada às populações brasileiras, com um tamanho amostral de 17 indivíduos (Tabela 3).

Foi observado apenas um haplótipo para os sete indivíduos sequenciados da Antártica e nenhum sítio polimórfico. Dessa forma, não foi possível obter os valores de variabilidade genética para esta população.

Tabela 3: Diversidade genética do Cytb nas populações de *L. dominicanus*. Populações do Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Santa Catarina (SC), Argentina (ARG) e Antártica (ANT). N - n° de amostras; S - sítios polimórficos; Hn – n° de haplótipos; Hd – diversidade haplotípica; Pi - Diversidade nucleotídica; Theta – calculado por sítio.

População	N	S	Hn	Hd	Pi (π)	Theta (θ)
RJ	7	2	3	0,667	0,0009	0,0009
SP	37	6	7	0,486	0,0007	0,0015
SC	28	6	6	0,648	0,0011	0,0016
ARG	17	7	7	0,750	0,0014	0,0022
ANT	7	0	1	0	0	0
Total	94	15	17	0,703	0,0013	0,0031

Os testes de neutralidade indicaram que duas populações apresentaram um desvio de neutralidade e equilíbrio, em pelo menos um dos testes (Tabela 4). Para o Fs de Fu, São Paulo e Argentina foram significativos, sugerindo que as populações dessas regiões podem estar passando por um processo de expansão populacional. A análise da rede haplótipos gerou uma rede de associação entre todos os haplótipos encontrados e suas distribuições geográficas (Figura 2). O tamanho do círculo é proporcional ao número de indivíduos que apresentam esse haplótipo. Assim, nesta rede podemos observar dois haplótipos de maior frequência, o haplótipo 3 e o haplótipo 8, compartilhados entre 46 e 22 indivíduos, respectivamente. Derivando deles, há outros haplótipos menos frequentes que diferem dos haplótipos centrais por apenas um passo mutacional. O haplótipo 18 refere-se ao haplótipo compartilhado entre os sete indivíduos da Antártica e apresenta-se o mais afastado dos haplótipos das demais regiões e mais próximo do haplótipo da Nova Zelândia (Anexo 2). A conformação dessa rede de haplótipos, uma estrutura do tipo estrela, sugere uma expansão populacional recente, onde há um haplótipo central comum a vários indivíduos e, derivando dele, outros haplótipos em baixa frequência que diferem do haplótipo central por apenas uma mutação.

Tabela 4: Testes de neutralidade aplicados as sequências da região do citocromo b (Cytb 950bp) de *L. dominicanus* ao longo da América do Sul e Antártica

População	F de Fu e Li	D de Fu e Li	Fs de Fu	D de Tajima
RJ	-0,1145 p>0,1	-0,0589 p>0,1	-0,4376 p=0,17	-0,2749 p=0,4
SP	-1,4868 >0,1	-1,2025 p>0,1	-3,8691 p=0,003**	-1,4367 p=0,06
SC	-1,2283 p>0,1	-1,068 p>0,1	-1,7504 p=0,09	-1,0253 p=0,16
ARG	-1,7875 p>0,1	-1,6705 p>0,1	-2,6212 p=0,024**	-1,2464 p=0,11
ANT	0	0	0	–
Total	-3,7706 p<0,02*	-4,0146 p<0,02*	–	–

*Nível de significância de p=0,05 (<0,05).

**Nível de significância de p=0,02 (<0,02).

A análise de variância molecular (AMOVA) mostra que a maior parte da diversidade genética se encontra distribuída dentro das populações (48,80%), seguida pela diversidade entre os grupos Brasil, Argentina e Antártica (46,47%), e a menor parte encontra-se entre as populações dentro do Brasil (4,73%) (Tabela 5). Isso sugere que pode não estar havendo fluxo gênico entre as populações brasileiras, ao mesmo tempo que a alta taxa de diversidade genética distribuída entre os grupos também demonstra uma possível estrutura populacional, uma vez que há uma grande variação entre eles, o que também denota um fluxo gênico restrito. O índice de fixação para F_{ST} , que corresponde a variação entre as populações dentro dos grupos, mostrou-se altamente significativo, com uma variação em torno de 51% entre as populações (0,51198; p=0,000). Os valores de F_{ST} par a par de populações corroboram os dados da AMOVA, onde nós podemos observar uma diferenciação genética significativa entre as populações brasileiras, argentina e antártica (Tabela 6). As populações do Rio de Janeiro e de São Paulo diferem das populações de Santa Catarina, Argentina e Antártica, porém não diferem entre si. A população de Santa Catarina só não diferiu da população da Argentina e a população da Antártica apresentou diferenciação genética com todas as outras populações. Há indícios de que a diferenciação populacional observada em *L. dominicanus* seja devido ao isolamento por distância (Figura 3).

As estimativas de fluxo gênico revelaram que quase todas as populações apresentaram baixo fluxo gênico, com valores menores que 1 (Tabela 6). O par Argentina e Santa Catarina corrobora com o valor do F_{ST} que não foi significativo, o que denota fluxo gênico entre as duas populações. Entretanto, os pares Santa Catarina e Rio de Janeiro e Santa Catarina e São Paulo, também indicaram fluxo gênico, embora estas populações apresentem diferenciação genética significativa na análise F_{ST} par a par.

Tabela 5: Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os grupos (Brasil, Argentina e Antártica), entre populações dentro dos grupos (Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina) e dentro das populações.

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Varição dos componentes	Porcentagem de variação	Índice de Fixação	P-valor
Entre grupos	2	18,08	0,4184	46,47	F _{CT} : 0,4647	0,1993
Entre populações dentro dos grupos	2	2,607	0,0425	4,73	F _{ST} : 0,5119	0,0000
Dentro das populações	89	39,108	0,4394	48,80	F _{SC} : 0,0883	0,0060
Total	93	59,798	0,9004			

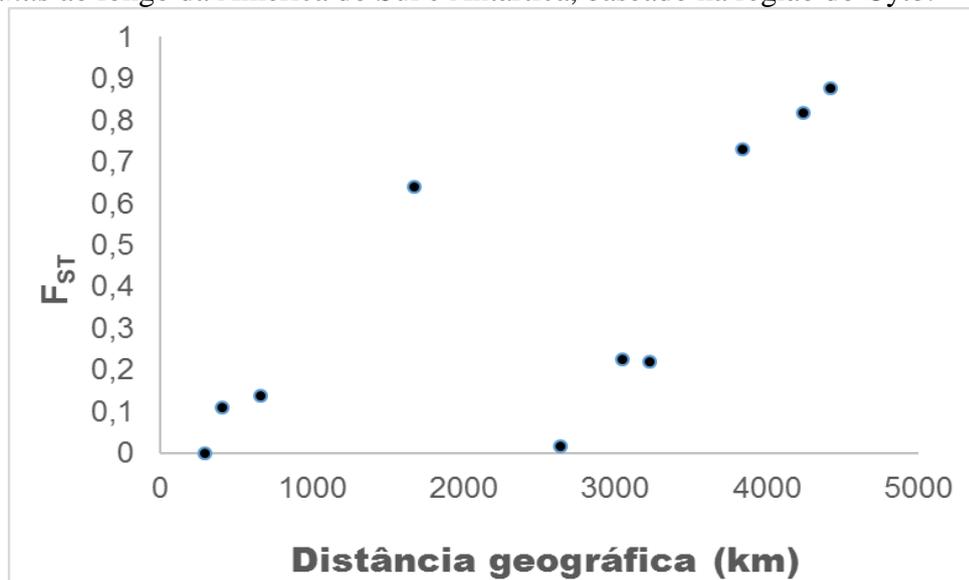
Número de permutações: 10100

Tabela 6: F_{ST} par a par de populações de *L. dominicanus* (inferior diagonal) e estimativas de fluxo gênico (*Nm*, superior diagonal). Valores significativos de F_{ST} estão destacados em negrito.

