

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

Thaís Augusta Maia

GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DO PATO-MERGULHÃO
***Mergus octosetaceus* VIEILLOT, 1817**

Belo Horizonte

2015

Thaís Augusta Maia

GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DO PATO-MERGULHÃO
***Mergus octoetaceus* VIEILLOT, 1817**

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

Orientadora: Dra. Gisele P. M. Dantas

Co-orientador: Fabrício Rodrigues dos Santos

Belo Horizonte

2015

Thais Augusta Maia

GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DO PATO-MERGULHÃO

***Mergus octoetaceus*, VIELLOT, 1817**

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

Gisele Pires de Mendonça Dantas (Orientadora) – PUC Minas

Fabício Rodrigues dos Santos (Co-orientador)- UFMG

Flávia Torres Presti UNESP

Daniela Rodrigues Lacerda – UFMG

Eloisa Helena Sari Reis (Suplente) - UFMG

Belo Horizonte, 26 de março de 2015.

Aos meus pais Dodora e Anselmo,
co-autores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES, FAPEMIG e Petrobrás, pelo financiamento deste projeto. A todos que se ocupam com a conservação da espécie, em especial às ONGs parceiras, pelo envio de amostras.

Sou grata a minha orientadora Gisele, por ter sido a melhor orientadora que eu poderia “ganhar”. Chegou no meio dessa viagem e revelou-se uma grande timoneira: competente, perspicaz e sensível. Sou também feliz por ter ganhado uma grande amiga. Você é uma linda! Desejo que você navegue por oceanos de alegrias e sucesso.

Ao meu co-orientador Fabrício, por adotar esta “estranha no ninho”, permitir que eu participasse do projeto, frequentasse o Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM) e aprendesse tanto. Foram momentos incríveis.

Ao Marcelo, pela vinda e pela ida. Por ser um exemplo de profissional e, além de tudo, ter me ensinado não ter medo de mudar nem de lutar.

Ao pessoal do LBEM, Laboratório de Diversidade Genética Humana (LDGH) e Laboratório de Citogenética Evolutiva pelos ensinamentos e risadas que tornaram essa caminhada mais leve. Conviver com vocês é um presente do destino. Agradeço especialmente à Pati e Elô, que não medem esforços para ajudar a todos. Ao Davidson, querido amigo guerreiro, que abriu mão de dias, noites, finais-de-semana, natal, réveillon, fábrica e do resto da vida (quase!) para se tornar meu fiel companheiro das bancadas (in)finitas. Desejo a você o mais doce da vida. Ao Zé, meu malvado favorito, por dividir comigo seus conhecimentos com paciência e disposição, por não medir esforços para que obtivéssemos resultados de qualidade.

Agradeço à toda minha família, Maias e Silvas pelo apoio constante. Àquela boa e velha heterogeneidade louca que nos torna mais completos. Em especial, Vó Maria, Vó Zuca e Tia Wanda, pelas orações. À Tia Antonina e ao Pablo, fontes inspiradoras de resiliência. A vida guarda surpresas que nos convencem, de diferentes formas, que todos os momentos têm seus porquês e cada segundo é valioso. Tia Márcia e Tia Lubi, por estarem presentes, mesmo distantes. Ao Moisés, por dividir tudo como um irmão. Ao Marcos, por se revelar tão especial.

Agradeço ao Diego pela paciência. Sou grata também à Helena, Júnia, Jô, Fábio e Duda, pelo acalento durante todos esses anos.

Agradeço aos meus antigos amigos, principalmente aos de Bambuí, por compreenderem a minha “ausência” e a tantos outros que conheci nesse percurso, pela existência.

Por fim agradeço aos meus pais, por sonharem meus sonhos e não me deixarem desistir frente às adversidades. Vocês são o que eu tenho de melhor e mais valioso. Essa conquista é nossa. Amo vocês.

E por tudo isso, obrigada meus guias. Obrigada meu Deus.

