

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

**DIMORFISMO SEXUAL DE TAMANHO,
VARIABILIDADE GENÉTICA E CONECTIVIDADE
INTRAESPECÍFICA DE *Phaethon aethereus* E
Phaethon lepturus NO BRASIL**

GUILHERME TAVARES NUNES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Oceanografia Biológica.

Orientador: Dr. Leandro Bugoni

Co-orientador: Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

RIO GRANDE, RS
Fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Leandro Bugoni, pelo acolhimento no Laboratório de Aves Aquáticas da FURG, pela dedicação em repassar ensinamentos visando sempre a excelência do trabalho, e pelo exemplo de dedicação e paixão pela profissão;

Ao professor Dr. Márcio Amorim Efe, pela oportunidade de trabalhar com os *Phaethon*, pelos ensinamentos em campo, e pela confiança depositada em mim;

Ao professor Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas, por sempre manter abertas as portas do Laboratório de Citogenética e Evolução na UFRGS;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos de Pós-Graduação em nível de Mestrado;

A todos os colegas do Laboratório de Citogenética e Evolução da UFRGS, do Laboratório de Aves Aquáticas da FURG, e àqueles que auxiliaram nas coletas;

À banca desta dissertação: Dr. Matthieu Le Corre (*Université de la Réunion*), e os professores do PPGOB Dr. Eduardo Resende Secchi e Dr. Paul Gerard Kinas (FURG).

Por fim, mas nunca menos importante, à minha família, a qual representa para mim sempre o objetivo final de todo esforço e busca incessante de devolver o apoio incondicional em forma de orgulho.

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS	20
SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXO 1	34
ANEXO 2.....	49

RESUMO

A ordem Phaethontiformes é composta por três espécies de aves marinhas, todas agrupadas no gênero *Phaethon*, as quais não possuem dimorfismo sexual aparente. No Brasil, *P. aethereus* e *P. lepturus* nidificam nos arquipélagos dos Abrolhos (BA) e de Fernando de Noronha (PE), e encontram-se na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção. Este trabalho teve como objetivos testar a existência de dimorfismo sexual de tamanho nessas duas espécies, gerar equações discriminantes para a determinação sexual com base em morfometria, verificar a variabilidade genética das populações de ambas as espécies, testar a ocorrência do efeito de gargalo populacional, e a conectividade intraespecífica entre as populações que nidificam nos dois arquipélagos estudados. Para a análise de dimorfismo sexual foram utilizadas oito variáveis morfométricas e realizada a determinação sexual pelo método molecular, para verificar diferenças intersexuais univariadas. A partir desses dados, foram ajustados modelos lineares generalizados, com o maior poder discriminatório possível. As informações genéticas foram obtidas através da amplificação e genotipagem de 11 *loci* de microssatélites, acessando índices de diversidade genética, distribuição das frequências alélicas, e grau de relação entre as populações dos dois arquipélagos. Para *P. aethereus* foi identificado dimorfismo sexual significativo em quatro variáveis, com machos maiores que fêmeas, e ajustado um modelo com 73,4% de poder discriminatório. Para *P. lepturus*, apenas a corda da asa apresentou diferença intersexual significativa, com fêmeas maiores que machos, e o melhor modelo ajustado discriminou corretamente 70,4% dos indivíduos. Esses resultados representam as primeiras informações sobre dimorfismo sexual na ordem Phaethontiformes. A heterozigosidade média foi baixa para ambas as espécies, o que pode ser explicada pelos altos índices de endocruzamento. Não foram identificados indícios de eventos de gargalo de garrafa recentes. Não há relação intraespecífica entre os arquipélagos estudados, indicando

estruturação populacional de ambas as espécies na costa brasileira. Os resultados ressaltam a necessidade de medidas de conservação que considerem a distinção genética entre as populações de cada arquipélago, de ambas as espécies, bem como a necessidade de estudos que abordem outras questões, como parâmetros reprodutivos e análise filogeográfica, visando a sua conservação.

Palavras-chave: *Phaethon aethereus*, *Phaethon lepturus*, dimorfismo sexual, diversidade genética, gargalo de garrafa populacional, estrutura genética.

ABSTRACT

Sexual size dimorphism, sex determination by morphometrics, genetic diversity and intraspecific connectivity of *Phaethon aethereus* and *Phaethon lepturus* in Brazil. The order Phaethontiformes comprises three seabird species, all grouped in the genus *Phaethon*, which have no apparent sexual dimorphism. In Brazil, *P. aethereus* and *P. lepturus* nest on Abrolhos (BA) and Fernando de Noronha (PE) archipelagos, and are listed as threatened by the Brazilian red list. This study aimed to test the existence of sexual size dimorphism in these two species, to generate discriminant functions for sex determination based on morphometry, to verify genetic diversity of populations for both species, to test the occurrence of recent bottleneck events, and to check intraspecific connectivity for both species between the two archipelagos. For the analysis of sexual dimorphism were used seven morphometric variables and performed sex determination by molecular analysis, in order to verify univariate intersexual differences. From these data, generalized linear models were fitted with the highest discriminatory power. Genetic data were obtained by amplification and genotyping of 11 microsatellite loci, accessing genetic diversity indices, distribution of allelic frequencies, and degree of relationship between populations of the two archipelagos. Males were larger in *P. aethereus*, significant for four variables, and fitted a model with 73.4% of discriminatory power. For *P. lepturus* only wing chord showed significant intersexual difference, with females larger than males, and the best fitted model correctly discriminated 70.4% of individuals. Such results represent the first information on sexual dimorphism in the order Phaethontiformes. Average heterozygosity was low for both species, which could to be explained by high levels of inbreeding. There was no evidence of recent bottleneck events in both species, as well as no intraspecific relationship between archipelagos studied, indicating genetic structuring for both species on the Brazilian coast. These findings highlight that

conservation measures need to take into account the genetic distinctiveness of populations nesting in each island, for both species, as well as the need of studies that address other issues such as breeding parameters and phylogeographic analysis.

Keywords: *Phaethon aethereus*, *Phaethon lepturus*, sexual dimorphism, genetic diversity, population bottleneck, genetic structuring.

INTRODUÇÃO

A ordem Phaethontiformes é composta por apenas três espécies de aves marinhas, todas agrupadas no gênero *Phaethon*, as quais estão distribuídas em latitudes tropicais e subtropicais dos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico, reproduzindo em ilhas oceânicas (Orta 1992). Popularmente conhecidas como rabos-de-palha (CBRO 2011), essas aves apresentam plumagem predominantemente branca e retrizes centrais alongadas, as quais são iguais ou maiores que o comprimento total do corpo sem penas, além de não apresentarem dimorfismo sexual aparente (Harrison 1991).

No Brasil, duas das três espécies da ordem ocorrem regularmente, e encontram-se na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção (MMA 2003). O rabo-de-palha-de-bico-vermelho *Phaethon aethereus* Linnaeus, 1758 (Figura 1a) e o rabo-de-palha-de-bico-laranja *Phaethon lepturus* Daudin, 1802 (Figura 1b) nidificam em colônias nos arquipélagos dos Abrolhos e de Fernando de Noronha (Sick 1997). A principal área de reprodução de *P. aethereus* no Brasil é Abrolhos, com 269 ninhos registrados em 2011 (M. Efe, dados não publicados), porém cerca de uma dezena de indivíduos também nidifica em Fernando de Noronha, como registrado por Oren (1984) e Antas (1991). De forma análoga, o arquipélago de Fernando de Noronha é o principal sítio de reprodução de *P. lepturus* na costa brasileira com 99 ninhos registrados em 2011 (M. Efe, dados não publicados), embora sejam observados alguns indivíduos sobrevoando e reproduzindo em Abrolhos, como registrado pela primeira vez por Efe *et al.* (1992). A terceira espécie da ordem, o rabo-de-palha-de-cauda-vermelha *P. rubricauda* Bodaert, 1873, foi registrada no Brasil apenas um indivíduo, vagante, em Abrolhos (Couto *et al.* 2001).

Seguindo o padrão geral das aves marinhas quanto ao dimorfismo sexual, os rabos-de-palha têm plumagem monocromática e são aparentemente monomórficos entre os sexos, sem

qualquer carácter de discriminação sexual visível ao olho humano (Schreiber e Burger 2001). No entanto, embora as aves marinhas tendam a ser monomórficas sexualmente, um crescente número de estudos tem identificado algum grau de dimorfismo sexual em relação ao tamanho corporal, geralmente na forma de pequenas diferenças morfométricas, as quais podem ter papel fundamental na reprodução, através da seleção sexual, ou na alimentação, através da segregação de nicho (Croxall 1995). Com exceção da ordem Phaethontiformes, essas diferenças já foram estudadas e constatadas em todas as ordens de aves marinhas: Charadriiformes (Devlin *et al.* 2004), Pelecaniformes (Dorr *et al.* 2005), Sphenisciformes (Bertellotti *et al.* 2002), Procellariiformes (Copello *et al.* 2006), e Suliformes (Quintana *et al.* 2003).

Além de ser uma informação básica acerca da biologia da espécie, a identificação de dimorfismo sexual relacionado ao tamanho (*Sexual Size Dimorphism* - SSD) é a base para o esclarecimento de importantes questões ecológicas e evolutivas, principalmente sobre as funções desse dimorfismo, como a seleção sexual e utilização diferencial do hábitat entre os sexos (Serrano-Meneses e Székely 2006). Nesse contexto, a presença do dimorfismo ainda possibilita a identificação do sexo das aves em campo, através de um método menos invasivo e sem custo, que utiliza apenas as diferenças morfológicas para discriminar os sexos (*e.g.*, Gill e Vonhoff 2006, Einoder *et al.* 2008).

Estudos fornecendo equações discriminantes para determinação sexual baseadas em caracteres morfológicos duplicaram na última década, principalmente pela eficiência e praticidade, pois em geral não requerem licenças especiais para coleta de sangue, tampouco gastos de tempo e recursos financeiros no processamento das amostras (Dechaume-Moncharmont *et al.* 2011). Dessa forma, a identificação de diferenças morfométricas entre os sexos, e o desenvolvimento de equações discriminantes baseadas nessas diferenças, viabiliza

e refina a interpretação de dados comportamentais e ecológicos, permitindo a otimização de iniciativas de conservação (Székely *et al.* 2007).

Na costa brasileira, a principal ameaça aos rabos-de-palha é a presença de espécies exóticas invasoras em suas colônias, como gatos, ratos, lagartos e cabras (Efe 2008). Além disso, ambos os arquipélagos apresentam um histórico de ocupação humana nos últimos séculos, período no qual as características naturais de cada local foram alteradas significativamente pelo homem (Donato 1987, Lins e Silva 2003). A presença de espécies exóticas invasoras, juntamente com o distúrbio antrópico, está entre as principais ameaças para as aves marinhas em todo o mundo (Croxall *et al.* 2012). Uma das consequências da degradação ou destruição de hábitat é a redução do número de indivíduos de uma população (*bottleneck*), o que pode intensificar processos como o endocruzamento, e perdas de diversidade genética e potencial evolutivo (Frankham *et al.* 1999, Lande 1995).

Nesse contexto, esforços de conservação são importantes para a recuperação populacional, porém a biologia reprodutiva da própria espécie poderia influenciar na velocidade dessa recuperação. Os rabos-de-palha podem ser exemplo disso, pois possuem características reprodutivas que não são favoráveis a uma rápida resposta a medidas de conservação, como o fato de (1) geralmente nidificarem diretamente no solo ficando mais expostos à predação, (2) colocarem apenas um ovo sem substituição em caso de perda do ovo ou do ninhego, (3) ninhegos ficarem sozinhos nos ninhos enquanto adultos se alimentam no mar, (4) não haver cuidado parental após o filhote sair do ninho (Orta 1992), e ainda, (5) apresentarem baixo sucesso de eclosão devido a fatores ambientais (Castillo-Guerrero *et al.* 2011).

Dessa forma, pelas ameaças citadas acima é possível que gargalos de garrafa populacionais tenham ocorrido nas populações de rabos-de-palha na costa brasileira, e que tais populações ao passarem por um declínio populacional, tenham sofrido perda de

diversidade genética. Apesar disso, desde a década de 1980 ambos os arquipélagos estão protegidos pela legislação ambiental brasileira e são considerados unidades de conservação nacionais, o que pode estar contribuindo para a estabilização e recuperação dessas populações, de forma semelhante ao que vem ocorrendo com outras populações de aves após a aplicação de medidas de conservação (Groombridge *et al.* 2001, Rains *et al.* 2011). Dessa forma, partindo do pressuposto que populações que passaram por eventos de gargalo populacional recentemente apresentam deficiência de alelos raros, é possível detectar a ocorrência de eventos desse tipo através de testes que considerem a distribuição de frequências alélicas, e ainda a análise de excesso de heterozigosidade em relação ao número de alelos (Cornuet e Luikart 1996).