População	RJ	SP	SC	ARG	ANT
RJ	-	-	1,55675	0,88193	0,03448
SP	0,0000	-	2,02314	0,85741	0,05540
SC	0,13837	0,10998	-	15,1535	0,09288
ARG	0,22086	0,22575	0,01623	-	0,14063
ANT	0,87879	0,81858	0,72910	0,63998	-

Número de permutações: 1023
p=0,05

Figura 3: Relação entre a distância geográfica e a diferenciação populacional de *L. dominicanus* ao longo da América do Sul e Antártica, baseado na região do Cytb.



A análise Bayesiana *Skyline Plot* indicou um aumento populacional dos gaivotões há cerca de 150 anos, tendo este aumento continuado e depois estabilizado, até os dias atuais (Figura 4). A análise de distribuição *mismatch* (Figura 5) revelou uma distribuição unimodal, com um 0 e aproximadamente 1, indicando que muitas sequências apresentam o mesmo número de diferenças, representando uma possível expansão populacional.

Figura 4: Análise Bayesiana *Skyline Plot* representando a história demográfica de *L. dominicanus*, para sequências do Cytb. O eixo y representa o tamanho efetivo da população e o eixo x a escala do tempo em centenas de anos. A linha sólida central é a média estimada e em azul o intervalo de 95% dos limites de densidade.

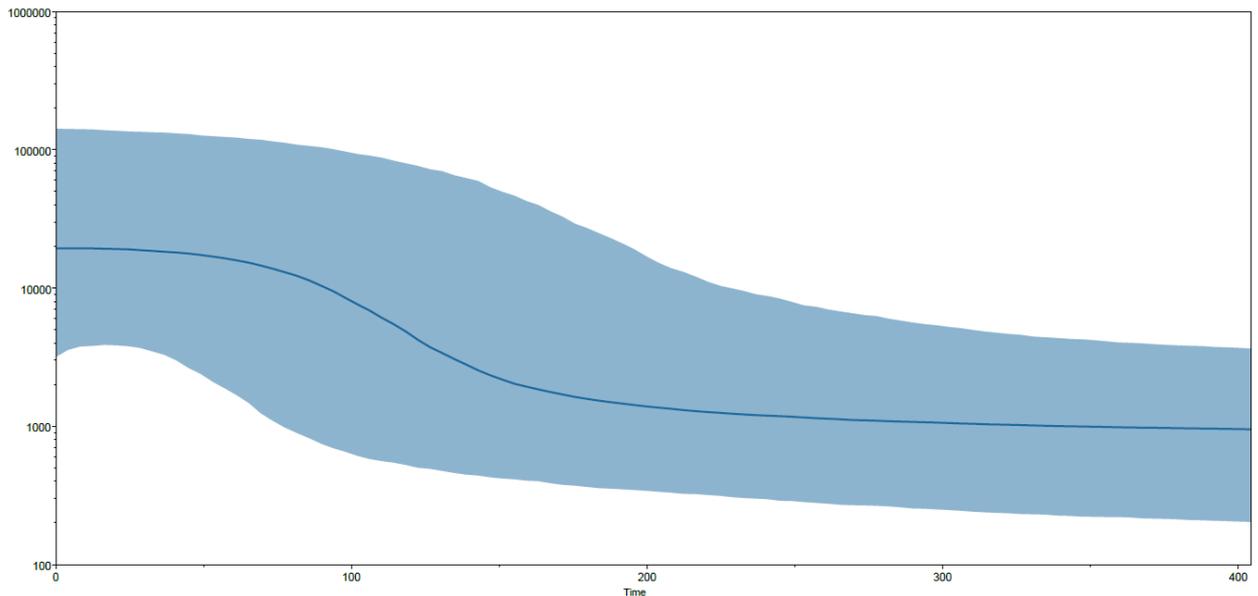
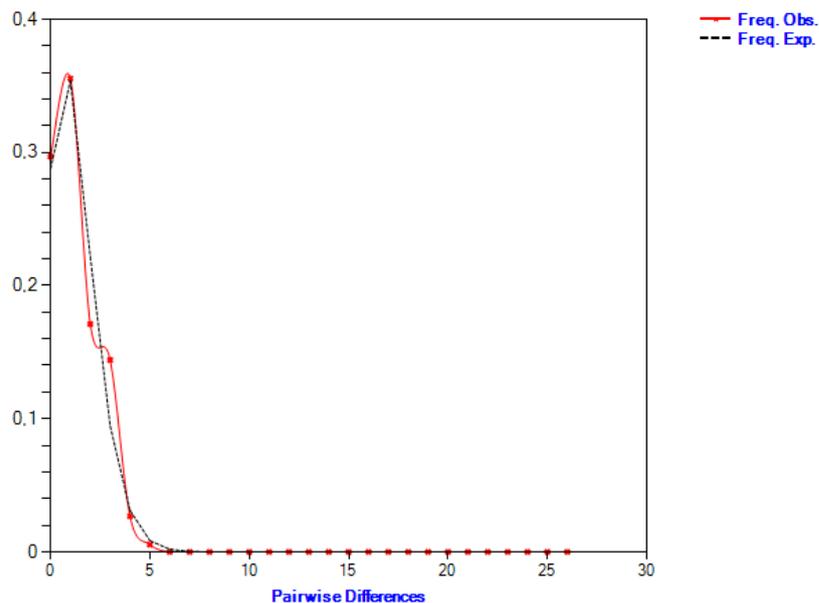


Figura 5: Distribuição *mismatch* da região do Cytb de *L. dominicanus* na América do Sul e Antártica. O eixo y representa a frequência relativa do número de diferenças par a par na composição de nucleotídeos dos haplótipos, no eixo x. A linha cheia indica os valores observados, enquanto a linha pontilhada representa os valores esperados.



4 DISCUSSÃO

4.1 Variabilidade genética e história demográfica

Nossos resultados diferem dos previamente reportados por Dantas e colaboradores (2012) a respeito da variabilidade genética de *L. dominicanus*. Neste estudo, os autores avaliaram a diversidade genética dos genes mitocondriais Cytb e ATPase 6 e 8, e um gene nuclear, o Íntron 7 do β -Fibrinogênio, encontrando baixa variabilidade genética dos genes mitocondriais (para Cytb, $Hd=0,273$, $\pi=0,00083$ e $\theta=0,00064$), quando comparada a alta diversidade genética no gene nuclear (FIB, $Hd=0,896$ e $\pi=0,00465$ e $\theta=1,053$). Nossos dados dos índices de diversidade genética do Cytb de *L. dominicanus* revelaram uma variabilidade genética moderada nas populações brasileiras, argentina e antártica, observada pelo número de haplótipos, número de sítios polimórficos e a diversidade haplotípica. A colônia argentina apresentou a maior diversidade haplotípica ($Hd=0,750$) seguida pela população do Rio de Janeiro ($Hd=0,667$) e Santa Catarina ($Hd=0,648$). Em contrapartida, a diversidade nucleotídica e o theta foram baixas em todas as populações. Segundo Grant e Bowen (1998), esse padrão de alta diversidade haplotípica, acima de 0,5, e baixa diversidade nucleotídica, abaixo de 0,5% é típico em populações que passaram por gargalos populacionais seguidos de expansão recente, com retenção de novas mutações.