**“Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life
You were only waiting for this moment to arise(...)”
Lennon / McCartney**

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO I

FIGURE 1 Success frequency of samples from <i>Mergus octosetaceus</i> (Brazilian Merganser) through loci microsatellites.....	23
FIGURE 2 Frequency relative of number of loci that performed in samples Brazilian Merganser (<i>Mergus octosetaseus</i>).....	23

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO I

TABLE 1: The 27 microsatellite loci tested.....	20
TABLE 2: Loci amplified by different kinds of sample. N:number of samples; Na:number of alleles; Ho: Heterozigosity observed; He: heterozigosity expected; F: Fixation index; P Probability significant	24

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO II

- FIGURA 1 Mapa da América do Sul com Mínimo Polígono Convexo traçado a partir das localidades citadas em registro histórico do pato-mergulhão. 32
- FIGURA 2 Localidades de origem das amostras utilizadas no presente estudo do Pato-Mergulhão (*Mergus octosetaceus*) 35
- FIGURA 3 Árvore de máxima verossimilhança para o gene do citocromo b do Pato-Mergulhão (*M. octosetaceus*), gerada a partir dos dados das sequências do presente estudo e de Vilaça et al.(2012b)..... 44
- FIGURA 4 Padrão alélico entre as populações. Na: número de alelos; Ne: número de alelos efetivos; I: índice de Shannon; He: heterozigosidade 47
- FIGURA 5 Resultado dos cálculos de F_{ST} . Os valores das comparações par a par de populações (à esquerda) e PCoA (à direita). 47
- FIGURA 6 Gráfico representativo do cálculo da estimativa de K 48
- FIGURA 7 Gráfico obtido a partir da relação de cada espécime em relação a cada *cluster*(k=4). Cada barra representa um indivíduo e cada cor representa um *cluster*. As populações estão assinaladas. 48
- FIGURA 8 Distribuição em classes das frequências alélicas (Mode-Shift) utilizando oito locos microssatélites para as três populações de pato mergulhão, segundo o programa Bottleneck. O eixo x encontram-se as classes da frequência e no eixo y a frequência dos alelos 49

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO II

TABELA 1 Lista de primers utilizados no presente estudo para amplificação e sequenciamento	38
TABELA 2 Detalhes dos 7 <i>loci</i> de microssatélites utilizados nesse estudo.....	39
TABELA 3 Relação das amostras amplificadas com sucesso por cada tipo de marcador. L: localidade; A: amostra; M: microssatélites; N: nDNA MUSK; RC: mtDNA região controle; CB: mtDNA cyt b.	42
TABELA 4 Percentual de <i>missing data</i> por <i>locus</i> em cada população. n:número de indivíduos genotipados.....	45
TABELA 5 Diversidade genética por <i>loci</i> para as populações amostradas de pato-mergulhão. Tamanho amostral (N), número de alelos (Na) número de alelos efetivos(Ne), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho), Estatística F (F)	46

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
CAPÍTULO I.....	15
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>16</i>
<i>METHODOLOGY.....</i>	<i>18</i>
<i>RESULTS.....</i>	<i>20</i>
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>24</i>
<i>REFERENCE.....</i>	<i>27</i>
CAPÍTULO II.....	31
<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>32</i>
<i>METODOLOGIA.....</i>	<i>34</i>
<i>RESULTADOS.....</i>	<i>41</i>
<i>DISCUSSÃO.....</i>	<i>49</i>
REFERENCIA	