As aves marinhas, apesar de sua grande capacidade de deslocamento, são conhecidas por serem altamente filopátricas (Schreiber e Burger 2001). Dessa forma, sua capacidade de movimentação não condiz necessariamente com a capacidade de dispersão como comprovado para o tesourão *Fregata magnificens* (espécie com a maior relação área de asa *vs.* volume corporal [*wing-loading*] entre todas as aves), a qual se mantém isolada geneticamente no arquipélago de Galápagos (Hailer *et al.* 2011). Porém, não existe uma regra sobre estruturação genética para o grupo, principalmente para populações sem barreiras físicas históricas ou atuais, embora haja uma associação entre padrões de distribuição durante o período reprodutivo com a estruturação genética (Friesen *et al.* 2007), ainda não testada em rabos-de-palha. O entendimento da estruturação de populações tem influência direta sobre a otimização de esforços de conservação, a partir da definição de unidades de conservação e execução de medidas efetivas para problemas específicos de cada unidade (Fraser e Bernatchez 2001).

Os rabos-de-palha não têm apenas sua estruturação genética desconhecida, mas também outros aspectos populacionais relacionados à sua conservação como os parâmetros de diversidade genética, uma das três questões mais importantes para a conservação de

populações naturais no mundo, de acordo com a Estratégia Mundial de Conservação (IUCN 1980). Além disso, no Brasil as populações de aves marinhas têm sido tratadas como unidades homogêneas principalmente pela ausência de estudos direcionados a essa questão e, além disso, apenas uma pequena parte (cerca de 5%) dos estudos com aves marinhas tem objetivado a conservação, sendo que nenhum estudo de dinâmica populacional com as espécies do gênero *Phaethon* foi realizado até então na costa brasileira (Moraes-Ornellas 2009). Isso reforça a necessidade de estudos direcionados à conservação das populações dessas aves na costa brasileira e, nesse contexto, os marcadores moleculares podem auxiliar na conservação, pois refinam a compreensão ecológica e evolutiva e fornecem soluções para problemas específicos de cada população ou espécie (Taylor e Friesen 2012). Para esses fins, os microssatélites, os quais são pequenos segmentos do DNA nuclear com repetições em *tandem* de 2-5 bases nitrogenadas, têm vantagens sobre outros marcadores moleculares para medir variabilidade genética, pois são altamente polimórficos e permitem a caracterização individual (Hartl e Clark 2010).

Dessa forma, esse estudo foi dividido em duas partes, apresentadas como Anexos 1 e 2. Na primeira parte utilizou-se uma abordagem estatística, baseada em dados morfométricos, para responder questões sobre o dimorfismo sexual em relação ao tamanho para *P. aethereus* e *P. lepturus*. Nesse estudo, os objetivos foram: (1) identificar o grau de dimorfismo sexual em relação ao tamanho corporal (SSD) nas duas espécies de *Phaethon* e determinar em quais caracteres esse dimorfismo está expresso, (2) gerar modelos de regressão logística a partir de medidas morfométricas para discriminar os sexos de ambas as espécies, e (3) avaliar o poder discriminatório de cada um dos modelos ajustados.

Na segunda parte da dissertação foram utilizados dados genéticos, a partir da amplificação de microssatélites, para fornecer informações úteis à conservação das populações de ambas as espécies na costa brasileira. Portanto, no segundo anexo, os objetivos

foram: (1) determinar a variabilidade genética da população de *P. aethereus* no arquipélago dos Abrolhos e da população de *P. lepturus* em Fernando de Noronha, (2) testar a ocorrência do efeito de gargalo populacional nas duas populações supracitadas, e (3) avaliar a conectividade intraespecífica para ambas as espécies entre os dois arquipélagos.

Nesta dissertação apresenta-se de modo objetivo, em português, uma introdução sobre os temas estudados, bem como a descrição da metodologia aplicada para atingir os objetivos de cada anexo, os respectivos resultados, e principais conclusões da dissertação. Após estão os dois anexos, formatados como artigos científicos, sendo que o primeiro segue diretrizes específicas de submissão da revista *Waterbirds* (Fator de Impacto 2011: 0,757), para onde já foi submetido, e o segundo segue diretrizes da revista *Journal of Avian Biology* (Fator de Impacto 2011: 2,28).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Fernando de Noronha possui 21 km² e é constituído por 21 ilhas e ilhotas, as quais possuem origem vulcânica. Localiza-se a 3°50'S e 32°24'O, sendo que o ponto mais próximo do continente americano (Cabo de São Roque - RN) está a 345 km (Anexo 2, Figura 1). O clima é do tipo tropical quente oceânico (Aw, segundo a classificação pelo sistema de Köppen), com temperatura média de 26,5°C e pluviosidade média anual de 1300 mm (Rocha 1995). Porém, os maiores índices pluviométricos se concentram entre os meses de março a julho, seguidos por um longo período de estiagem, compreendido entre agosto e fevereiro (Almeida 1955). Atualmente, o arquipélago é considerado uma *Important Bird Area* (Devenish *et al.* 2009), além de ser uma unidade de conservação federal, sendo 2/3 da categoria Parque Nacional Marinho e 1/3 de Área de Proteção Ambiental.

O arquipélago dos Abrolhos é constituído por cinco ilhas dispostas circularmente, as quais também possuem origem vulcânica. Localiza-se a 17°50'S e 38°35'O, distando 105 km da cidade de Caravelas, sul do estado da Bahia. O clima é do tipo tropical quente oceânico, com pluviosidade média anual de 1850 mm e temperatura média de 23°C (NIMER 1989). Atualmente, quatro ilhas do arquipélago estão protegidas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação, categorizadas como Parque Nacional Marinho. A ilha de Santa Bárbara, a maior do arquipélago, está sob administração da Marinha do Brasil e não pertence à unidade de conservação.

Amostragem

Nos anos de 2011 e 2012 foram capturados nos ninhos, em período de reprodução, 57 *P. lepturus* em Fernando de Noronha, e 160 *P. aethereus* em Abrolhos. Além disso, foram capturados dois *P. aethereus* adultos em Fernando de Noronha, e um *P. lepturus* juvenil em Abrolhos, todos os três indivíduos capturados nos seus respectivos ninhos. À exceção deste indivíduo juvenil, todos os demais indivíduos eram adultos e, desses, oito medidas corporais foram tomadas: comprimento de bico (cúlmen exposto); narina à ponta do bico (medida da extremidade distal da narina até a ponta do bico); largura do bico (medida na altura das narinas, em mm); altura do bico (medida na altura das narinas, em mm); comprimento total da cabeça (medida da ponta do bico até a junção parietal-supraoccipital, em mm); comprimento do tarso (da articulação meiotarsal até a proximidade distal do tarsometatarso, em mm); corda da asa (da articulação do carpo à maior rêmige primária, com a asa fechada, em mm); e massa corporal, em g. As duas penas centrais são alongadas e podem exceder o comprimento total da ave (Orta 1992), porém, essas penas geralmente são encontradas quebradas em função dos movimentos da ave no interior das tocas onde nidificam, o que torna inviável investigar variações intersexuais usando esse carácter.

Seguindo procedimento padrão, a corda da asa foi medida usando uma régua de metal com paragem (± 1 mm), enquanto todas as outras medidas foram realizadas usando paquímetros Vernier digitais ($\pm 0,01$ mm). A massa corporal foi medida com precisão de 5 g usando balança de mola tipo dinamômetro (Pesola[®]), mas essa variável foi excluída da análise devido às suas variações durante a estação reprodutiva (Croxall 1995). Todas as medidas de *P. lepturus* foram realizadas pelo biólogo Gustavo da Rosa Leal. Por outro lado, as medidas de *P. aethereus* foram realizadas em parte pela bióloga Cynthia Campolina, e em outra parte pelo biólogo Dr. Márcio Amorim Efe. A fim de evitar reamostragens, todas as aves amostradas foram identificadas com anilhas metálicas CEMAVE/ICMBio. Amostras de sangue de cada indivíduo foram coletadas e armazenadas em cartão FTA[®] para extração de DNA, e posterior genotipagem e determinação molecular do sexo.

Extração de DNA e determinação molecular do sexo

No laboratório, o DNA foi extraído das amostras de sangue usando o protocolo de Boyce *et al.* (1989), o qual emprega o uso do detergente catiônico CTAB. Para a determinação sexual, foram amplificados os íntrons sexo-específicos localizados nos genes CHD (Ellegren 1996), o que foi realizado utilizando os *primers* P2-P8 (Griffiths *et al.* 1998) através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O volume final das reações de amplificação foi de 10 μ L contendo 10 ng de DNA, 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 μ M de dNTP, tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 unidade de Taq DNA-polimerase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen, Carlsbad, California). As amplificações foram executadas da seguinte maneira: desnaturação da fita dupla de DNA a 94°C durante cinco minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C durante um minuto, anelamento dos *primers* a 46°C durante um minuto, e alongamento final a 72°C durante cinco minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 8%, e revelados utilizando a metodologia

de coloração com nitrato de prata (Bassam *et al.* 1991). Machos foram caracterizados pela presença de apenas uma banda no gel (duas cópias do íntron CHD-Z sobrepostas), enquanto fêmeas foram caracterizadas pela presença de duas bandas (cópias de CHD-Z e CHD-W, as quais possuem diferentes pesos moleculares). Todas as aves foram sexadas com sucesso.

Análises estatísticas de dimorfismo sexual e determinação de sexo por morfometria

De acordo com Zar (2010), os valores extremos (*outliers*) de cada variável podem representar erros de amostragem ou até mesmo amostras reais que se distanciam da média do conjunto amostral. Barnett e Lewis (1994) definem *outliers* como “uma observação, a qual parece ser inconsistente com o restante do conjunto de dados”, e sugerem que esses dados podem ser retirados da amostra total, ou acomodados nela através do emprego de métodos estatísticos robustos. Portanto, para a análise de dimorfismo sexual (teste *t* univariado), os *outliers* foram identificados através de teste de probabilidade baseado no desvio padrão de cada amostra (método implementado no programa BioEstat 5.0, Ayres *et al.* 2007), e retirados do conjunto total permitindo um máximo de cinco *outliers* por conjunto, de acordo com Rosner (2011). Por outro lado, para a regressão logística os *outliers* identificados foram acomodados no conjunto amostral total de cada espécie, pois essa análise mostrou-se robusta o suficiente para suportar violações de pressupostos, como a distribuição não-normal dos dados e a própria presença de *outliers* (Hair *et al.* 2009). Dessa forma, normalidade univariada e homoscedasticidade foram testadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, para o conjunto amostral sem *outliers*. Todos os indivíduos de ambas as espécies apresentaram igualdade nas matrizes de covariância, e os dados de todas as variáveis estavam normalmente distribuídos. Após a confirmação do sexo de cada ave por análise molecular, diferenças intersexuais a partir das medidas morfométricas foram acessadas através de teste *t* univariado. Além disso, o valor de *P* foi ajustado com correção de

Bonferroni para comparações múltiplas (Zar 2010). O índice de SSD foi calculado como a razão entre os valores médio de fêmeas e machos, para cada variável.

A capacidade de discriminação sexual através de morfometria foi examinada utilizando-se Modelos Lineares Generalizados (GLMs) com erros binomiais e uma função de ligação *logit*, na qual o sexo foi tratado como uma variável-resposta binária. Correlação de Pearson foi utilizada para identificar interação entre as variáveis, excluindo aquelas correlacionadas entre si ($P < 0.05$). Variáveis significativas foram selecionadas manualmente, testando o desvio das probabilidades de modelos completos e reduzidos (Burnham e Anderson 2002). Os melhores modelos para cada espécie foram selecionados utilizando-se os Critérios de Informação de Akaike (*Akaike's Information Criteria* - AIC), assumindo que os menores valores indicam um melhor ajuste do modelo.

A partir dos modelos selecionados para *P. aethereus*, dois métodos de validação foram aplicados: (1) com todo o conjunto de dados que foi utilizado para ajustar os modelos; e (2) com uma amostra obtida a partir de seleção aleatória sem reposição (método *jackknife*), com 50% do conjunto total de dados (conforme Dechaume-Moncharmont *et al.* 2011). Devido ao pequeno tamanho amostral de *P. lepturus*, os modelos selecionados para essa espécie foram validados apenas com o conjunto total de dados. O melhor modelo para cada espécie foi aquele com o maior parsimônia, e maior poder discriminatório. O ponto de corte (C) dos escores discriminantes para cada modelo foi calculado conforme Hair *et al.* (2009), considerando grupos com diferentes número de indivíduos, da seguinte maneira:

$$C = \frac{(Nf*Zm)+(Nm*Zf)}{Nf+Nm}, \quad (\text{eq. 1})$$

na qual N é o tamanho da amostra para machos (m) e fêmeas (f), e Z é o centróide (média dos escores discriminantes) para cada sexo. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team 2011).

Amplificação dos microssatélites e genotipagem

As análises de variabilidade genética, gargalo de garrafa populacional e conectividade intraespecífica foram realizadas a partir do sangue já extraído conforme tópico acima, e de 11 *loci* polimórficos de microssatélites por espécie, isolados de *P. lepturus* e publicados previamente por Humeau *et al.* (2011). Dos 11 *loci* descritos por Humeau *et al.* (2011), o *locus* P4G1 não amplificou amostras de *P. lepturus* coletadas no Brasil, enquanto que P3F3 não amplificou amostras de *P. aethereus*.

Amplificações por PCR foram conduzidas com um volume de 20 μ L contendo 20-30 ng de DNA, 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 μ M de um *primer* marcado com fluorescência na extremidade (HEX/FAM), 0,2 μ M dNTP, tampão de PCR 1x, 1,5 mM MgCl₂ e 1,0 unidade de Taq DNA-polimerase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen, Carlsbad, California). As amplificações no termociclador foram conduzidas da seguinte forma: desnaturação a 95°C durante 15 minutos, 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 90 segundos, 72°C durante 60 segundos, e alongamento final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em um aparelho ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, California), e a leitura dos alelos foi realizada utilizando o programa Peak Scanner versão 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, California).