Dantas e colaboradores (2012) também levantaram a hipótese de possíveis eventos demográficos, como gargalos populacionais e eventos fundadores recentes, ocorridos durante o período glacial, causando uma redução temporária do tamanho da população, resultando em uma taxa de deriva genética elevada. Por outro lado, estes mesmos autores propuseram a hipótese de uma possível seleção no DNAm, onde poderia ter ocorrido a fixação de um novo e favorável alelo por meio de uma varredura seletiva, que, por sua vez, reduz a variabilidade genética através de loci ligados (DANTAS et al. 2012). A seleção de um gene ocorre em um loco, mas leva ao aumento da frequência de genes em loci próximos do gene em que está ocorrendo seleção, processo conhecido como “efeito carona” (GALTIER et al., 2000). Além disso, a perda de variabilidade através de gargalos populacionais e eventos fundadores marcaria tanto os genomas mitocondriais quanto nucleares, o que não foi o caso do estudo de Dantas e colaboradores (2012).

O padrão de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica tipicamente ocorre em populações grandes ou mesmo ao longo da distribuição de uma espécie, onde há

um ou dois haplótipos prevalentes e, partindo deles, vários outros haplótipos com uma ou duas mutações (GRANT & BOWEN, 1998). Esse padrão é corroborado pela rede de haplótipos do nosso estudo, que apresentou dois haplótipos em alta frequência, o haplótipo 3 compartilhado entre 46 indivíduos e o haplótipo 8 compartilhado entre 22 indivíduos e, partindo desses haplótipos centrais, há outros haplótipos menos frequentes, apresentando apenas uma mudança de base nucleotídica. Esse tipo de conformação de rede haplótipos, em formato de estrela, sugere uma expansão recente de populações, uma vez que os haplótipos menos frequentes, ocorrentes em poucos indivíduos, evidenciam não ter havido tempo suficiente para que se espalhassem na população (SLATKIN & HUDSON, 1991; AVISE, 2000). Em outras palavras, após a expansão populacional, surgiram novos haplótipos, devido a mutação, porém estes haplótipos não se espalharam pelas populações, devido à baixa dispersão dos indivíduos ou devido ao pouco tempo evolutivo para a homogeneização das populações. Na rede de haplótipos, evidenciamos também a presença de um único haplótipo (H18) exclusivo da Antártica e compartilhado entre os sete indivíduos amostrados. Este haplótipo encontra-se o mais afastado dos demais haplótipos da América do Sul, e mais próximo do haplótipo 1 da Nova Zelândia, resultado que se encontra dentro do esperado, uma vez que a subespécie *L. d. dominicanus* é ocorrente na América do Sul, enquanto que nas ilhas subantárticas da região das Falklands e Geórgia do Sul, ocorreria outra subespécie (Anexo 2) (JIGUET et al., 2012). Jiguet e colaboradores (2012) investigaram as variações fenotípicas de gaivotões de várias regiões do Hemisfério Sul e reconheceram *L. d. dominicanus* como a subespécie ocorrente na América do Sul e *L. d. austrinos* como a subespécie encontrada na Península Antártica. Uma explicação provável à essa distinção seria que a corrente Antártica estaria atuando como uma barreira à dispersão dos gaivotões entre os continentes antártico e a América do Sul (SANTOS et al., 2016).

O teste de neutralidade F_s de F_u corrobora a evidência de expansão das populações, pelo menos em São Paulo e Argentina, muito embora os testes D de Tajima, F de F_u e Li e D de F_u e Li não tenham evidenciado desvio significativo de neutralidade (Tabela 4). A análise bayesiana do *Skyline Plot* e a distribuição *mismatch* também evidenciaram sinal de expansão recente nas populações de gaivotões, nos últimos 150 anos (Figura 4 e 5). No entanto, os resultados da análise de variância molecular (AMOVA), o F_{ST} par a par das populações e as estimativas de fluxo gênico (Tabelas 5 e 6) evidenciaram diferenças genéticas entre a maioria das localidades, indicando que, apesar da expansão populacional passada, as populações

atuais já apresentam diferenças genéticas, e que isso provavelmente se deve a distância geográfica entre as localidades.

Assim, apesar de termos encontrado uma variabilidade genética em Cytb maior que a encontrada por Dantas e seus colegas (2012), e uma evidente expansão populacional, demonstrada pela análise bayesiana do *Skyline Plot*, a distribuição *mismatch* e o teste de neutralidade F_s de F_u em São Paulo e Argentina, não necessariamente isto está relacionado a gargalos populacionais, que, inevitavelmente, diminuiriam a variabilidade genética, por deriva. Nunes e colaboradores (2017) também não encontraram evidências de gargalos recentes em populações de rabo-de-palha-de-bico-vermelho (*Phaethon aethereus*) e o rabo-de-palha-de-bico-laranja (*P. lepturus*) na costa atlântica brasileira, a despeito das populações serem muito pequenas, aparentemente já há alguns séculos. Uma hipótese levantada seria um evento fundador que teria ocorrido em Fernando de Noronha e Abrolhos, com a chegada de aves tropicais vindas de outras partes do Oceano Atlântico, como a Ilha de Ascensão ou as Antilhas.

4.2 Mudanças na cadeia polipeptídica

Nem todas as mudanças de nucleotídeos levaram a mudanças de aminoácidos, uma vez que o código genético é considerado redundante, pois vários códons codificam o mesmo aminoácido. Assim, a maior parte das substituições foram silenciosas, ou mutações sinônimas, uma vez que não houve mudança no produto gênico. Porém, sete mudanças de aminoácidos foram observadas, das quais três levaram a mudanças de agrupamento polar e apolar, T30A, T57P e R314G (Tabela 2, Anexo 1). Essas substituições não silenciosas, ou não sinônimas, levam a uma mudança na proteína codificada por um gene. De fato, a teoria neutralista prediz que os dois tipos de substituições irão se acumular nas populações por deriva genética, porém as substituições sinônimas irão se acumular mais rapidamente, uma evidência de que a seleção natural atua contra mutações não sinônimas, para manter a estrutura da proteína (RIDLEY, 2007; NAKAYANNA et al., 2008; FREEMAN, 2009). Quando a mudança do códon resulta na troca de aminoácido, o efeito irá depender de diferenças químicas entre os aminoácidos antigos e novos (STRACHAN & READ, 2013). Então, a substituição de um aminoácido por outro de um mesmo agrupamento, corresponde a uma substituição conservada, pois possui menos efeito sob a estrutura da proteína do que uma substituição não conservada (STRACHAN & READ, 2013). A maior parte das substituições

encontradas neste trabalho foram conservadas, uma vez que houve a substituição de um aminoácido por outro quimicamente semelhante. Neste sentido, o Cytb pode estar sob seleção, uma vez que qualquer substituição de aminoácidos que altere a distribuição de agrupamentos pode levar ao comprometimento da estrutura tridimensional da proteína (KARP, 2005; STRACHAN & READ, 2013). No entanto, nem todas as mudanças de aminoácidos têm efeito deletério, sobretudo na alteração da sequência de aminoácidos de uma mesma proteína entre organismos relacionados (KARP, 2005). Se a maioria das alterações for deletéria, elas provavelmente devem ser eliminadas por seleção natural, não aumentando sua frequência na população (FREEMAN, 2009).