RESUMO

O *Mergus octosetaceus* é uma das aves mais raras da América do Sul, de ocorrência no território brasileiro, sendo apontada como extinta no Paraguai e Argentina. Análises genéticas populacionais são consideradas prioritárias para a conservação de espécies, como o pato-mergulhão, criticamente ameaçadas de extinção. Os objetivos desse estudo foram: 1) desenvolver marcadores microsatélites espécie-específicos e validar o uso de *loci* heterólogos descritos para outros anseriformes; 2) testar e comparar o sucesso de amplificação de fragmentos de DNA em amostras invasivas (sangue e tecido) e não invasivas (cascas de ovos abandonados ou eclodidos); 3) avaliar a diversidade genética de populações remanescentes através de mtDNA (citocromo *b* e região controle), nDNA (íntron 13 do gene Músculo Esquelético Receptor da Tirosina Quinase - MUSK 13) e microsatélites com implicações para conservação da espécie. As amostras (n=142) utilizadas foram coletadas durante oito anos, provenientes de três localidades: Parque Nacional Chapada dos Veadeiros (PNCV) no estado de Goiás, Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) e Serra do Salitre (SS) em Minas Gerais. Dos 27 *loci* de microsatélites testados (9 heterólogos e 18 espécie-específicos), obtivemos sucesso na amplificação de 7 *loci* dentre eles 2 heterólogos e 5 específicos para o pato-mergulhão. Os *loci* específicos apresentaram maior sucesso de amplificação do que os heterólogos. As amostras invasivas mostraram maior êxito na amplificação em número de *loci* do que as amostras não invasivas, embora a diversidade genética nos dois tipos de amostragem não tenha sido diferentes. As sequências de mtDNA e nDNA analisadas não apresentaram sítios polimórficos, apontando baixa variabilidade genética para o pato-mergulhão. Os dados de microsatélites apontaram baixa variabilidade genética nas populações de *M. octosetaceus*, sendo a população da PNCV a mais diferenciada. Essa baixa diversidade é esperada para uma espécie criticamente ameaçada e provavelmente é decorrente da alta taxa de endogamia e dos efeitos da deriva gênica. Assim, foi concluída a validação do uso de microsatélites para o pato-mergulhão em amostras não invasivas e invasivas. Entretanto, os dados genéticos confirmaram o *status* extremamente crítico de diversidade para essa espécie, tornando-se necessária a criação imediata de programas de recuperação de suas populações.

Palavras-chave: amostras não invasivas, Genética da Conservação, *Mergus octosetaceus*, Microsatélites, mtDNA, nDNA,

ABSTRACT

Mergus octosetaceus is one of the rarest birds of South America, which still occurs in Brazil, but is classified as extinct in Paraguay and Argentina. Genetic analyses of populations are considered a priority for the conservation of species such as the Brazilian Merganser, which are critically endangered. The aims of this study were: 1) develop microsatellite species-specific and validate the use of heterologous loci described for other Anseriformes, 2) to test and compare the successful amplification of DNA fragments from invasive (blood or tissue) and non-invasive samples (abandoned eggs or shells), and 3) to assess the genetic diversity of remnant populations by mtDNA (cytochrome b and control region), nDNA (intron 13 of Skeletal Muscle Receptor Tyrosine Kinase gene - MUSK 13) and microsatellites, thus giving results with implications for conservation. The samples (n = 142) were collected during eight years from three locations: Chapada dos Veadeiros National Park (PNCV) in Goiás state, Serra da Canastra National Park (PNSC) in Minas Gerais, and Serra do Salitre (SS) in Minas Gerais. Of the 27 microsatellite loci tested (nine species-specific and 18 heterologous), we have succeeded in amplifying seven loci, of which two are heterologous and five are species specific to the Brazilian Merganser. The specific loci exhibited the most successful amplification than heterologous. The invasive samples showed a higher rate of successful amplification than non-invasive samples, but genetic diversity in both types of samples were not different. The sequences of mtDNA and nDNA analysed did not show polymorphic sites, indicating low genetic variability for the Brazilian Merganser. Microsatellite data showed low genetic variability within the populations of *M. octosetaceus*, with the population of PNCV being the most differentiated. This low diversity is expected to Critically Endangered species and is probably due to the high inbreeding and gene drift effects. Thus, we validated the use of microsatellites for the Brazilian Merganser for both non-invasive and invasive sampling. However, the genetic data confirmed the extremely critical status of diversity for this species, making it necessary to create immediate recovery programs for their populations.

Key words: Genetic conservation, *Mergus octosetaceus*, Microsatellite, mtDNA, nDNA, Non-invasive samples.