Análises estatísticas dos microssatélites

A diversidade genética em cada população estudada foi medida utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Schneider *et al.* 2000), através do número de alelos por *locus* (N), número médio de alelos por *locus* (riqueza alélica [\bar{A}]), heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_E) a partir das proporções de Hardy-Weinberg (Nei 1978), heterozigosidade média (H) e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW, Guo e

Thompson 1992). O programa GENEPOP *online* (<http://genepop.curtin.edu.au/>) foi utilizado para cálculos de déficit/excesso de heterozigotos e correções de Bonferroni sequenciais, as quais foram aplicadas para corrigir comparações simultâneas múltiplas (Rice 1989). Estatística F de Wright, baseada na variância das frequências alélicas, foi utilizada para analisar estrutura populacional interna das populações (F_{IS}), conforme algoritmos de Weir e Cockerham (1984), os quais estão implementados no programa GENEPOP *online*. A acurácia dos *loci* de microssatélites amplificados para estimar o nível de endocruzamento foi verificada através de correlação de Pearson entre heterozigosidade observada e o coeficiente de endocruzamento no programa R (R Development Core Team 2011).

Para identificar evidências de gargalo populacional em cada população foram utilizadas duas abordagens complementares. O primeiro é um método gráfico que ilustra o déficit de alelos raros na população, através do formato da distribuição de frequências alélicas: quando o gráfico está em formato de ‘L’, a população está naturalmente sofrendo as distribuições de mutação e deriva genética; quando não apresenta formato de ‘L’, é uma indicação da ocorrência de gargalos populacionais recentes (Luikart *et al.* 1998). O segundo é um método estatístico que compara o excesso de heterozigosidade observada com o número de alelos em cada *locus*, assumindo equilíbrio de mutação e deriva. Essa relação foi calculada utilizando o teste de classificação de assinatura de Wilcoxon, sendo que os cálculos foram baseados nos modelos de mutação gradual (*stepwise mutation model*) (Valdes *et al.* 1993) e de mutação em duas fases (*2-phase mutation model*) (Di Rienzo *et al.* 1994), executados no programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996).

O grau de relação intraespecífica entre Fernando de Noronha e Abrolhos para ambas as espécies foi verificado através do método Bayesiano de Monte Carlo via cadeias de Markov (*Markov Chain Monte Carlo* - MCMC), o qual examina a distinção das populações e o agrupamento de genótipos individuais utilizando o programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard

et al. 2000). Para a análise foi utilizado um período *burn-in* de 10.000, e um milhão de repetições MCMC após *burn-in*, seguindo recomendações de Pritchard *et al.* (2010). Também foi aplicado o modelo de ancestralidade que utiliza informação populacional *a priori* para testar a ocorrência de indivíduos migrantes (GENSBACK=2, MIGRPRIOR=0.05, ALFA=1.0) (Pritchard *et al.* 2010). A definição do número de populações assumidas (K) foi conduzida para se obter o maior $\ln \Pr(X|K)$ e o menor valor de K, conforme Pritchard *et al.* (2010). Dessa forma, foram plotados os valores de $\ln \Pr(X|K)$ correspondentes para cada K, sendo considerado o mais acurado aquele onde a curva estabilizou (*more-or-less plateaus*, Anexo 2, Figura 2). Apesar disso, o K com o maior $\ln \Pr(X|K)$ foi comparado a K=2, visto que os arquipélagos estão separados por 1.700 km e, inicialmente, os indivíduos foram assumidos como sendo representantes de duas populações distintas. Além disso, ainda foram calculadas diferenças gênicas de cada espécie entre os arquipélagos através do teste de probabilidade de Fisher, utilizando o programa GENEPOP *online*.

RESULTADOS

Dimorfismo sexual e determinação de sexo por morfometria

Rabo-de-palha-de-bico-laranja *Phaethon aethereus*. Machos apresentaram as medidas de comprimento de bico, narina à ponta do bico, comprimento total da cabeça e corda da asa, maiores do que as fêmeas (Anexo 1, Tabela 1). Comprimento de bico, narina à ponta do bico e comprimento total da cabeça apresentaram correlação ($P < 0.001$), e as duas últimas foram excluídas da matriz de dados utilizada para ajustar os GLMs. Dessa forma, comprimento de bico e corda da asa contribuíram significativamente para a determinação sexual (Anexo 1, Tabela 2), identificando corretamente o sexo de 108 das 160 aves incluídas na análise (67,5%), através da seguinte equação:

$$D = (\text{comprimento do bico} * 0,33) + (\text{corda da asa} * 0,11) - 17,76$$

(eq. 2)

Indivíduos com escores discriminantes $D < -0,01$ foram sexados como fêmeas, enquanto aqueles com $D \geq -0,01$ foram machos. O método de validação *jackknife* classificou corretamente 65% dos indivíduos, os quais foram aleatoriamente selecionados da matriz de dados original.

Rabo-de-palha-de-bico-amarelo *Phaethon lepturus*. Para essa espécie, o SSD foi detectado apenas para a corda da asa. Porém, os valores do índice de SSD indicaram dimorfismo sexual reverso (RSD) para esse caractere (Anexo 1, Tabela 3). Assim como para *P. aethereus*, comprimento do bico, narina à ponta do bico, e comprimento total da cabeça apresentaram correlação ($P < 0.001$), e as duas últimas variáveis foram excluídas da matriz de dados para o ajuste dos GLMs. Nesse caso, quatro variáveis (corda da asa, comprimento de bico, altura do bico e largura do bico) contribuíram com o ajuste do melhor modelo (menor AIC, Tabela 4). O modelo com as quatro variáveis supracitadas apresentou a melhor classificação das aves previamente sexadas através do DNA, determinando corretamente o sexo de 39 das 54 aves analisadas: 20 fêmeas (80,0%) e 19 machos (65,5%). Apesar disso, a discrepância nas taxas de classificação entre os sexos foi maior nesse modelo do que no modelo com o segundo melhor ajuste. Portanto, o melhor modelo deve ser considerado aquele que utiliza apenas corda da asa, altura do bico e largura do bico, o qual classifica um menor número de indivíduos (38 de 54), mas inclui um menor número de variáveis e taxas de classificação mais similares entre machos e fêmeas. O modelo é o seguinte:

$$D = (\text{corda da asa} * -0,15799) + (\text{largura do bico} * 1,3892)$$

$$+ (\text{altura do bico} * 0,79786) + 41,93815 \quad (\text{eq. } 3)$$

Assim, indivíduos com escores discriminantes $D < 0,129$ foram sexados como fêmeas, enquanto aqueles com $D \geq 0,129$ foram machos.

Polimorfismos dos microsatélites e variabilidade genética

Todos os *loci* amplificados para ambas as espécies foram polimórficos. O número total de alelos foi de 78 para *P. lepturus* em Fernando de Noronha, com média de 7,8 alelos por *locus* (Anexo 2, Tabela 1). A heterozigosidade média para essa espécie foi $H = 0,454$, sendo que 5 *loci* apresentaram desvios significativos das proporções genótípicas esperadas conforme EHW, após correção de Bonferroni para múltiplos testes ($P < 0,01$). O teste global utilizando todos os *loci* mostrou desvio significativo do EHW para a população de *P. lepturus* em Fernando de Noronha ($P < 0,001$). O teste baseado em MCMC ($P < 0,01$ após correção de Bonferroni) indicou déficit de heterozigotos em apenas 2 dos 10 *loci* analisados para a espécie, mas considerando $P < 0,05$ o déficit de heterozigotos ocorreu em 7 *loci*.

O número total de alelos presentes na população de *P. aethereus* de Abrolhos foi 40, com média de 4 alelos por *locus*. A heterozigosidade média para a espécie foi $H = 0,309$, e 8 *loci* apresentaram desvios significativos das proporções genótípicas esperadas conforme EHW. O teste global mostrou desvio significativo do EHW para a população de *P. aethereus* em Abrolhos ($P < 0,001$). Além disso, o teste baseado em MCMC indicou déficit de heterozigotos em 7 dos 10 *loci* amplificados (considerando $P < 0,01$ após correção de Bonferroni).

Tanto *P. aethereus* ($r^2 = -0,7607$, $P = 0,009$) quanto *P. lepturus* ($r^2 = -0,7927$, $P = 0,003$) apresentaram correlação significativa entre H_O e F_{IS} , confirmando a utilidade dos *loci* de microsatélites amplificados como indicadores acurados do nível de endocruzamento em

cada população estudada, conforme Allendorf e Luikart (2007). A população de *P. lepturus* de Fernando de Noronha apresentou $F_{IS} = 0,230$ ($P < 0,0001$) enquanto a população de *P. aethereus* de Abrolhos apresentou $F_{IS} = 0,553$ ($P < 0,0001$).

Gargalo de garrafa populacional

Gargalos populacionais causam mudanças características na distribuição de frequências alélicas, as quais são interpretadas como perda de alelos de baixa frequência e aumento na abundância relativa de alelos com frequências alta e intermediária (Frankham *et al.* 2002). As distribuições das frequências alélicas foram similares para as duas espécies, com as maiores proporções de alelos em baixas frequências (0,01-0,2), resultando em um gráfico em formato de ‘L’ e ausência de ocorrência do efeito de gargalo de garrafa populacional recente (Anexo 2, Figura 3). O teste para excesso de heterozigosidade resultou em valores de P não significativos para ambas as espécies nos dois modelos rodados. Para *P. aethereus* os valores de P para o excesso de heterozigosidade em relação ao número de alelos foram 0,996 para *2-phase mutation model* e 0,997 para *stepwise mutation model*. Para *P. lepturus* os valores de P destes modelos foram, respectivamente, 0,958 e 0,998. Esses dados dão suporte ao resultado do método gráfico, indicando que as populações não passaram por um evento de gargalo populacional recentemente.

Relação intraespecífica entre tropicbirds de Abrolhos e Fernando de Noronha

O indivíduo de *P. lepturus* amostrado em Abrolhos apresentou 8 alelos exclusivos, presentes em 8 dos 10 *loci* amplificados, e o modelo de teste para migrantes assumindo a existência de duas populações ($K = 2$) indicou que a probabilidade deste indivíduo pertencer à população de Fernando de Noronha é $< 1\%$ (Anexo 2, Figura 4a). O teste de probabilidade de

Fischer, de diferença gênica entre as ‘populações’, confirmou essa acentuada diferença intraespecífica ($\chi^2 = 92,756$; gl = 18; $P < 0,0001$).

Por sua vez, a relação dos indivíduos de *P. aethereus* amostrados em Fernando de Noronha com a população de Abrolhos foi estimada com base em $K=4$ (Anexo 2, Figura 4b), onde iniciou a estabilização da curva (*more-or-less plateaus*), e comparada com $K=2$ (Anexo 2, Figura 4c). Esses dois indivíduos apresentaram apenas um alelo exclusivo, o qual ocorreu no *locus* P3A3. Apesar disso, a análise com $K=2$ revelou que a probabilidade dos indivíduos amostrados em Fernando de Noronha pertencerem à população de Abrolhos é de apenas 12,7% e 32,6%, com uma diferença de frequências alélicas entre as populações de 22,8%. A análise com $K=4$ confirmou o resultado anterior e intensificou a diferença entre as populações, demonstrando que esses dois indivíduos possuem relação ancestral de apenas 3,7% com a população de Abrolhos. Além disso, o teste de probabilidade de Fischer também indicou uma diferença gênica significativa entre os indivíduos amostrados em Fernando de Noronha com a população residente em Abrolhos ($\chi^2 = 37,236$; gl = 20; $P = 0,005$).

SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

1. Esse estudo fornece as primeiras informações a respeito da existência de dimorfismo sexual de tamanho para a ordem Phaethontiformes;
2. Demonstrou-se pela primeira vez que a ordem Phaethontiformes não segue um padrão quanto ao dimorfismo sexual de tamanho, pois para *P. aethereus* machos são maiores que as fêmeas, enquanto para *P. lepturus* fêmeas são maiores;
3. Embora tenham sido ajustados modelos para a determinação de sexo baseados em dados morfométricos, com poder discriminatório superior a 70% para ambas as espécies, a

sobreposição das variáveis entre os sexos é grande e, provavelmente, um maior tamanho amostral não iria superar o poder discriminatório encontrado neste estudo;

4. A heterozigosidade média tanto para a população de *P. aethereus* em Abrolhos, quanto para *P. lepturus* em Fernando de Noronha, estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, apresentaram níveis mais baixos do que outras espécies de aves marinhas com tendência de declínio populacional, conforme lista da IUCN. O endocruzamento pode ser a explicação para isso, pois foram encontrados valores altos e significativos de F_{IS} ;

5. De acordo com o gráfico de distribuição das frequências alélicas, o qual apresentou formato em “L”, não ocorreu efeito de gargalo de garrafa populacional recente nas populações de *P. aethereus* em Abrolhos e de *P. lepturus* em Fernando de Noronha;

6. O indivíduo de *P. lepturus* amostrado em Abrolhos não é oriundo da população de Fernando de Noronha e, da mesma forma, os dois indivíduos de *P. aethereus* amostrados em Fernando de Noronha tem uma baixa probabilidade de serem de Abrolhos. Sugere-se que os mesmos podem ser representantes de populações adjacentes à costa brasileira (*e.g.*, ilha Ascensão, ilhas do Caribe, ou Cabo Verde).