Bazin e colaboradores (2006) descreveram o DNAmT como uma molécula que sofre evolução adaptativa envolvendo uma seleção direta na maquinaria respiratória. Sua diversidade, então, é imprevisível e, na maioria dos casos, irá refletir mais o tempo desde a última varredura seletiva, do que seu histórico demográfico (BAZIN et al., 2006). Se a diversidade genética encontrada nos gaivotões for reflexo da seleção purificadora no DNAmT, seguindo do surgimento de novos alelos em locais específicos, a estrutura populacional pode indicar o recente surgimento de novas variantes que ainda estão sob influência da deriva e da seleção ambiental.

4.3 Diversidade populacional

Alguns trabalhos relacionaram a diversidade genética em genes do DNA mitocondrial com seleção mediada por condições ambientais. Ramos e colaboradores (2018) observaram uma seleção purificadora no gene COX1, enquanto uma seleção positiva, isto é, que aumenta sua frequência na população, foi identificada nos genes ND4 e ATP8. A temperatura da superfície do mar foi correlacionada com a seleção no ND4 enquanto que a concentração de clorofila foi correlacionada com a seleção ocorrendo em COX1. Uma das hipóteses levantadas por esses autores é a de que a temperatura é o principal fator de seleção no DNAmT nos pinguins, uma vez que, na fosforilação oxidativa, uma produção de calor mais eficiente que a produção de energia seria vantajosa para a sobrevivência desses animais em lugares frios. Yu e colaboradores (2011) também sugeriram que mudanças evolutivas adaptativas no genoma mitocondrial de macacos *Rhinopithecus*, uma adaptação a climas muito frios e ao déficit de oxigênio, estão relacionadas a dois genes importantes atuantes nesse processo de adaptação: o NADH2 e o NADH6.

Adaptações locais podem influenciar o fluxo gênico e, conseqüentemente, a diferenciação populacional. O modelo de isolamento por ambiente refere-se ao padrão em que a diferenciação genética aumenta com as diferenças ambientais, independente da distância geográfica, ou as taxas de fluxo gênico são maiores entre ambientes similares (SEXTON et al., 2012; WANG & BRADBURD, 2014). Pensando nisso, Nunes e Bugoni (2018) se interessaram em avaliar a influência da heterogeneidade ambiental na estrutura populacional de seis colônias de *Sula leucogaster* (atobás-marrons) em arquipélagos à sudoeste do Oceano Atlântico, revelando estrutura populacional marcante entre o arquipélago de São Pedro São Paulo em relação ao restante das colônias. Esses autores propuseram que heterogeneidade da paisagem estaria promovendo o isolamento dessa localidade. O teste de isolamento por distância não foi capaz de explicar a diferenciação genética dos atobás-marrons, assim, outros fatores estariam influenciando a diferenciação dessas colônias, como as condições ambientais. Estudando colônias do pinguim *Eudyptula minor* na Austrália, Overeem e colaboradores (2007) constataram que, embora a maior parte das colônias tenham apresentado uma homogeneidade genética expansiva, duas colônias apresentaram-se distintas de todas as demais. Os autores, então, sugerem que apenas um isolamento geográfico pode não ser o único fator responsável pela diferenciação genética entre as colônias, e a explicação mais provável seria uma diferença na fenologia reprodutiva ocasionada pela diferença na temperatura do mar nas diferentes regiões onde ocorrem as colônias, levando a um atraso no início da estação reprodutiva.

Lyons e colaboradores (2015) avaliaram a diversidade genética em colônias reprodutivas de gaivotões na Patagônia argentina através da análise de marcadores nucleares e observaram que, embora a maior parte dos haplótipos tenham sido encontrados em múltiplas colônias e a estrutura populacional tenha sido baixa (AMOVA - $F_{ST}=0,0027$, $p=0,333$), haplótipos exclusivos foram encontrados em apenas uma região. A diferenciação genética encontrada na ilha mais ao norte (Islote la Pastosa) não é condizente com um isolamento por distância, então os autores atribuem esse fato a uma dinâmica de metapopulação, onde os haplótipos únicos encontrados seriam provenientes de migrantes de colônias vizinhas mais próximas não amostradas. Um padrão de estrutura similar foi encontrado por Faria e colaboradores (2010) ao estudarem a variação genética e a estrutura populacional das populações de trinta-réis-de-bico-vermeho (*Sterna hirundinacea*) em colônias do Brasil e da Argentina. Esses autores também encontraram grande compartilhamento de haplótipos e sinal de expansão populacional, porém evidenciaram estrutura populacional entre as colônias do

Brasil e Argentina. Adicionalmente, Faria e colaboradores (2010) revelaram um fluxo unidirecional das populações brasileiras para a Patagônia, sugerindo que estas poderiam estar atuando como fontes de migrantes para a população patagônica. Todavia, a maior diversidade genética e riqueza alélica encontrada na população da Patagônia sugerem um cenário oposto, com a população argentina atuando como fonte da qual as outras populações poderiam ter se originado. Santos e colaboradores (2016) propuseram que os gaivotões apresentam estrutura populacional genética em larga escala, entre Brasil, Argentina, Chile e Antártica, onde as ilhas subantárticas seriam as mais diferenciadas geneticamente, evidência esta corroborada pelos nossos dados de haplotipos exclusivos do DNAm para a região Antártica. Entretanto, Santos e colaboradores (2016) não observaram diferenciação genética significativa entre a Argentina e as colônias brasileiras, e entre as colônias dentro da costa brasileira, propondo que a diferenciação genética encontrada em *L. dominicanus* poderia estar relacionado ao isolamento por distância, sendo favorecido pelo isolamento por correntes marinhas, o que levaria a diferenciação da Antártica e do Chile. Nuss e colaboradores (2016) não observaram estrutura populacional entre as populações de fregatas (*Fregata magnificens*) no Brasil, bem como não houve evidência de estrutura entre as populações do Brasil e a Guiana Francesa. Assim, estes autores sugerem uma conexão migratória recente, com migração de indivíduos do Brasil para a Guiana Francesa, mostrando que as fregatas podem manter o fluxo gênico mesmo separadas por longas distâncias.

Neste estudo, observamos que as populações de gaivotões apresentaram maior estrutura populacional do que a previamente relatada para essa espécie (LYONS et al., 2015; SANTOS et al., 2016), assim como para outras espécies da costa brasileira (FARIA et al., 2010; NUSS et al. 2016). Essa diferenciação pode sim estar relacionada à seleção do DNA mitocondrial para um sítio específico, uma vez que os gaivotões conseguiriam conectar colônias reprodutivas de longa distância por sua capacidade de vôo, principalmente devido a diferenciação dentro da costa brasileira. Whittington e colaboradores (2009) registraram que a subespécie *L. d. vetula* é capaz de voar por distâncias de até 935 km do seu sítio de reprodução, na costa da África do Sul e, no nosso estudo, a população da Argentina não apresentou diferenciação com a população de Santa Catarina, mesmo a uma distância de 2.637 km.

Muitas aves marinhas apresentam uma estruturação genética que pode ser o resultado de eventos históricos e demográficos diversos, como oscilações climáticas e mudanças nas correntes oceânicas (FARIA et al., 2010). Morris-Pocock e colaboradores (2008) encontraram

evidências de expansão das populações de *Uria aalge* (Laridae) que vivem na costa Atlântica e do Pacífico da América do Norte e Ásia. Esses autores associaram essa expansão às mudanças climáticas no Pleistoceno. Dantas e colaboradores (2018) também propuseram que a expansão populacional observada em Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) está relacionada a retração do nível do mar durante o último máximo Glacial (*Last Glacial Maximum*- LGM). Estudos de Dantas e colaboradores (2012) indicaram expansão dos gaivotões durante o LGM, o que poderia explicar a ocupação de toda a costa brasileira por uma linhagem única de DNA mitocondrial. Durante o LGM, o nível do mar do Oceano Atlântico chegou a baixar 120 metros (VILLAGRÁN et al., 1986), o que levaria a exposição de grande parte da plataforma continental, consequentemente disponibilizando sítio para reprodução das aves marinhas. Por outro lado, a diversidade genética no locus do *Cytb* e as estimativas de expansão baseada neste marcador, indicam uma expansão já no Holoceno, cerca de 150 anos atrás, o que compreenderiam poucas gerações.

As populações de gaivotões são numerosas, sobretudo pelo fato de terem à disposição grandes quantidades de alimentos oriundos de fontes artificiais, tais como restos de pescado e rejeitos domésticos (GIACCARDI et al., 1997; YORIO et al., 1998; EBERT & BRANCO, 2009). A disponibilidade de recursos alimentares em regiões próximas a áreas de nidificação pode favorecer a redução da dispersão dos indivíduos por longas distâncias, reduzindo o fluxo gênico entre as colônias. Nunes e Bugoni (2018) relatam que os atobás-marrons forrageiam em locais onde há disponibilidade de presa e que a abundância de alimento próximo às colônias destes animais na ilha de São Pedro São Paulo, faz com que não seja necessário que eles voem longas distâncias para buscar comida. Faria e colaboradores (2010) sugerem que nos anos em que a disponibilidade de alimento na costa brasileira é mais baixa, os trinta-réis-de-bico-vermelho poderiam migrar em direção ao sul, o que explicaria o fluxo gênico unidirecional dos indivíduos do Brasil para a Patagônia encontrado pelas estimativas de migração. Para os gaivotões, a disponibilidade de alimento não parece ser um problema, havendo relatos desses animais alimentando-se de restos de pesca e outros rejeitos descartados por embarcações de arrasto em Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (BRANCO, 2001; CARNIEL & KRUL, 2012; SOARES TRAVERSI & VOOREN, 2010). Dessa forma, a expansão observada no DNA mitocondrial provavelmente está relacionada a grande disponibilidade de recursos alimentares para essa espécie. Consequentemente, a estrutura populacional observada em nosso estudo também pode estar relacionada a facilidade

de acesso a alimentos próximos as colônias, reduzindo assim a dispersão para outras áreas e a homogeneização das populações.

5 CONCLUSÃO

L. dominicanus apresentou uma variabilidade genética moderada, sendo que a população argentina se apresentou como a mais variável, seguida de colônias brasileiras. A demografia histórica dos gaivotões revelou um cenário de expansão populacional recente nos últimos 150 anos. As análises de diversidade populacional evidenciaram sinais de estrutura entre as populações do Brasil, Argentina e Antártica, um indicativo de fluxo gênico restrito. Dessa forma, uma variabilidade genética moderada e uma expansão recente podem não estar relacionadas a gargalos populacionais, uma vez que este evento diminuiria a variabilidade genética por deriva. Além disso, foram identificadas mudanças de agrupamentos de aminoácidos, o que indica uma seleção ocorrendo no Cytb. Assim, uma seleção seguida de expansão populacional recente, com estruturação das populações é o cenário mais provável, uma vez que todos os indivíduos apresentaram uma seleção positiva com a substituição de um agrupamento de aminoácidos (T30A) e o pouco tempo decorrido não foi suficiente para espalhar as novas mutações surgidas, levando a uma estrutura populacional pós-expansão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F. W. LUIKART, G. H. **Conservation and the genetics of populations**. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, xviii, 602 p. 2007. ISBN 9780470671450
- AVISE, J. C.; NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. **Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations**. *Journal of Molecular Evolution*, 20: 99-105. 1984.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, 447p. 2000.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 2004
- AVISE, J. C. **Phylogeography: retrospect and prospect**. *Journal of Biogeography*, 36, p. 3-15. 2009. Doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. **The incomplete natural history of mitochondria**. *Molecular Ecology*, 13, p. 729-744. 2004. Doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x
- BARRANTE, D.; et al. **The impact of local extinction on genetic structure of wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus*) in the Central Valley of Costa Rica: consequences for the conservation of plant genetic resources**. *Rev. Biol. Trop.* 56 (3): 1023-1041, 2008
- BAZIN, E.; GLÉMIN, S.; GALTIER, N. **Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals**. *Science* 312, p. 570-572. 2006.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. São Paulo: editora Artmed. 4ª edição, 740p. 2007.
- BELANT, J. L. **Gulls in urban environments: landscape-level management to reduce conflict**. *Landscape and Urban Planning* 38, p. 245-258.1997.
- BIRD LIFE INTERNATIONAL. 2018. *Larus dominicanus*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22694329A132542863.en>> Acesso em: 07 de jan. 2019.
- BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, C-H., XIE, D., SUCHARD, MA., RAMBAUT, A., & DRUMMOND, A. J. **BEAST 2: A software platform for Bayesian Evolutionary Analysis**. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537. 2014. Doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.
- BRANCO, J.O. **Descartes da pesca do camarão sete-barbas como fonte de alimento para aves marinhas**. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18(1), p. 293-300. 2001.
- BRIDGE, D.; CUNNINGHAM, C.W.; SCHIERWATER, B.; DESALLE, R.; BUSS, L. W. **Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, P8750-8753. 1992

- BROWN, W. L.; JR., M. G.; WILSON, A. C. **Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76(4): 1967-1971. 1979.
- BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. **Mitochondrial DNA sequences of Primates: tempo and mode of evolution.** Journal of Molecular Evolution, 18: 225-239. 1982.
- 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, 10, p. 2647-2660. 2001.
- BURGER, J.; GOCHFELD M. Laridae. In: del Hoyo JA, Elliott SJ (eds) **Handbook of the birds of the world**, Lynx, Barcelona, vol 3, 1996.
- BURGER, J., GOCHFELD, M., GARCIA, E.F.J. & KIRWAN, G.M. (2019). Kelp Gull (*Larus dominicanus*). In: DEL HOYO, J., ELLIOTT, A., SARGATAL, J., CHRISTIE, D.A. & DE JUANA, E. (eds.). **Handbook of the Birds of the World Alive.** Lynx Editions, Barcelona. Disponível em: <<https://www.hbw.com/node/53975>> Acesso em: 19 de fev. 2019.
- CARNIEL, V. L.; KRUL, R. **Use of artisanal fishery discards by seabirds on the Paraná coast in Brazil.** Marine Ornithology, 40, p. 57-62. 2012.
- CONGDON, B. C.; PIATT, J. F.; MARTIN, K.; FRIESEN, V. L. **Mechanisms of population differentiation in marbled murrelets: historical versus contemporary processes.** Evolution, 54(3), p. 974–986. 2000.
- COULSON, R.; COULSON, G. **Diets of the Pacific Gull *Larus pacificus* and the Kelp Gull *Larus dominicanus* in Tasmania.** Emu 93: 50–53, 1993. DOI: 10.1071/MU9930050.
- COULSON, J. C. Colonial breeding in seabirds. In: SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. **Biology of Marine Birds.** CRC Press, 722p. 2001.
- CROCHET, P. A. **Molecular phylogeny and plumage evolution in gulls (Larini).** Journal of Evolutionary Biology, 13: 47–57. 2000. Doi: 10.1046/j.1420-9101.2000.00135.x
- CURROLE, J. P.; KOCKER, T. D. **Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes.** Trends in Ecology & Evolution. Vol. 14, nº 1, p.394-398. 1999. doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01660-2.
- DANTAS, G. P. M. **Biologia reprodutiva, estrutura populacional e variabilidade genética de *Larus dominicanus*.** Ph. D. Tese. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-19122007-142419/pt-br.php>> Acesso em: 15 de jan. 2019.
- DANTAS, G. P. M.; GODINHO, R.; MORGANTE, J. S.; FERRAND, N. **Development of new nuclear markers and characterization of single nucleotide polymorphisms in kelp gull (*Larus dominicanus*).** Permanent Genetic Resources Note, p.1159-1161. 2009. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02583.x
- DANTAS, G. P. M.; MEYER, D.; GODINHO, R.; FERRAND, N.; MORGANTE, J. S. **Genetic variability in mitochondrial and nuclear genes from *Larus dominicanus* (Charadriiformes: Laridae) at Brazilian coast.** Genetics and Molecular Biology, 35, p.874-885, 2012.