7. Estudos referentes aos parâmetros demográficos de ambas as populações são de extrema importância para relacionar o efeito do endocruzamento com o sucesso reprodutivo. Além disso, as populações estudadas nessa dissertação demonstraram que, mesmo apenas na costa do Brasil, já pode ser detectada estruturação genética. Considerando que são espécies de distribuição pantropical, uma análise filogeográfica é fundamental para esclarecer a existência de estruturação genética dessas espécies em nível global. Dessa forma, unidades de manejo podem ser definidas e esforços de conservação podem ser melhor direcionados de acordo com os problemas específicos de cada população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDORF FW & GH LUIKART. 2007. Conservation and the genetics of populations. Malden, Blackwell Publishing.

ALMEIDA FFM. 1955. Geologia e petrologia do Arquipélago de Fernando de Noronha. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 181p.

ANTAS PTZ. 1991. Status and conservation of seabirds breeding in Brazilian waters. *ICBP Tech. Pub.*, 11: 141-158

AYRES M, M AYRES JR, DL AYRES & AA SANTOS. 2007. BIOESTAT 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém, Ong Mamirauá.

BARNETT V & T LEWIS. 1994. Outliers in statistical data. 3^a edição. Chichester, Wiley.

BASSAM BJ, G CAETANO-ANOLLÉS & PM GRESSHOFF. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196: 80–83.

BERTELLOTTI M, JL TELLA, JA GODOY & G BLANCO. 2002. Determining sex of Magellanic Penguins using molecular procedures and discriminant functions. *Waterbirds*, 25: 479–484.

BOYCE TM, ME ZWICK & CF AQUADRO. 1989. Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123: 825–836.

BURNHAM KP & DR ANDERSON. 2002. Model selection and multimodel inference: A practical information – theoretic approach. New York, Springer-Verlag.

CASTILLO-GUERRERO JA, MA GUEVARA-MEDINA & E MELLINK. 2011. Breeding ecology of the Red-Billed Tropicbird *Phaethon aethereus* under contrasting environmental conditions in the Gulf of California. *Ardea*, 99: 61–71.

CBRO. 2011. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Lista das aves do Brasil. 10^a edição. <http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>. Acessado em 29/01/2012.

- COPELLO S, F QUINTANA & G SOMOZA. 2006. Sex determination and sexual size-dimorphism in Southern Giant-petrels (*Macronectes giganteus*) from Patagonia, Argentina. *Emu*, 106: 141–146.
- CORNUET JM & G LUIKART. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144:2001–2014.
- COUTO GS, LIL INTERAMINENSE & ME MORETTE. 2001. Primeiro registro de *Phaethon rubricauda* Boddaert, 1783 para o Brasil. *Nattereria*, 2: 24–25.
- CROXALL JP. 1995. Sexual size dimorphism in seabirds. *Oikos*, 73: 399–403.
- CROXALL JP, SHM BUTCHART, B LASCELLES, AJ STATTERSFIELD, B SULLIVAN, A SYMES & P TAYLOR. 2012. Seabird conservation status, threats and priority actions: A global assessment. *Bird Cons. Int.*, 22: 1–34.
- DECHAUME-MONCHARMONT FX, K MONCEAU & F CEZILLY. 2011. Sexing birds using discriminant function analysis: A critical appraisal. *Auk*, 128: 78–86.
- DEVENISH C, DF DÍAZ-FERNÁNDEZ, RP CLAY, I DAVIDSON & I YÉPEZ ZABALA (Eds.). 2009. Important Bird Areas Americas - Priority sites for biodiversity conservation. Quito, Ecuador: BirdLife International (BirdLife Conservation Series No. 16).
- DEVLIN CM, AW DIAMOND & GW SAUNDERS. 2004. Sexing Arctic Terns in the field and laboratory. *Waterbirds*, 27: 314–320.
- DI RIENZO A, AC PETERSON, JC GARZA, AM VALDES, M SLATKIN & NB FREIMER. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3166–3170.
- DONATO H. 1987. Dicionário das batalhas brasileiras. Dos conflitos com indígenas às guerrilhas urbanas e rurais. São Paulo, Instituição Brasileira de Difusão Cultural Ltda – IBRASA.

- DORR B, DT KING, JB HARREL, P GERARD & MG SPALDING. 2005. The use of culmen length to determine sex of the American White Pelican. *Waterbirds*, 28: 102–106.
- EFE MA. 2008. *Phaethon aethereus/Phaethon lepturus*. In: MACHADO ABM, GM DRUMMOND & AP PAGLIA (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Vol. II. Brasília, Fundação Biodiversitas, pp. 414–417.
- EFE MA, GS COUTO, ABA SOARES & A SCHULZ-NETO. 1992. Primeiro registro de nidificação de *Phaethon lepturus* Daudin, 1802 no Arquipélago dos Abrolhos, Bahia, Brasil. In: Resumos do II Congresso Brasileiro de Ornitologia. Campo Grande, MS, R.49.
- EINODER LD, B PAGE & SM GOLDSWORTHY. 2008. Sexual size dimorphism and assortative mating in the Short-tailed Shearwater *Puffinus tenuirostris*. *Mar. Ornithol*, 36: 167–173.
- ELLEGREN H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263: 1635–1641.
- FRANKHAM R, JD BALLOU & DA BRISCOE. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, Cambridge University Press.
- FRANKHAM R, K LEES, ME MONTGOMERY, PR ENGLAND, EH LOWE & DA BRISCOE. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim. Cons.*, 2: 255–260.
- FRASER DJ & L BERNATCHEZ. 2001. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Ecol.*, 10: 2741–2752.
- FRIESEN VL, TM BURG & KD McCOY. 2007. Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Mol. Ecol.*, 16: 1765–1785.
- GILL SA & MJ VONHOF. 2006. Sexing monochromatic birds in the field: Cryptic sexual size dimorphism in Buff-breasted Wrens (*Canthorchilus leucotis*). *Ornithol. Neotrop.*, 17: 409–418.

- GRIFFITHS R, MC DOUBLE, K ORR & RJ DAWSON. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.*, 7: 1071–1075.
- GROOMBRIDGE JJ, MW BRUFORD, CG JONES & RA NICHOLS. 2001. Evaluating the severity of the population bottleneck in the Mauritius Kestrel *Falco punctatus* from ringing records using MCMC estimation. *J. Anim. Ecol.*, 70: 401–409.
- GUO S & E THOMPSON. 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics*, 48: 361–372.
- HAILER F, EA SCHREIBER, JM MILLER, II LEVIN, PG PARKER, RT CHESSER & RC FLEISCHER. 2011 Long-term isolation of a highly mobile seabird on the Galapagos. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 278: 817–825.
- HAIR JF, WC BLACK, BJ BABIN & RE ANDERSON. 2009. Multivariate data analysis. 7^a edição. Upper Saddle River, Pearson Prentice-Hall.
- HARRISON P. 1991. Seabirds: an identification guide. Boston, Houghton Mifflin Company.
- HARTL DL & AG CLARK. 2010. Principles of population genetics. 4^a edição. Sunderland, Sinauer Associates Publishers.
- HUMEAU L, D SILVA, S JAQUEMET, J-B REQUIER & M LE CORRE. 2011. Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed Tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). In: Permanent Genetic Resources Note, Agostini *et al.*, *Mol. Ecol. Res.*, 11: 418–421.
- IUCN. 1980. World conservation strategy: Living resource conservation for sustainable development. Disponível online em <http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/WCS-004.pdf>.
- LANDE R. 1995. Breeding plans for small populations based on the dynamics of quantitative genetic variance. In: BALLOU JD, M GILPIN & TJ FOOSE (Eds.). Population management for survival and recovery. New York, Columbia University Press, pp. 318–340.

- LINS-E-SILVA MB. 2003. Caminhos do tempo humano. In: TEIXEIRA W, UG CORDANI, EA MENOR, MG TEIXEIRA & R LINSKER. Arquipélago de Fernando de Noronha. O paraíso do vulcão. São Paulo, Terra Virgem, pp. 101–121.
- LUIKART G, WB SHERWIN, BM STEELE & FW ALLENDORF. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol. Ecol.*, 7: 963–974.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2003. Instrução Normativa MMA de 27 de maio de 2003. <http://www.mma.gov.br>. Acessado em 07/10/2012.
- MORAES-ORNELLAS VS. 2009. Uma análise de 20 anos de produção acadêmica brasileira sobre aves marinhas. *Atual. Ornitol.*, 152: 36–38.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- NIMER E. 1989. Climatologia do Brasil. Rio de Janeiro. IBGE.
- OREN DC. 1984. Resultados de uma nova expedição zoológica a Fernando de Noronha. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zoologia*, 1: 19–44.
- ORTA J. 1992. Family Phaethontidae. In: DEL HOYO J, A ELLIOTT & J SARGATAL (Eds.). Handbook of the birds of the world. Vol. I. Ostrich to Ducks. Barcelona, Lynx Edicions, pp. 280–289.
- PRITCHARD JK, M STEPHENS & P DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- PRITCHARD JK, WEN X & D FALUSH. 2010. Documentation for Structure software version 2.3. Disponível online em http://kinglab.eeb.lsa.umich.edu/EEID/eeid/evolution/Popgen_EEID_2012/Manuals/STRUCTURE_Manual.pdf.

- QUINTANA F, G SOMOZA, M UHART, C CASSARÁ, P GANDINI & E FRERE. 2003. Sex determination of adult Rock Shags by molecular sexing and morphometric parameters. *J. Field Ornithol.*, 74: 370–375.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível online em <http://www.R-project.org/>.
- RAINS D, H WEIMERSKIRCH & TM BURG. 2011. Piecing together the global population puzzle of Wandering Albatrosses: Genetic analysis of the Amsterdam Albatross *Diomedea amsterdamensis*. *J. Avian Biol.*, 42: 69–79.
- RICE WW. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- ROCHA WJS. 1995. Características hidrogeológicas e hidroquímicas da ilha de Fernando de Noronha. Dissertação de Mestrado, UFPE.
- ROSNER B. 2011. Fundamental of biostatistics. 7^a edição. Boston, Brooks/Cole.
- SCHNEIDER S, J-M KUEFFER, D ROESLI & L EXCOFFIER. 2000. ARLEQUIN version 2.1: A software for population genetic data analysis. Geneva, University of Geneva.
- SCHREIBER EA & J BURGER. 2001. Biology of marine birds. Florida, CRC Press.
- SERRANO-MENESES MA & T SZÉKELY. 2006. Sexual size dimorphism in seabirds: Sexual selection, fecundity selection and differential niche-utilisation. *Oikos*, 113: 385–394.
- SICK H. 1997. Ornitologia brasileira: uma introdução. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira.
- SZÉKELY T, T LISLEVAND & J FIGUEROLA. 2007. Sexual size dimorphism in birds. In: BLANCKENHORN W, D FAIRBAIRN & T SZÉKELY (Eds.). Sex, size and gender roles. Oxford, Oxford University Press, pp. 27–37.
- TAYLOR SA & VL FRIESEN. 2012. Use of molecular genetics for understanding seabird evolution, ecology and conservation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 451: 285–304.

VALDES AM, M SLATKIN & NB FREINER. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics*, 133: 737–749.

WEIR BS & CC COCKERHAM. 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.

ZAR JH. 2010. Biostatistical analysis. 5^a edição. Upper Saddle River, Pearson Prentice-Hall.

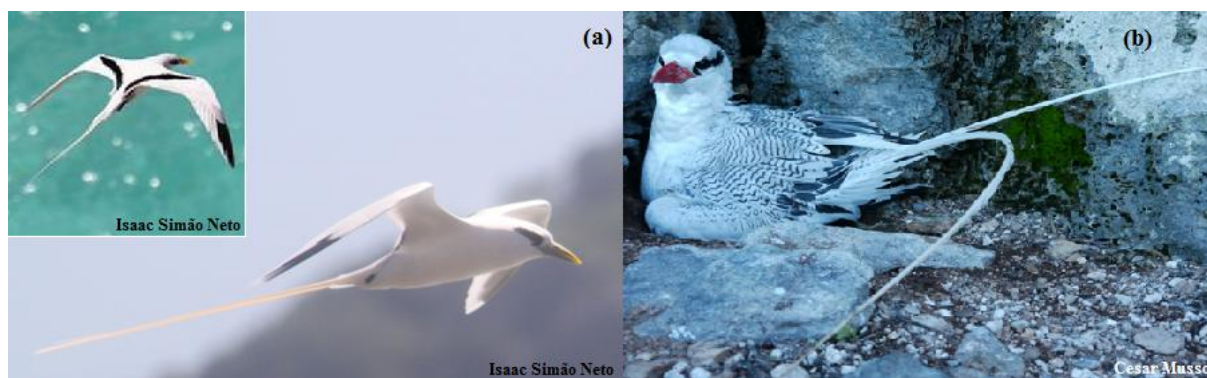


Figura 1. Espécies do gênero *Phaethon* as quais nidificam em ilhas tropicais brasileiras e encontram-se ameaçadas de extinção localmente. (a) Rabo-de-palha-de-bico-amarelo *P. lepturus*, e (b) Rabo-de-palha-de-bico-laranja *P. aethereus*.