DANTAS, G. P. M.; et al. **Introdução à filogeografia aplicada à conservação biológica de vertebrados neotropicais**. 1ª ed. – Curitiba, PR: CRV, 194p. 2013. ISBN 978-85-8042-788-2.

DANTAS, G. P. M.; MARIA, G. C.; MARASCO, A. C. M.; CASTRO, L. T.; ALMEIDA, V. S.; SANTOS, F. R.; OLIVEIRA, L. R.; CRESPO, E.; FRERE, E.; MILLIONES, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA.; MORGANTE, J. S.; VIANNA, J. A. **Demographic history of the Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*) on the Pacific and Atlantic coasts of South America**. Journal of Ornithology, 159(3), p. 643-655. 2018. Doi: 10.1007/s10336-018-1538-z.

DANTAS, G. P. M. **Divergência genética latitudinal em populações de gaivotões gaivotão (*Larus dominicanus* Lichtenstein, 1823)**. 2015. 19 f. Projeto de pesquisa – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – Belo Horizonte, 2016.

DEJARDINS, P.; MORAIS, R. **Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates**. Journal of Molecular Biology, 212, p. 599-634. 1990. doi: 10.1016/0022-2836(90)90225-B

EBERT, L. A. & BRANCO, J. O. Interação da gaivota *Larus dominicanus* com a pesca industrial e artesanal desenvolvida nas proximidades do Saco da Fazenda, 273-283p. In: BRANCO, J. O; LUNARDON-BRANCO, M. J; BELLOTTO, V. R. (Org.). **Estuário do Rio Itajaí-Açú, Santa Catarina: caracterização ambiental e alterações antrópicas**. Editora UNIVALI, Itajaí - Santa Catarina, 312p. 2009. Disponível em: <<http://www.avesmarinhas.com.br/Cap%C3%ADtulo%2017%20RIA.pdf>> Acesso em: 19 de fev. 2019

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

EXCOFFIER, L. G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis**. Evolutionary Bioinformatics Online 1, p. 47-50. 2005.

FARIA, P. J.; CAMPOS, F. P.; BRANCO, J. O.; MUSSO, C. M.; MORGANTE, J. S.; BRUFORD, M. W. **Population structure in the South American tern *Sterna hirundinacea* in the South Atlantic: two populations with distinct breeding phenologies**. J. Avian Biology, 41, p. 378-387. 2010. Doi: 10.1111/j.1600-048X.2009.04902.x.

FORDHAM, R. A.; CORMARCK, R. M. **Mortality and population change of Dominican gulls in Wellington, New Zealand: with a statistical appendix**. Journal of Animal Ecology Vol. 39, No. 1, pp. 13-27. 1970. DOI: 10.2307/2887.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, 280p. 2008. ISBN: 978-85-89265-08-9

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise evolutiva**. Porto Alegre: Artmed, 4ª ed., 2009

FRIESEN, V. L.; BURG, T. M.; MACCOY, K. D. **Mechanisms of population differentiation in seabirds**. Molecular Ecology, 16, p. 1765-1785. 2007. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03197.x.

- FU, Y. X.; LI, W. H. **Statistical tests of neutrality of mutations**. *Genetics*, v.133, p.693-709, 1993.
- FU, Y.X. **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection**. *Genetics*, 147, p. 915–925. 1997.
- FRANKHAM, R.; BSLLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. Sociedade Brasileira de Genética. 280p. 2008.
- FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise evolutiva**. Porto Alegre: ArtMed editora, 4ª ed., 2009.
- GALTIER, N.; DEPAULIS, F.; BARTON, N. H. **Detecting bottlenecks and selective sweeps from dna sequence polymorphism**. *Genetics* 155: 981–987, 2000.
- GIACCARDI, M., YORIO, P., LIZURUME, E. **Patrones estacionales de la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) em um basural Patagónico y sus relaciones com el manejo de residuos urbanos y pesqueros**. *Ornitologia Neotropical*. 8(2): 77-84. 1997.
- GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. **Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation**. *Tem American Genetic Association*, 89, p. 415-426. 1998.
- GENOVART, M.; ORO, D.; BONHOMME, F. **Genetic and morphological differentiation between the two largest breeding colonies**. *Ibis*, 145, p. 448–456, 2003.
- HAMMER, K. C.; SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. Breeding biology, life histories, and life history–environment interactions. In: **Biology of Marine Birds**. CRC Press, 722p. 2001.
- HAMILTON, M. B. **Populations genetics**. Wiley-Blackwell Publishing, West Sussex: United Kingdom. 2009. ISBN 978-1-4051-3277-0.
- HARTL, D. L.; JONES, E. W. **Genetics: principles and analysis**. 4th ed. Jones and Bartlett Publishers, 840p. 1998. ISBN 0-7637-0489-X
- HARTL, D. L.; CLARCK, A. G. **Princípios de genética de populações**. Porto Alegre: Artmed, 4ª ed., 647p. 2010.
- HALL, T. A. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98, 1999.
- HARRISON, R. G. **Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology**. *Trends in Ecology & Evolution*. Vol. 4, nº 1, p. 6-11. 1989. doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2.
- HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; CARLSON, M. L.; BERRIGAN, D.; SERRA, L. **Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly**. *Science*, 287, p.308-309. 2000.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 11ª ed. 2008. ISBN 978-85-277-1402-0
- JIGUET, F.; CAPAINOLO, P.; TENNYSON, A. **Taxonomy of the kelp gull *Larus dominicanus* Lichtenstein revisited with sex-separated analyses of biometrics and wing tip patterns**. *Zoological Studies*, 51(6), p. 881-892. 2012.

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. São Paulo: Manole, 3^a ed., 2005. ISBN 85-204-1593-8

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. **MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets**. *Mol. Biol. Evol.* 33(7), p. 1870-1874. 2016. doi:10.1093/molbev/msw054.

LASCELLES, B.; RICE, J.; SATO, M.; TARZIA, M.; WANLESS, R. M. Seabirds. In: INNIS, L.; SIMCOCK, A. **First global integrated marine assessment (first world ocean assessment)**. Section B - Marine ecosystems, species and habitats scientifically identified as threatened, declining or otherwise in need of special attention or protection, Division for Ocean Affairs and the Law of the Sea, United Nations. Disponível em: <https://www.un.org/Depts/los/global_reporting/WOA_RegProcess.htm> Acesso em: 24 de jun. de 2019.

LIEBERS, D.; HELBIG, A. J.; DE KNIJFF, P. **Genetic differentiation and phylogeography of gulls in the *Larus cachinnans-fuscus* group (Aves: Charadriiformes)**. *Molecular Ecology*, 10, p. 2447-2462. 2001.