ANEXO 1

Sex Determination and Sexual Size Dimorphism in the Red-billed Tropicbird (*Phaethon aethereus*) and White-tailed Tropicbird (*P. lepturus*)

Guilherme Tavares Nunes, Gustavo da Rosa Leal, Cynthia Campolina, Thales Renato Ochotorena de Freitas, Márcio Amorim Efe, Leandro Bugoni

Manuscrito redigido de acordo com as normas para submissão ao periódico

Waterbirds, aceito em fevereiro de 2013, a ser publicado em setembro vol. 36(3).

Nunes G.T., Leal G.R., Campolina C., Freitas T.R.O., Efe M.A., Bugoni L. 2013. Sex Determination and Sexual Size Dimorphism in the Red-billed Tropicbird (*Phaethon aethereus*) and White-tailed Tropicbird (*P. lepturus*). *Waterbirds* 36(3): no prelo.

Send proof to:
Guilherme Tavares Nunes
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Avenida Itália, s/nº, Campus Carreiros, CP 474
CEP 96201-900, Rio Grande/RS - Brazil
gtn.biomar@yahoo.com.br

Sex Determination and Sexual Size Dimorphism in the Red-billed Tropicbird (*Phaethon
aethereus*) and White-tailed Tropicbird (*P. lepturus*)

GUILHERME TAVARES NUNES,^{1,5,*} GUSTAVO DA ROSA LEAL,² CYNTHIA
CAMPOLINA,³ THALES RENATO OCHOTORENA DE FREITAS,⁴ MÁRCIO AMORIM
EFE,² AND LEANDRO BUGONI,^{1,5}

¹ Graduate Program in Biological Oceanography, Federal University of Rio Grande - FURG,
CP 474, CEP 96.201-900. Rio Grande, RS, Brazil.

² Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas - UFAL, Av.
Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária. CEP 57072-900. Maceió, AL, Brazil.

³ Conservation International's Marine Program, CP 52 , CEP 45.900-000. Caravelas, BA,
Brazil.

⁴ Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, CP 15053, CEP
91501-970. Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande - FURG, CP 474, CEP
96.201-900. Rio Grande, RS, Brazil

* Corresponding author; Email: gtn.biomar@yahoo.com.br

Abstract – Tropicbirds (order Phaethontiformes) are a well-studied seabird taxon, but there have been no published studies on sexual size dimorphism. Here, we investigated sexual size dimorphism in the Red-billed Tropicbird (*Phaethon aethereus*) and the White-tailed Tropicbird (*P. lepturus*), and evaluated the applicability of using morphometrics and discriminant functions to sex birds in the field. We sampled Red-billed Tropicbirds ($n = 160$) and White-tailed Tropicbirds ($n = 57$) in the Atlantic Ocean off the coast of Brazil. Each individual had seven morphometric traits measured and blood sampled for molecular sex determination. Discriminant functions were generated using generalized linear models (GLM). Red-billed Tropicbirds had significant male-biased intersexual differences in bill length, wing chord, nostril-to-bill-tip, and head-plus-bill, and the best GLM included bill length and wing chord. White-tailed Tropicbirds were characterized by significant intersexual differences for wing chord, with females larger than males, and the best GLM for this species included wing chord, bill width and bill depth. Discriminant functions had accuracy similar to those used for other seabird species with similar body sizes.

Key-words: intersexual difference, discriminant function, Red-billed Tropicbird, *Phaethon aethereus*, White-tailed Tropicbird, *Phaethon lepturus*.

Running head: SEX DISCRIMINATION AND DIMORPHISM IN TROPICBIRDS

Tropicbirds (Aves: Phaethontiformes) are monomorphic seabirds and are therefore thought to have limited sexual size dimorphism (SSD) (Orta 1992). The order comprises three species distributed in tropical and subtropical warm waters, breeding in colonies on oceanic islands and catching their prey by plunge-diving in pelagic zones (Orta 1992). In Brazil, there are colonies of a few hundred Red-billed Tropicbirds (*Phaethon aethereus*) and White-tailed Tropicbirds (*P. lepturus*) at Abrolhos and Fernando de Noronha archipelagos, respectively (Sick 1997). Both species are listed as threatened in the Brazilian Red List, mainly due to the introduction of *Rattus rattus*, *Tupinambis merianae*, and *Felis catus* (Efe 2008).

In birds with sexually monomorphic plumage and soft-tissue coloration, small but significant intersexual morphometric differences could potentially allow gender discrimination in the field to enhance the interpretation of behavioral and ecological studies, allowing the optimization of conservation initiatives. One of the most successful strategies for gender discrimination is through fitting linear models with binomial function, a procedure that has been successfully applied to waterbirds (*e.g.* Ura *et al.* 2005; Hallgrímsson *et al.* 2008).

An increasing number of studies have identified some degree of SSD in seabirds, usually in the form of subtle morphometric differences inconspicuous to the human eye. Such differences have been reported in various orders of seabirds: Charadriiformes (Devlin *et al.* 2004), Pelecaniformes (Dorr *et al.* 2005), Sphenisciformes (Bertellotti *et al.* 2002), Procellariiformes (Copello *et al.* 2006), and Suliformes (Quintana *et al.* 2003). However, information on SSD in the order Phaethontiformes is lacking.

In this study we aim (1) to identify the degree of SSD in Red-billed and White-tailed Tropicbirds and to determine in which traits it is expressed; (2) to generate linear models from morphometric measurements to discriminate sex of both species, and; (3) to assess the degree of confidence in sex discrimination by the fitted models.

METHODS

White-tailed Tropicbirds ($n = 57$) breeding on Fernando de Noronha archipelago ($3^{\circ} 51' S$ $32^{\circ} 25' W$) and Red-billed Tropicbirds ($n = 160$) breeding on Abrolhos archipelago ($17^{\circ} 58' S$, $38^{\circ} 42' W$) were captured on nest burrows in 2011 and 2012. Eight body measurements were taken: bill length (exposed culmen); nostril-to-bill-tip (measured from the distal end of the nostril to the bill tip); bill width (measured at the nostrils); bill depth (measured at the nostrils); head-plus-bill (bill tip to the posterior ridge formed by the parietal-supraoccipital junction); tarsus length (from middle of midtarsal joint to distal end of tarsometatarsus); wing chord (carpal joint to tip of the longest primary, with flattened wing); and body mass.

Wing chord was measured using a metal rule with stop (± 1 mm), while all others linear measurements were taken using digital vernier calipers (± 0.01 mm). Body mass was measured to the nearest 5 g using Pesola spring scales, but excluded from the analysis due to large variations during the breeding season (Croxall 1995). All samples were collected by the authors of this study, using standardized techniques. In order to prevent resampling, all sampled birds were banded with metal rings.

Blood samples of each individual were collected and stored in FTA card for molecular sex determination, and DNA was extracted using the protocol of Boyce *et al.* (1989).

Amplification of sex-specific introns on the CHD genes (Ellegren 1996) was performed using P2-P8 primers (Griffiths *et al.* 1998). The final volume of amplification reactions was 10 μ l containing 10ng of DNA, 0,2 μ M of each primer, 0,2 μ M of dNTP, PCR Buffer 1x, 1.5 mM of $MgCl_2$ e 1.0 unity of Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen).

Amplifications were performed as follows: denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, annealing at 46 °C for 1 min, and final elongation at 72 °C for 5 min. PCR products were separated by electrophoresis in 8% denaturing polyacrylamide gel and revealed using the methodology of staining with silver nitrate (Bassam *et al.* 1991). Males were

characterized by the presence of only one band on the gel (two CHD-Z copies), while female were characterized by two bands (CHD-Z and CHD-W copies, with different molecular weight).

Heterozygosity for the intron CHD-Z was tested with P0 accessory primer (Han *et al.* 2009). We randomly selected ten individuals of each sex, which had sex determined by P2-P8 universal primers, and multiplex reactions with P2-P8 plus P0. As a result, polymorphism was not detected in any of the tested individuals, rejecting heterozygosity on CHD-Z intron for tropicbirds.

Intersexual differences from morphometric measurements were accessed through univariate *t*-test. For this analysis, outliers were identified and removed by the probability test based on standard deviation present in BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007). Therefore, all individuals of both species had equality of group covariance matrices, and all data were normally distributed, after Bartlett and Shapiro-Wilk's tests, respectively. Furthermore, *P*-value was adjusted with Bonferroni correction for multiple comparisons (Zar 2010). Sexual size dimorphism index was calculated as the ratio between the average values for females and males.

The ability of the morphometric analysis to discriminate among males and females was examined using Generalized Linear Models (GLMs) with binomial errors and a logit link function, where sex was treated as a binary response variable. Outliers previously identified were maintained in the total sample set, because the analysis is robust enough to violations of normality and homoscedasticity (Hair *et al.* 2009). Pearson's correlation was used to check the interaction between variables, excluding those variables correlated amongst themselves ($P < 0.05$). To fit the GLMs, significant variables were selected by the model through a stepwise procedure, testing the deviance of the likelihoods of full and reduced models (Burnham and

Anderson 2002). The best models for each species were selected using Akaike's Information Criteria (AIC), assuming that smaller values indicate a better fit of the model.

From selected models for Red-billed Tropicbirds, two validation methods were applied: (1) with the full sample set, which was used to fit the models; and (2) a sample obtained from random selection without replacement with 50% of the full data set (jackknife method), which was used to validate the model fitted with the full set (Dechaume-Moncharmont *et al.* 2011). Due to small sample size, for White-tailed Tropicbirds best models were only validated using the full sample. Cutpoint (C) for discriminant scores to each model was calculated according to Hair *et al.* (2009), considering groups with different sizes, as follows:

$$C = \frac{(Nf * Zm) + (Nm * Zf)}{Nf + Nm},$$

in which C is the cutpoint, N is the sample size for males (m) and females (f), and Z is the centroid (mean of discriminant scores) for each sex. All statistical analyzes were carried out using the software R (R Development Core Team 2011).

RESULTS

Red-billed Tropicbird.--Males had bill length, nostril-to-bill-tip, head-plus-bill and wing chord larger than females (Table 1). Bill length, nostril-to-bill-tip and head-plus-bill presented correlation ($P < 0.001$), and the latter two were excluded from the data set to fit GLMs. Thus, the model which used bill length and wing chord showed discriminatory power of 67.5% ($n = 108$), while the model that used only bill length correctly classified 62.9% of the individuals (Table 2).

$$D = (\text{bill length} * 0.33) + (\text{wing chord} * 0.11) - 17.76$$

Individuals with discriminant scores $D < -0.01$ were sexed as females, whereas those with $D \geq -0.01$ were males, and the jackknife validation method correctly classified 65% of the individuals randomly selected from the original dataset.

White-tailed Tropicbird.--In White-tailed Tropicbirds significant SSD was detected for wing chord only. However, SSD values indicated reverse sexual dimorphism (RSD) for this trait. As for Red-billed Tropicbird, bill length, nostril-to-bill-tip and head-plus-bill presented correlation ($P < 0.001$), and the latter two were excluded from the data set to fit GLMs. In this case, in the GLM, four variables (wing chord, bill length, bill depth and bill width) contributed to the best fit model (lowest AIC in Table 2). This model with the four variables above was the best in classifying birds, and was able to correctly sex 39 out of 54 birds: 20 females (80.0%) and 19 males (65.5%). Nevertheless, discrepancy on classification rates between males and females was higher in the model with better fit than the second best model. Thus, the most parsimonious model is the one that employs only wing chord, bill depth and bill width, which despite correctly classifying a lower number of birds (38 out of 54), includes fewer variables and more similar classification rates between males and females. This model is as follows:

$$D = (\textit{wing chord} * -0.15) + (\textit{bill width} * 1.38) + (\textit{bill depth} * 0.79) + 41.93$$

Here, individuals with discriminant scores $D < 0.12$ were females, whereas those with $D \geq 0.12$ were males.

DISCUSSION

Sexual size dimorphism

In many bird species, males are typically larger than females (Székely *et al.* 2007), a pattern which has also been observed in most seabirds (Schreiber and Burger 2001). In the

current study Red-billed Tropicbirds displayed this typical pattern, *i.e.* males had bill length and wing chord larger than females. However, in White-tailed Tropicbirds females typically had greater wing lengths than males. Thus, based on these two species there is no consistent pattern of SSD in order Phaethontiformes.

The causes of SSD have long been discussed. Darwin (1871) suggested that larger body size in males is largely determined by selection during male-male disputes, where males with larger body size have more mating opportunities. The evolution of SSD has subsequently been widely studied and, in most cases, sexual selection or niche segregation between sexes has been identified as key selective forces (reviewed in Shine 1989). Serrano-Meneses and Székely (2006) suggested that, in seabirds, the agility of males in sexual display may be an influential factor to the evolution of SSD. They also suggested that those species that display on the ground will have male-biased SSD, while females will be larger than males in species which perform aerial displays, such as tropicbirds.

The RSD found for White-tailed Tropicbird is uncommon within seabirds (Schreiber and Burger 2001). It has been recorded for wing chord in six *Puffinus* species (Bull *et al.* 2005), and has also been found in families which until recently were considered sisters of Phaethontidae, such as Sulidae and Fregatidae (Schreiber and Burger 2001). Tropicbirds perform aerial courtship displays (Orta 1992) and thus female-biased SSD was expected (Serrano-Meneses and Székely 2006). Therefore, from an adaptative perspective, aerial sexual displays may explain the observed pattern of RSD in White-tailed Tropicbirds.

Sex discrimination

This is the first time that discriminant functions have been applied to the study of morphometrics of Phaethontiformes. For White-tailed Tropicbird, although sexual dimorphism occurs only for the wing chord, the fitted model was able to identify sexes,

confirming the relevance and intensity of RSD. For Red-billed Tropicbird, the application of jackknife subsampling technique as an alternative method for validating the model resulted in a similar discriminatory power compared to the validation performed with the total data set. This technique has been suggested by Dechaume-Moncharmont *et al.* (2011) precisely to avoid overestimated discriminant rates with intermediate sample sizes ($n < 200$).

Although there is SSD in both species, there is strong overlap in the range of traits that showed statistical differences between the sexes. Hence, even if the sample size increases, it is possible that the discriminatory power of new discriminant functions will be similar to this study. In summary, we clearly demonstrate that discriminating functions are a plausible method for sex determination of the two tropicbirds in the field, with discriminatory power similar to other seabirds in which the same methods have been applied.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is part of the M.Sc. dissertation of GTN, supported by a CNPq scholarship No. 132451/2011-5 and LB is a CNPq fellowship (Proc. #308697/2012-0). CNPq also provided funds to LB (N.º 557152/2009-7), and MAE (N.º 474072/2010-0). Sampling at Abrolhos Archipelago was supported by the Program for Bird Monitoring of Abrolhos (AVIDEPA/ICMBio/UFAL). We are grateful to Cesar M. Musso, Patrícia Serafini, Isaac Simão-Neto and Vivian Ferreira for their assistance in fieldwork, and to Fabrício Bertuol for help in laboratory work. We thank David Ainley, Flavio Quintana, Eduardo Secchi, Paul Kinas and Richard Ladle, for proofreading our manuscript. This study was carried out according to ICMBio permits N.º 27714-1 (for Abrolhos archipelago) and N.º 26214-1 (for Fernando de Noronha archipelago).

LITERATURE CITED

- Ayres, M., M. Ayres Jr., D. L., Ayres and A. A. Santos. 2007. Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamirauá, Belém.
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anollés and P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80–83.
- Bertellotti, M., J. L. Tella, J. A. Godoy and G. Blanco. 2002. Determining sex of Magellanic Penguins using molecular procedures and discriminant functions. *Waterbirds* 25: 479–484.
- Boyce, T. M., M. E. Zwick and C. F. Aquadro. 1989. Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123: 825–836.
- Bull, L. S., B. D. Bell and S. Pledger. 2005. Patterns of size variation in the shearwater genus *Puffinus*. *Marine Ornithology* 33: 27–39.
- Burnham, K. P. and D. R. Anderson. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information – theoretic approach. Springer-Verlag, New York.
- Copello, S., F. Quintana and G. Somoza. 2006. Sex determination and sexual size-dimorphism in Southern Giant-petrels (*Macronectes giganteus*) from Patagonia, Argentina. *Emu* 106: 141–146.
- Croxall, J. P. 1995. Sexual size dimorphism in seabirds. *Oikos* 73: 399–403.
- Darwin, C. 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. London, U.K.
- Dechaume-Moncharmont, F. X., K. Monceau and F. Cezilly. 2011. Sexing birds using discriminant function analysis: a critical appraisal. *Auk* 128: 78–86.
- Devlin, C. M., A. W. Diamond and G. W. Saunders. 2004. Sexing Arctic Terns in the field and laboratory. *Waterbirds* 27: 314–320
- Dorr, B., D. T. King, J. B. Harrel, P. Gerard and M. G. Spalding. 2005. The use of culmen length to determine sex of the American White Pelican. *Waterbirds* 28: 102–106.

- Efe, M. A. 2008. *Phaethon aethereus/Phaethon lepturus*. Pages 414-417 in Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Vol. II (A. B. Machado, G. M. Drummond and A. P. Paglia, Eds.). Fundação Biodiversitas, Brasília, Brazil.
- Ellegren, H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 1635–1641.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr and R. J. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071–1075.
- Hair, J. F., W. C. Black, B. J. Babin and R. E. Anderson. 2009. *Multivariate data analysis*. 7th ed.. Pearson Prentice-Hall, New Jersey, U.S.A.
- Hallgrimsson, G. T., S. Palsson and R. W. Summers. 2008. Bill length: a reliable method for sexing Purple Sandpipers. *Journal of Field Ornithology* 79: 87–92
- Han, J.-I. J.-H. Kim, S. Kim, S.-R. Park and K.-J. Na. 2009. A simple and improved DNA test for avian sex determination. *Auk* 126: 779–783.
- Orta, J. 1992. Family Phaethontidae. Pages 280-289 in *Handbook of the birds of the world*. Vol. I. Ostrich to Ducks (J. Del Hoyo, A. Elliot and J. Sargatal, Eds.). Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- Quintana, F., G. Somoza, M. Uhart, C. Cassará, P. Gandini and E. Frere. 2003. Sex determination of adult Rock Shags by molecular sexing and morphometric parameters. *Journal of Field Ornithology* 74: 370–375.
- R Development Core Team. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, v. 2.15.2. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>, accessed 10 November 2012.
- Rosner, B. 2010. *Fundamentals of biostatistics*, 7th ed. Duxbury Press, Boston, Massachusetts.

- Schreiber, E. A. and J. Burger. 2001. *Biology of marine birds*. CRC Press, Florida.
- Serrano-Meneses, M. A. and T. Székely. 2006. Sexual size dimorphism in seabirds: sexual selection, fecundity selection and differential niche-utilisation. *Oikos* 113: 385–394.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Quarterly Review of Biology* 64: 419–461.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia brasileira: uma introdução*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brazil.
- Székely, T., T. Lislevand and J. Figuerola. 2007. Sexual size dimorphism in birds. Pages 27-37 *in* *Sex, size and gender roles* (W. Blanckenhorn, D. Fairbairn and T. Székely, Eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Ura, T., N. Azuma, S. Hayama and S. Higashi. 2005. Sexual dimorphism of Latham's Snipe *Gallinago hardwickii*. *Emu* 105: 259–262.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*, 5th ed. Pearson Prentice-Hall, New Jersey, U.S.A.

Table 1. Body measurements of Red-billed Tropicbirds (*Phaethon aethereus*) and White-tailed Tropicbirds (*Phaethon lepturus*) sampled on Abrolhos and Fernando de Noronha archipelagos (Brazil), respectively. Measurements of each sex are in mm, with mean \pm SD (sample size); SSD = male:female (means). *P*-value of *t*-tests were adjusted with Bonferroni correction.

Variables	Red-billed Tropicbirds					White-tailed Tropicbirds				
	♂	♀	SSD	<i>t</i>	<i>P</i>	♂	♀	SSD	<i>t</i>	<i>P</i>
Bill length	63.20 \pm 2.26 (<i>n</i> = 71)	61.06 \pm 2.15 (<i>n</i> = 68)	1.03	-5.69	<0.001	47.64 \pm 2.21 (<i>n</i> = 31)	48.11 \pm 2.11 (<i>n</i> = 26)	0.99	0.81	0.42
Nostril-to-bill-tip	55.93 \pm 1.99 (<i>n</i> = 71)	54.88 \pm 1.97 (<i>n</i> = 68)	1.01	-3.13	0.002	37.16 \pm 2.04 (<i>n</i> = 32)	37.83 \pm 2.11 (<i>n</i> = 26)	0.98	1.21	0.23
Wing chord	324.92 \pm 6.6 (<i>n</i> = 39)	320.62 \pm 5.39 (<i>n</i> = 40)	1.01	-3.16	0.002	271.84 \pm 6.33 (<i>n</i> = 32)	276.56 \pm 6.1 (<i>n</i> = 25)	0.98	2.84	0.006
Tarsus length	29.68 \pm 1.53 (<i>n</i> = 32)	29.27 \pm 1.89 (<i>n</i> = 26)	1.01	-0.89	0.36	23.12 \pm 1.33 (<i>n</i> = 32)	22.95 \pm 1.33 (<i>n</i> = 26)	1.00	-0.48	0.63
Bill width	11.44 \pm 0.92 (<i>n</i> = 32)	11.71 \pm 1.20 (<i>n</i> = 28)	0.97	0.96	0.33	8.01 \pm 0.52 (<i>n</i> = 31)	8.30 \pm 0.77 (<i>n</i> = 26)	0.96	1.63	0.098
Bill depth	21.46 \pm 1.10 (<i>n</i> = 32)	21.11 \pm 1.1 (<i>n</i> = 28)	1.01	-1.44	0.16	16.13 \pm 0.76 (<i>n</i> = 29)	15.93 \pm 0.85 (<i>n</i> = 25)	1.01	-0.89	0.37
Head-plus-bill	121.65 \pm 3.00 (<i>n</i> = 32)	119.48 \pm 3.23 (<i>n</i> = 28)	1.01	-2.67	0.009	97.52 \pm 2.08 (<i>n</i> = 31)	98.29 \pm 2.53 (<i>n</i> = 26)	0.99	1.23	0.21

Table 2. Generalized Linear Models with best accuracy to discriminate the sex of Red-billed Tropicbirds (RBT, *Phaethon aethereus*), and of White-tailed Tropicbirds (WTT, *Phaethon lepturus*) on Abrolhos and Fernando de Noronha archipelagos (Brazil), respectively. P represents the significance of the models which was calculated based on residual deviance on degrees of freedom.

Species	Model	Discriminatory Power			AIC
		♂	♀	Total	
	Sex = bill length	67.5	57.5	62.5	107.65
RBT	Sex = bill length + wing	72.5	62.5	67.5	101.52
	Sex = wing chord	65.5	64	64.8	71.95
	Sex = wing + bill width + bill depth	65.5	76	70.4	68.11
WTT	Sex = bill length + wing + bill width + bill depth	65.5	80	72.2	67.87

ANEXO 2

Population genetics and conservation of two threatened tropicbirds (*Phaethon*) in the
South Atlantic Ocean

Guilherme Tavares Nunes, Thales Renato Ochotorena de Freitas, Márcio Amorim Efe,
Leandro Bugoni

Artigo redigido de acordo com as normas para submissão ao periódico

Journal of Avian Biology

Population genetics and conservation of two threatened tropicbirds (*Phaethon*) in the South Atlantic Ocean

Guilherme Tavares Nunes^{1,2,3,*}, Thales Renato Ochotorena de Freitas², Márcio Amorim Efe⁴ and Leandro Bugoni^{1,3}

¹ *Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, CEP 96.201-900. Rio Grande, RS, Brazil.*

² *Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, CP 15053, CEP 91501-970. Porto Alegre, RS, Brazil.*

³ *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, CEP 96.201-900. Rio Grande, RS, Brazil.*

⁴ *Laboratório de Bioecologia e Conservação de Aves Neotropicais – ICBS/UFAL. Praça Afrânio Jorge, s/n, Prado. CEP 57010-020. Maceió, AL, Brazil.*

* *Corresponding author. Email: gtn.biomar@yahoo.com.br*

Abstract

Tropicbirds, genus *Phaethon*, are pelagic seabirds that nest on islands and, in Brazil, are listed as threatened mainly due to the introduction of vertebrate species in their colonies. *Phaethon aethereus* red-billed tropicbird (RBT) and *Phaethon lepturus* white-tailed tropicbird (WTT) nests off Brazil on Abrolhos and Fernando de Noronha archipelagos, which are 1700 km apart from each other. In this study we used 11 microsatellite loci to determine genetic diversity of WTT from Fernando de Noronha and RBT from Abrolhos, to test the occurrence of a recent bottleneck in these populations, and verify intraspecific connectivity of these species between archipelagos. Both species presented low heterozygosity, smaller than other seabird species with decreasing population trend. Moreover, both populations showed high levels of inbreeding, which could contribute to the decreasing heterozygosity and also contributing to the Hardy-Weinberg disequilibrium. Nevertheless, there was no evidence of recent bottlenecks in these populations. Intraspecific connectivity analysis indicated a low probability of recent contact among birds from the two archipelagos, which demonstrate genetic structuration between the islands.

Key words: Red-billed tropicbird, white-tailed-tropicbird, bottleneck, intraspecific connectivity, genetic diversity.

Seabirds in general, and pelagic species in particular, are severely threatened, with the highest rates of population decline among all groups in the class Aves (Croxall et al. 2012). Furthermore, two thirds of all threatened seabird species nest on islands (Collar and Andrew 1992), places where birds had been historically extinct after human arrival, especially by direct consumption as food or by introduction of domestic or human associated vertebrates, as evidenced by historical data (Steadman 1995). In Brazil, 15 seabird species are threatened to extinction according to the national red list. Six of them nest on Brazilian tropical islands (Machado et al. 2008) and two of those are colonial pelagic tropicbirds of the Phaethontiformes order, which breed on Abrolhos and Fernando de Noronha archipelagos (Sick 1997).