LIEBERS, D.; HELBIG, A. J. **Phylogeography and colonization history of Lesser Black-backed Gulls (*Larus fuscus*) as revealed by mtDNA sequences**. *J. Evol. Biol.*, 15, p. 1021-1033. 2002.

LYONS, A. C.; LISNIZER, N.; GARCIA-BORBOROGLU, P.; YORIO, P.; BOUZAT, J. L. **Genetics and demography of kelp gulls in Patagonia**. *Ornitologia Neotropical*, 26, p. 349-362. 2015.

MÁRON, C. F.; et al. **Increased Wounding of Southern Right Whale (*Eubalaena australis*) Calves by Kelp Gulls (*Larus dominicanus*) at Península Valdés, Argentina**. *PLoS ONE* 10(10): e0139291. 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0139291.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. **Evolution of animal Mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic**. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-92. 1987.

MORITZ, C. **Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it**. *Syst Biol* 51:238–254. 2002.

MORRIS-POCOCK, J. A.; TAYLOR, S. A.; BIRT, T. P.; DAMUS, M.; PIATT, J. F.; WARHEIT, K. I.; FRIESEN, V. L. **Population genetic structure in Atlantic and Pacific Ocean common murre (*Uria aalge*): natural replicate tests of post-Pleistocene evolution**. *Molecular Ecology*, 17, p. 4859–4873, 2008. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03977.x

NAKAYAMA, K.; SHOTAKE, T.; TAKENEKA, O.; ISHIDA, T. **Variation of the melanocortin 1 receptor gene in the macaques**. *American Journal of Primatology*, 70, p. 778-785. 2008. Doi: 10.1002/ajp.20547

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York. 1987.

NEI, M.; TAJIMA, F. **DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases**. *Genetics*, 97, p. 145-163. 1981.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed., 2014. ISBN 978-85-8271-073-9.

NEWMAN, D.; PILSON, D. **Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella***. *Evolution* 51(2):354-362, 1997. Doi: 10.2307/2411107

NUNES, G. T.; EFE, M. A.; FREITAS, T. R.O.; BUGONI, L. **Conservation genetics of threatened Red-billed Tropicbirds and Whitetailed Tropicbirds in the southwestern Atlantic Ocean**. *The Condor, Ornithological Applications*, 119(2), p. 251-260. 2017. Doi: 10.1650/CONDOR-16-141.1.

NUNES, G. T.; BUGONI, L. **Local adaptation drives population isolation in a tropical seabird**. *Journal of Biogeography*, 45, p. 332-341. 2018. Doi: 10.1111/jbi.13142.

NUSS, A.; CARLOS, C. J.; MORENO, I. B.; FAGUNDES, N. J. R. **population genetic structure of the magnificent frigatebird *Fregata magnificens* (aves, suliformes) breeding colonies in the western atlantic ocean**. *Plos One*, 11(2), e0149834. Doi:10.1371/journal.pone.0149834.

OVEREEM, R.L.; PEUCKER, A. J.; AUSTIN, C. M.; DANN, P.; BURRIDGE, C. P. **Contrasting genetic structuring between colonies of the World's smallest penguin, *Eudyptula minor* (Aves: Spheniscidae)**. *Conservation Genetics*, 9, p. 893-905. 2008. Doi: 10.1007/s10592-007-9414-z.

PALOKANGAS R., HISSA R. **Thermoregulation in Young Black-headed Gull (*Larus ridibundus*)**. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.38, p.743-750, 1971.

POLZIN T.; DANESCHMAND, S. V. **On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs**. *Operations Research Letters* 31, p. 12-20. 2003.

QUINTANA, F.; YORIO, P. **Competition for Nest Sites Between Kelp Gulls (*Larus dominicanus*) and Terns (*Sterna maxima* and *S. eurygnatha*) in Patagonia**. *The Auk* 115(4):1068-1071. 1998.

RAMBAUT A., DRUMMOND A.J., XIE D., BAELE, G., SUCHARD M.A. **Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7**. *Systematic Biology*. syy032. 2018. Doi.org/10.1093/sysbio/syy032

RAMOS, B.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LOYOLA, D. E.; JOHNSON, W. E.; PARKER, P. G.; MASSARO, M.; DANTAS, G. P. M.; MIRANDA, M. D.; VIANNA, J. A. **Landscape genomics: natural selection drives the evolution of mitogenome in penguins**. *BMC Genomics*, 19:53, p. 1-17. 2018. Doi: 10.1186/s12864-017-4424-9.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed., 2007.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. **Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences**. *Molecular Biology Evolution*, 9(3), p. 552-569. 1992.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S.E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. **DnaSP 6: DNA sequence**

polymorphism analysis of large datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302. 2017. Doi: 10.1093/molbev/msx248.

SANTOS, F. A.; MORGANTE, J. S.; FRERE, E.; MILLONES, A.; SANDER, M.; VIANNA, J.; DANTAS, G. P. M.; **Evolutionary history of the Kelp Gull (*Larus dominicanus*) in the southern hemisphere supported by multilocus evidence.** *J Ornithol* 157: 1103. 2016. doi:10.1007/s10336-016-1355-1.

SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. **Biology of Marine Birds.** CRC Press, 722p. 2001.

SEXTON, J. P.; HANGARTNER, S. B.; HOFFMANN, A. A. **Genetic isolation by environment or distance:** which pattern of gene flow is most common? *Evolution*, 68(1), p. 1-15. 2013. Doi:10.1111/evo.12258.

SHEALER, D. A. Foraging behavior and food of seabirds. In: SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. **Biology of Marine Birds.** CRC Press, 722p. 2001.

SICK, H. **Ornitologia brasileira.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 p. 1997. ISBN 8520908160

SIRONI, M.; ROWNTREE, V J.; SNOWDON, C. T.; VALENZUELA, L.; MARÓN, C. **Kelp gulls (*Larus dominicanus*) feeding on southern right whales (*Eubalaena australis*) at Península Valdés, Argentina:** updated estimates and conservation implications. *J. Cetacean Res. Manage. International Whaling Commission document SC/61/BRG19.* 2009.

SIRONI, M. et al. **Updated information for 2012-2013 on southern right whale mortalities at Península Valdés, Argentina.** *Cetacean Res. Manage. International Whaling Commission Unpublished Report SC/65b/BRG06.* 2014.

SLATKIN, M.; BARTON, N. H. **A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow.** *Evolution*, 43(7), p. 1349-1368. 1989. doi:10.1111/j.1558-5646.1989.tb02587.x.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. **Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations.** *Genetics*, 129, p. 155-562. 1991.

SORESON, M. D. **Avian mtDNA primers.** Boston University. 2003. Disponível em: <<http://people.bu.edu/msoren/Bird.mt.Primers.pdf>> Acesso em: 14 de jan. 2019

STERNKOPF, V. **Molekulargenetische Untersuchung in der Gruppe der Möwen (*Laridae*) zur Erforschung der Verwandtschaftsbeziehungen und phylogeographischer Differenzierung.** Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt- Univ., Greifswald, Germany, 2011.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética molecular humana.** Porto Alegre: ArtMed, 4ª ed.; 2013. ISBN 97-808-153-4149-9.