The red-billed tropicbird *Phaethon aethereus* (RBT) breeds mainly on Abrolhos archipelago with 269 nests recorded in 2011 (M. Efe, unpublished data), though about a dozen active nests are regularly seen on Fernando de Noronha archipelago (Oren 1984, Antas 1991, M. Efe unpublished data). Fernando de Noronha, on the other hand, is the main breeding site for the white-tailed tropicbird *P. lepturus* (WTT) on the Brazilian coast, with 99 active nests in 2011 (M. Efe, unpublished data), although some individuals are also frequently observed flying and nesting on Abrolhos (M. Efe et al. unpublished data).

The main threat to tropicbirds on the Brazilian coast is the presence of invasive species such as cats, rats, goats and lizards in their colonies (Efe 2008). Moreover, human occupation during the last centuries significantly altered the natural characteristics of both archipelagos (Donato 1987, Lins and Silva 2003). The presence of invasive species and human disturbance are among the main threats for seabirds around the world (Croxall et al. 2012). One of the consequences of predation by

invasive species and habitat destruction or degradation is reducing the number of individuals in a population (bottleneck), which can intensify processes such as inbreeding and loss of genetic diversity and evolutionary potential (Frankham et al. 1999, Lande 1995).

In this context, conservation efforts are important for the recovery of populations, though the breeding biology of such species could influence recovery rates. Tropicbirds are k-selected species and their reproductive biology is not favorable to a rapid recovery as they (1) nest mostly directly on the ground becoming more vulnerable to predation, (2) lay only one egg, (3) leave the chicks alone in the nest while feeding at sea, (4) do not perform post fledgling parental care (Orta 1992), and also (5) show low hatching success due to environmental conditions or disturbances (Castillo-Guerrero et al. 2011).

Therefore, based on threats and intrinsic biological characteristics mentioned above, it is postulated that population bottleneck had occurred in these tropicbird populations. If they experienced population declines, they should undergo loss of genetic diversity. Nevertheless, since the 1980s the two archipelagos are protected by the Brazilian law and are considered national protected areas, which could be contributing to the stabilization and recovery of these populations, similar to other bird populations where conservation and management efforts are in place (Groombridge et al. 2001, Rains et al. 2011). Because recently bottlenecked populations exhibit an allele deficiency, detecting such events is possible through tests that consider distribution of allele frequencies, and also by detecting excess of heterozygosity in relation to the number of alleles (Cornuet and Luikart 1996).

Despite their great mobility, seabirds are known to be highly philopatric (Schreiber and Burger 2001). In this way, their mobility does not necessarily mean high dispersal ability, as evidenced for magnificent frigatebird *Fregata magnificens*, which has the higher wing-loading of all birds, but remains genetically isolated at the Galapagos archipelago (Hailer et al. 2011). Nevertheless, there is no general pattern of genetic structuring in seabirds, especially for species without contemporary or historical physical barriers between populations, although it has been described a correlation between nonbreeding distribution patterns with genetic structure (Friesen et al. 2007, Wiley et al. 2012). Such correlations remain untested in tropicbirds. Understanding the structure of populations optimizes conservation efforts by defining conservation units and implementing effective strategies for specific problems of each unit (Fraser and Bernatchez 2001).

The genetic structure of tropicbirds is unknown as well as other population issues related to its conservation and genetic diversity indices. Such data are among the three most important issues for the conservation of natural populations worldwide, according to the World Conservation Strategy (IUCN 1980). In Brazil, seabird populations have been managed as single units, mainly by the absence of studies directed to clarify population structure, and only a small part (about 5%) of seabird studies have focused on conservation, and virtually no study on tropicbirds population dynamics has been conducted for species inhabiting islands off Brazil (Moraes-Ornellas 2009). In this context, molecular markers are potentially useful tools for conservation, because they refine ecological and evolutionary understanding and provide solutions to specific problems of each population or species (Taylor and Friesen 2012).

Therefore, aiming at understanding population dynamics of tropicbirds from the Brazilian tropical archipelagos and providing the framework information for their conservation, the objectives of this study were to: 1) identify genetic diversity of RBT population on Abrolhos, and of WTT population on Fernando de Noronha; 2) test the occurrence of population bottleneck in both populations, and 3) assess the degree of intraspecific relationship of both species between the two archipelagos.

Materials and methods

Study area and sampling

Fernando de Noronha archipelago has 21 km² and consists of 21 islands and islets of volcanic origin (Almeida 1955). It is located at 3°50'S and 32°24'W, and the nearest point to South America mainland is 345 km away. The Abrolhos archipelago has 0,16 km², consists of five islands disposed circularly, which also have volcanic origin, and is located on the continental shelf at 17°50'S and 38°35'W, about 70 km far away from the nearest point to the Brazilian coast (IBAMA/FUNATURA 1991). Fernando de Noronha is about 1700 km apart from Abrolhos and is directly influenced by a south equatorial current with high salinity and temperature, which flows from east to west and reaches Abrolhos when it is deflected southward influenced mainly by southeast trade winds, forming the Brazil Current (Stewart 2008) (Fig. 1).

DNA extraction and genotyping

Blood samples were collected from breeding birds captured manually or with dip nets on nests, and stored on FTA[®] cards for DNA extraction. To avoid resampling, all birds were identified with metal rings. DNA was extracted using the protocol described by

Boyce et al. (1989), which uses CTAB cationic detergent. Ten microsatellite loci of each species were amplified, all described by Humeau et al. (2011).

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were carried out in a reaction volume of 20 μ L containing 20-30 ng of DNA, 0.2 μ M of each primer, 0.2 μ M of forward primer end-labeled with a fluorescent dye primer (HEX/FAM, Schuelke 2000), 0.2 μ M deoxynucleoside triphosphate, 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$ and 1.0 unit of Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen, Carlsbad, California). The thermocycling profile included an initial denaturing at 95°C for 15 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 90 s, extension at 72°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 10 min. The products were analysed in an ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, California), and alleles reading was performed using the software Peak Scanner version 1.0 (Applied Biosystems).

Data analysis

Genetic diversity in each population was measured using the ARLEQUIN 3.5.1.2 software (Schneider et al. 2000), by the number of alleles per locus (N), allelic richness (\bar{A}), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity from Hardy-Weinberg proportions (H_E , Nei 1978), average heterozygosity (H) and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE, Guo and Thompson 1992). The GENEPOP *online* software (<http://genepop.curtin.edu.au/>) was used for calculations of heterozygotes deficiency and sequential Bonferroni corrections, which were applied to correct multiple simultaneous comparisons (Rice 1989). Wright's F -statistics, based on the variance in the allele frequencies, were used to analyze within population structure

(F_{IS}), according to Weir and Cockerham (1984) and implemented in GENEPOP *online*. The accuracy of microsatellite loci amplified to estimate the level of inbreeding was verified by Pearson's correlation between observed heterozygosity and inbreeding coefficient, in R software (R Development Core Team 2011).

In order to identify evidences of population bottleneck in each population two complementary approaches were used. The graphical method illustrates the existence/absence of rare alleles in a population by the shape of allele frequencies distribution: a L-shaped graph indicates that the population is naturally in mutation-drift equilibrium; otherwise, it is indicative of a recently bottlenecked population (Luikart et al. 1998). The second is a statistical method for bottleneck occurrence, which tests for excess of heterozygosity compared to the expected values from the observed number of alleles at each locus and population, assuming mutation–drift equilibrium as the null hypothesis. This relationship was calculated using a Wilcoxon signed rank test, and the computations were based on both stepwise mutation (Valdes et al. 1993) and 2-phase mutation models (Di Rienzo et al. 1994), as performed in the BOTTLENECK 1.2.02 software (Cornuet and Luikart 1996).

The degree of intraspecific relationship between birds sampled at Fernando de Noronha and Abrolhos for both species was determined using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method, which examines the distinction between populations and clustering of individual genotypes, through the STRUCTURE 2.3 software (Pritchard et al. 2000). Following Pritchard et al. (2010), analyses used burn-in period of 10,000 and one million of MCMC repetitions after burn-in, running the ancestry model which uses prior population information to test for migrants and requires an *a priori* information about the source population of each sample (Pritchard et al. 2010). The definition on the

number of assumed populations (K) was conducted to obtain the greatest Estimated Ln Prob of Data ($\ln \Pr(X|K)$) and the lowest K value, considering the number of assumed populations more accurate than one where the curve reached the “more-or-less plateau” (Pritchard et al. 2010) (Fig. 2). Nevertheless, the K value considered ideal was compared with $K = 2$ since the archipelagos are separated by 1700 km and, initially, individuals contained in the data sets of each species were assumed to be representatives of two distinct populations. Furthermore, genetic differences of each species were also calculated between the archipelagos by the Fisher's exact probability test algorithm through GENEPOP online.

Results

Microsatellite polymorphism and genetic diversity

Were sampled 37 RBT in Abrolhos, and two individuals in Fernando de Noronha. For WTT 35 samples were obtained at Fernando de Noronha, and only one individual at Abrolhos. The WTT sampled in Abrolhos was the only nest made by this species in the archipelago during the sampling period and, of all birds sampled it was the only chick included in the analysis. Among the eleven microsatellite loci described by Humeau et al. (2011), loci P4G1 and P3F3 did not amplify for WTT and RBT samples, respectively, collected in Brazil. All amplified loci for both species were polymorphic. The total number of alleles was 78 for WTT in Fernando de Noronha with an average of 7.8 alleles per locus (Table 1). Average heterozygosity of WTT was $H = 0.454$, with five loci showing significant deviations from the expected genotypic proportions of HWE ($p < 0.01$). The global test using all loci showed significant deviation from HWE for the WTT population from Fernando de Noronha ($p < 0.001$). The test based on

MCMC indicated deficiency of heterozygotes in only two out of the ten loci analyzed for this species ($p < 0.01$ after Bonferroni correction). However, if $p < 0.05$, the deficiency of heterozygotes occurred in seven loci.

The total number of alleles present in the RBT population of Abrolhos was 40, with average of 4.0 alleles per locus. Average heterozygosity was $H = 0.309$, and only two loci showed no significant deviations from the expected genotypic proportions according to HWE. The global test showed significant deviation from HWE for the RBT population nesting at Abrolhos ($p < 0.001$). Furthermore, the MCMC based test indicated deficit of heterozygotes in seven out of the ten loci amplified ($p < 0.01$ after Bonferroni correction).

Both RBT ($r^2 = -0.7607$, $p = 0.009$) and WTT ($r^2 = -0.7927$, $p = 0.003$) showed a significant correlation between observed heterozygosity and F_{IS} , which confirms inbreeding in both population. The WTT population of Fernando de Noronha had $F_{IS} = 0.230$ ($p < 0.0001$), while the RBT population of Abrolhos had $F_{IS} = 0.553$ ($p < 0.0001$).

Population bottleneck

The distribution of allele frequencies was similar for both species, with highest proportions of alleles at low frequencies (0.01-0.2), resulting in a L-shaped graphic and thus no evidence of recent population bottleneck (Fig. 3). The test for heterozygosity excess revealed no significance for both species in both 2-phase mutation and stepwise mutation models, which had p-values, respectively, of $p = 0.996$ and $p = 0.997$ for RBT, and $p = 0.958$ and $p = 0.998$ for WTT. These data support results from the graphic method, showing that both populations were not recently bottlenecked.

Intraspecific relationship between tropicbirds from Fernando de Noronha and Abrolhos archipelagos

The single WTT individual (chick) sampled on Abrolhos presented eight exclusive alleles, which were present in eight out of the ten loci. The model of test for migrants with $K = 2$ revealed that the probability of this individual belonging to the Fernando de Noronha population was $< 1\%$ (Fig. 4a). Fisher's probability test of genic difference between "populations" confirmed this marked intraspecific difference ($\chi^2 = 92.756$; $df = 18$; $p < 0.0001$).

On the other hand, relationships of the two adult RBT individuals sampled in Fernando de Noronha with the Abrolhos population was estimated based on $K = 4$ (Fig. 4b), where it was located the more-or-less plateaus, and compared with $K = 2$ (Fig. 4c). These two individuals had only one exclusive allele, in the locus P3A3. Nevertheless, with $K = 2$ the probability of individuals sampled in Fernando de Noronha belong to the Abrolhos population was only 12.7% and 32.6%, with a difference of allelic frequencies of 22.8% between populations. Analysis with $K = 4$ confirmed previous result and intensified differences between populations, showing that these two individuals had an ancestry relationship of only 3.7% with the Abrolhos population. Furthermore, Fisher's probability test also indicated a significant genic difference among individuals sampled at Fernando de Noronha in comparison with the population from Abrolhos ($\chi^2 = 37.236$; $df = 20$; $p = 0.005$).

Discussion

Genetic diversity

Average heterozygosity found in both species (RBT on Abrolhos $H = 0.309$, and WTT at Fernando de Noronha $H = 0.454$) are smaller than those found in microsatellite amplifications in other seabird species with decreasing population trends, such as Wandering albatross ($H = 0.509$; Bried et al. 2007), Galapagos petrel *Pterodroma phaeopygia* ($H = 0.460$; Friesen et al. 2006), Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* ($H = 0.598$; Bouzat et al. 2009), and the Suliformes: Brown booby *Sula leucogaster* ($H = 0.620$), Red-footed booby *Sula sula* ($H = 0.640$) and Great frigatebird *Fregata minor* ($H = 0.600$) (Morris-Pocock et al. 2012). The WTT individuals sampled at Réunion island ($n = 55$) showed higher allelic richness ($\bar{A} = 13$) and average heterozygosity ($H = 0.584$) (Humeau et al. 2011), in comparison with these parameters for WTT and RBT obtained in this study. Moreover, in contrast with tropicbirds from Brazil, WTT from Réunion Is. showed no deviations from HWE (Humeau et al. 2011). Thus, both tropicbird populations studied had probably declined and represent now a fraction of the original population from both islands.