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

- TRAVERSI, G. S.; VOOREN, C. M. **Interactions between seabirds and the trawl fishery in coastal waters of southern Brazil in summer.** Revista Brasileira de Ornitologia, 18(3), p. 183-193. 2010.
- TEMPLETON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory.** John Wiley & Sons, New Jersey, 2006.
- THOMAS, P. O. **Kelp Gulls, *Larus dominicanus*, are parasites on flesh of the Right Whale, *Eubalaena australis*.** Ethology 79:89-103. 1988.
- THOMAS, P. O.; et al. **Workshop on the Southern right whale die-off at Península Valdés, Argentina.** SC/65/BRG15. South Korea. 2013. Disponível em: <<https://swfsc.noaa.gov/publications/CR/2013/2013Thomas.pdf>> Acesso em: 08 de jan. 2019
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. **Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America.** Molecular Ecology, 22, p. 1193-1213. 2013.
- VILLAGRÁN, C.; ARMESTO, J. J.; LEIVA, R. **Recolonización postglacial de Chiloe insular: evidencias basadas en la distribución geográfica y los modos de dispersión de la flora.** Rev Chil Hist Nat, 59, p. 19-39. 1986.
- WANG, I. J.; BRADBURD, G.S. **Isolation by environment.** Molecular Ecology, 23, p. 5649-5662. 2014. Doi: 10.1111/mec.12938.
- WEIR, J. T.; SCHLUTER, T. **Calibrating the avian molecular clock.** Molecular Ecology, 17, p. 2321-2328. 2008. Doi: 10.1111/j. 1365-294X.2008.03742.x
- WHITTINGTON, P. A.; MARTIN, A. P.; KLAGES, N. T. W.; SCHULTZ, A. **Movements of the kelp gull *Larus dominicanus vetula* to, from and within Southern South Africa.** Marine Ornithology 37: p. 139–152, 2009.
- WILSON, A. C.; CANNI, L. R.; CARRI, M. S.; GEORGE, M.; GYLLENSTENI, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBIL, R. S.; PRAGER, M. E.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. **Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics.** Biological Journal of the Linnean Society, 26, p. 375-400. 1985.
- WRIGHT, S. **The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating.** Evolution, 19, p. 395-420. 1965.
- YORIO, P.; FRERE, E.; GANDINI, P.; GIACCARDI, M. **Uso de basurales urbanos por gaviotas: magnitud del problema y metodologías para su evaluación.** Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica (Puerto Madryn, Argentina) N° 22, ISSN N° 0328 – 462X, 1996.
- YORIO, P.; BERTELLOTTI, M.; GANDINI, P.; FRERE, E. **Kelp gulls *Larus dominicanus* breeding on the argentine coast: population status and relationship with coastal management and conservation.** Marine Ornithology 26: 11–18, 1998.
- YORIO, P.; BRANCO, J. O.; LENZI, J.; LUNA-JORQUERA, G.; ZAVALAGA, C. **Distribution and trends in kelp gull (*Larus dominicanus*) coastal breeding populations in South America.** BioOne: Waterbirds, 39: 114-135. 2016. Doi: 10.1675/063.039.sp103.

YU, L.; WANG,X.; TING, N.; ZHANG, Y. **Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in high-altitude adaptation.** *Mitochondrion* 11 497–503. 2011. Doi:10.1016/j.mito.2011.01.004

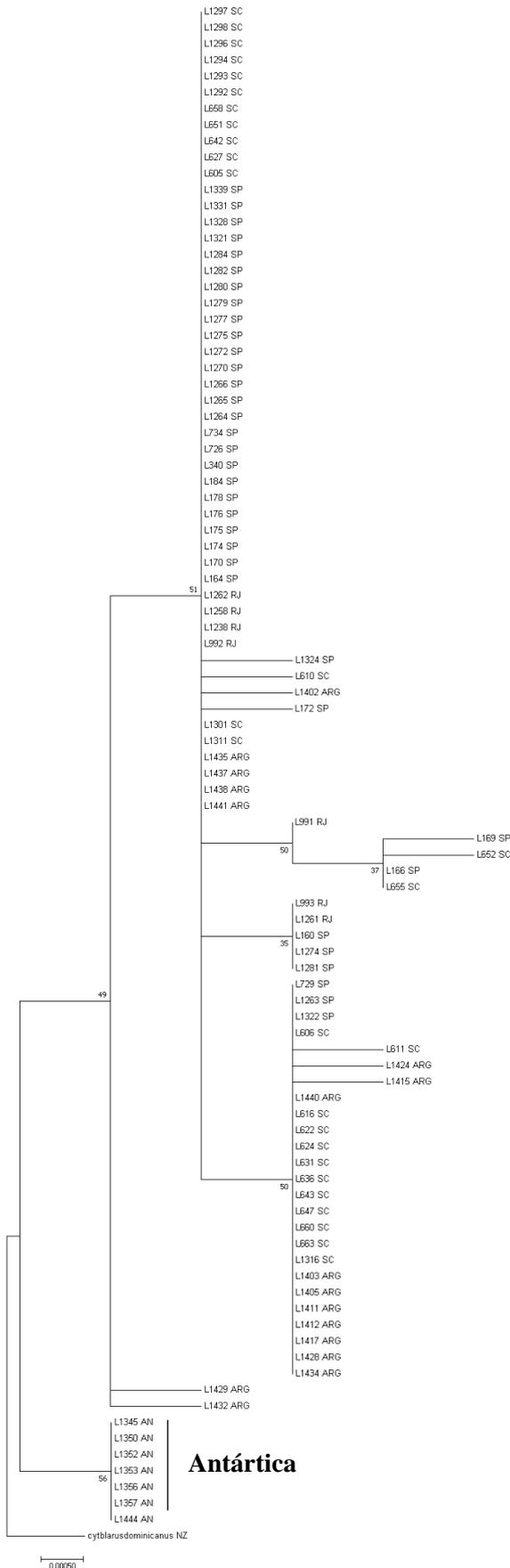
ZINK, R. M. **Natural selection on mitochondrial DNA in *Parus* and its relevance for phylogeographic studies.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, p. 71-78. 2005. Doi: 10.1098/rspb.2004.2908.

	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324		
Nova Zelândia	V	L	A	L	A	A	S	V	L	V	L	F	L	S	P	L	L	H	K	S	K	Q	R	T	M	T	F	R	P	L	S	Q	L		
Am. Sul Consenso
H6	
H7	F
H9
H10
H11
H12	G

	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	
Nova Zelândia	L	F	W	I	L	V	T	N	L	F	I	L	T	W	V	G	S	Q	P	V	
Am. Sul Consenso
H6
H7
H9
H10	H	.	.	.
H11
H12

G=glicina; A=alanina; L=leucina; V=valina; I=isoleucina; P=prolina; F=fenilalanina; S=serina; T=treonina; C=cisteína; Y=tirosina; N=asparagina; Q=glutamina; D=aspartato; E=glutamato; R=arginina; K-lisina; H=histidina; W=triptofano; M=metionina.

ANEXO 2



Análise filogenética molecular pelo Método da Máxima Verossimilhança baseada no modelo de Tamura-Nei¹, conduzida no MEGA 7.0.26². A árvore foi desenhada em escala com comprimento das ramificações medidos pelo número de substituições por sítio. Foi aplicado o algoritmo Neighbor-joining (NJ) e os valores nos nós internos são os valores do bootstrap calculado em 100 replicações. A análise envolveu 95 sequências de nucleotídeos de *L. dominicanus*. Em destaque, dois grandes grupos monofiléticos: o grupo formado pelos indivíduos da Antártica e o outro formado apenas por indivíduos da América do Sul. NZ - Nova Zelândia; AN – Antártica; SC – Santa Catarina; SP – São Paulo; RJ – Rio de Janeiro.

América do Sul

¹TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, p. 512-526. 1993.

²KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7), p. 1870-1874. 2016. doi:10.1093/molbev/msw054.