In small populations, mating of unrelated individuals becomes infeasible over time (Frankham et al. 2002). Inbreeding leads to reduction in population fitness and direct evidence found in inbred individuals is decreased heterozygosity (Allendorf and Luikart 2007). Abrolhos RBT population showed significant level of inbreeding, which could explain decreased heterozygosity and HW disequilibrium found in eight out of the ten loci analyzed. Similarly, significant level of inbreeding found for the Fernando de Noronha WTT population could explain HW disequilibrium found in five out of the ten amplified loci, which may be related to the small population size limited by the small area of Chapéu island (only 0.01 km^2) used by most tropicbirds for nesting in this archipelago.

Evans and Sheldon (2008) indicated that low average heterozygosity in bird population/species represents great risk of extinction, as it usually occurs when populations are declining. As many seabirds are subdivided in populations, which often face distinct environmental conditions, it is of paramount importance that conservation efforts consider specificities of each population, treating them as distinct conservation units, and not only an approach to species level that consider them as single entities (Fraser and Bernatchez 2001).

Bottleneck

The findings of this study does not indicate occurrence of a recent bottleneck. However, the allelic frequency distribution presents a large number of rare alleles (frequency range 0.01-0.2), and few alleles in the remaining frequencies. According to Cornuet and Luikart (1996), the graph of a population in mutation-drift equilibrium must shows a smoother curve, with number of alleles gradually decreasing as they are increasing frequency ranges.

Therefore, even though these populations have a large percentage of rare alleles and mutation models indicate mutation-drift equilibrium, they could be recovering from an historical bottleneck or founder event, as they present reduced genetic diversity, similar to what occurs in other bottlenecked bird populations (e.g. Glenn et al. 1999, Zhang et al. 2004). Such low genetic diversity can be attributed to the low resilience of seabirds against adverse environmental conditions, as also suggested for the slow recovery of the Monteiro's Storm-petrel *Oceanodroma monteiroi* (Bolton et al. 2008). Moreover, low genetic diversity could be considered a natural characteristic of tropicbirds, accounting for no impact on the population viability of these species, such

as to albatrosses (Milot et al. 2008). This issue could be better understood by determining genetic diversity indices in other large tropicbirds populations.

Intraspecific connectivity between archipelagos

Microsatellite analyzes demonstrated a limited possibility of the WTT sampled at Abrolhos coming from Fernando de Noronha population, and vice-versa for RBT. Intraspecific differences found between archipelagos were sufficient to infer that such individuals may have dispersed from other colonies in the Atlantic ocean, such as Ascension island, Cape Verde, or Caribbean islands (Orta 1992).

Friesen et al. (2007) suggested that the at sea distribution during the non-breeding period may influence the level of population structuring, so that species which remain near their colonies during the non-breeding period present stronger genetic structuring because it makes difficult encountering with individuals from other colonies. Little is known about the at sea distribution of tropicbirds in non-breeding period (Orta 1992), but Le Corre and Jouventin (1999) identified intraspecific differences in plumage coloration and morphometrics for WTT worldwide, featuring subspecies level. Although we had studied tropicbird populations only on Brazilian islands, and even though they are relatively nearby colonies, it was possible to identify significant genetic differences between populations. Because tropicbirds present pantropical distribution, the existence of worldwide genetic structuring was somewhat expected, at least on an ocean basin level. A clearer scenario would emerge only with a global phylogeographic analysis, which would reveal the source population of the Abrolhos WTT and the Fernando de Noronha RBTs, as well as elucidate the dispersal ability of the poorly studied tropicbirds. Considering different environmental conditions found between

islands and importance of specific approaches according to the problems faced by each population, our findings are significant for the conservation, since it is the first study of population differentiation at the molecular level in tropicbirds, serving as an alert to the importance of population-specific management of these birds.

Acknowledgments - This paper is part of the M.Sc. dissertation of GTN, supported by a CNPq scholarship No. 132451/2011-5. CNPq also provided funds to the project granted to LB (N.º 557152/2009-7), and MAE (N.º 474072/2010-0). LB received scholarship PQ CNPq N.º 308697/2012-0. Sampling at Abrolhos Archipelago was supported by the Program for Monitoring Birds of Abrolhos (AVIDEPA/ICMBio/UFAL). We are grateful to Cesar M. Musso, Flávio Quintana, Patrícia Serafini, Isaac Simão Neto and Vivian L. Ferreira for their assistance in fieldwork, to Fabrício Bertuol for help in laboratory work, and also to Gislene Lopes Gonçalves, Tatiane Noviski and all the staff of the Laboratório de Citogenética e Evolução (UFRGS) for help in data analysis. We also thank Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE) for providing metal rings, logistical support of the Marinha do Brasil, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/MMA), Associação Vila-velhense de Proteção Ambiental (AVIDEPA), and review from Eduardo R. Secchi, Paul G. Kinas, and Matthieu Le Corre. This study was carried out according to permits N.º 27714-1 (for Abrolhos archipelago) and N.º 26214-1 (for Fernando de Noronha archipelago), both granted by the ICMBio.

References

- Allendorf, F. W. and Luikart, G. H. 2007. Conservation and the genetics of populations. – Blackwell Publishing.
- Almeida, F. F. M. de 1955. Geologia e petrologia do Arquipélago de Fernando de Noronha. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Antas, P. T. Z. 1991. Status and conservation of seabirds breeding in Brazilian waters. – ICBP Tech. Pub. 11: 141–158.
- BirdLife International. 2012. *Phaethon aethereus/Phaethon lepturus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. – IUCN <www.iucnredlist.org> accessed 15 January 2013.
- Bouzat, J. L., Walker, B. G. and Boersma, P. D. 2009. Regional genetic structure in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) suggests metapopulation dynamics. – Auk 126: 326–334.
- Boyce, T. M., Zwick, M. E. and Aquadro, C. F. 1989. Mitochondrial DNA in the Bark weevils: size, structure and heteroplasmy. – Genetics 123: 825–836.
- Bried, J., Nicolaus, M., Jarne, P., Dubois, M.-P. and Jouventin, P. 2007. Population biology of the Wandering albatross (*Diomedea exulans*) in the Crozet and Kerguelen archipelagos, southern Indian ocean, approached through genetic and demographic methods. – J. Zool., Lond. 272: 20–29.
- Castillo-Guerrero, J. A., Guevara-Medina, M. A. and Mellink, E. 2011. Breeding ecology of the Red-billed tropicbird *Phaethon aethereus* under contrasting environmental conditions in the Gulf of California. – Ardea 99: 61–71.
- Collar, N. J. and Andrew, P. 1992. Birds to watch: the ICBP world checklist of threatened species. – Smithsonian Institution Press.

- Cornuet, J. M. and Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. – *Genetics* 144: 2001–2014.
- Croxall, J. P., Butchart, S. H. M., Lascelles, B., Stattersfield, A. J., Sullivan, B., Symes, A. and Taylor, P. 2012. Seabird conservation status, threats and priority actions: a global assessment. – *Bird Conserv. Int.* 22: 1–34.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M. and Freimer, N. B. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. – *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91: 3166–3170.
- Donato, H. 1987. Dicionário das batalhas brasileiras. Dos conflitos com indígenas às guerrilhas urbanas e rurais. – IBRASA.
- Efe, M. A. 2008. *Phaethon aethereus/Phaethon lepturus*. – In: Machado, A. B. M., Drummond, G. M. and Paglia, A. P. (eds), Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Vol. II. Fundação Biodiversitas, pp. 414–417.
- Evans, S. R. and Sheldon, B. C. 2008. Interspecific patterns of genetic diversity in birds: correlations with extinction risk. – *Conserv. Biol.* 22: 1016–1025.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2002. Introduction to conservation genetics. – Cambridge University Press.
- Frankham, R., Lees, K., Montgomery, M. E., England, P. R., Lowe, E. H. and Briscoe, D. A. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? – *Anim. Conserv.* 2: 255–260.
- Fraser, D. J. and Bernatchez, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. – *Mol. Ecol.* 10: 2741–2752.

- Friesen, V. L., González, J. A. and Cruz-Delgado, F. 2006. Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). – *Conserv. Genet.* 7: 105–115.
- Friesen, V. L. 2007. Mechanisms of population differentiation in seabirds. – *Mol. Ecol.* 16: 1765–1785.
- Glenn, T. C., Stephan, W. and Braun, M. J. 1999. Effects of a population bottleneck on Whooping Crane mitochondrial DNA variation. – *Conserv. Biol.* 13: 1097–1107
- Groombridge, J. J., Bruford, M. W., Jones, C. G. and Nichols, R. A. 2001. Evaluating the severity of the population bottleneck in the Mauritius kestrel *Falco punctatus* from ringing records using MCMC estimation. – *J. Anim. Ecol.* 70: 401–409.
- Guo, S. and Thompson, E. 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiples alleles. – *Biometrics* 48: 361–372.
- Hailer, F., Schreiber, E. A., Miller, J. M., Levin, I. I., Parker, P. G., Chesser, R. T. and Fleischer, R. C. 2011. Long-term isolation of a highly mobile seabird on the Galapagos. – *Proc. R. Soc. Lond. B.* 278: 817–825.
- Humeau, L., da Silva, D., Jaquemet, S., Requier, J.-B. and Le Corre, M. 2011. Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* (Phaethontidae). – In: Agostini et al., Permanent Genetic Resources Note, – *Mol. Ecol. Res.* 11: 418–421.
- IBAMA/FUNATURA. 1991. Plano de manejo: Parque Nacional Marinho dos Abrolhos.
- IUCN. 1980. World conservation strategy: living resource conservation for sustainable development. – IUCN <<http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/WCS-004.pdf>>, available online.

- Lande, R. 1995. Breeding plans for small populations based on the dynamics of quantitative genetic variance. – In: Ballou, J. D., Gilpin, M. and Foose T. J. (eds), Population management for survival and recovery. – Columbia University Press, pp. 318–340.
- Le Corre, M. and Jouventin, P. 1999. Geographical variation in the White-tailed Tropicbird *Phaethon lepturus*, with the description of a new subspecies endemic to Europa Island, southern Mozambique Channel. – *Ibis* 141: 233–239 .
- Lee, D. S. and Walsh-McGehee, M. 2000. Population estimates, conservation concerns, and management of tropicbirds in the western Atlantic. – *Carib. J. Sci.* 36: 267–279.
- Lins, E. and Silva, M. B. 2003. Caminhos do tempo humano. – In: Teixeira, W., Cordani, U. G., Menor, E. A., Teixeira, M. G. and Linsker, R, Arquipélago de Fernando de Noronha: o paraíso do vulcão. – Terra Virgem.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet J. M. and Sherwin, W. B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. – *J. Hered.* 89: 238–247.
- Machado, A. B. M., Drummond, G. M. and Paglia, A. P. (eds) 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. – Fundação Biodiversitas.
- Milot, E., Weimerskirch, H. and Bernatchez, L. 2008. The seabird paradox: dispersal, genetic structure and population dynamics in a highly mobile, but philopatric albatross species. – *Mol. Ecol.* 17: 1658–1673.
- Milot, E., Weimerskirch, H., Duchesne, P. and Bernatchez, L. 2007. Surviving with low genetic diversity: the case of albatrosses. *Proc. R. Soc. B* 274: 779-787.

- Moraes-Ornellas, V. S. 2009. Uma análise de 20 anos de produção acadêmica brasileira sobre aves marinhas. – *Atual. Ornitol.* 152: 36–38.
- Morris-Pocock, J. A., Hennicke, J. C. and Friesen, V. L. 2012. Effects of long-term isolation on genetic variation and within-island population genetic structure in Christmas Island (Indian ocean) seabirds. – *Conserv. Genet.* 13: 1469–1481.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. – *Genetics* 89: 583–590.
- Oren, D. C. 1984. Resultados de uma nova expedição zoológica a Fernando de Noronha. – *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Sér. Zool.* 1: 19–44.
- Orta, J. 1992. Family Phaethontidae. – In: Del Hoyo, J., Elliott, A. and Sargatal, J. (eds), *Handbook of the birds of the world. Vol. I. Ostrich to Ducks.* Lynx Edicions, pp. 280–289.
- Pritchard, J. K., Wen, X. and Falush, D. 2010. Documentation for *structure* software: version 2.2. – *Structure* <<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure22/readme.pdf>>, available online.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155: 945–959.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<http://www.R-project.org/>>, available online.
- Rains, D., Weimerskirch, H and Burg, T. M. 2011. Piecing together the global population puzzle of Wandering albatrosses: genetic analysis of the Amsterdam albatross *Diomedea amsterdamensis*. – *J. Avian Biol.* 42: 69–79.

- Rice, W. W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. – *Evolution* 43: 223–225.
- Schneider, S., Kueffer, J.-M., Roesli, D. and Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN version 2.1: a software for population genetic data analysis. – Genetic and Biometry Laboratory, <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>>, available online.
- Schreiber, E. A. and Burguer, J. 2001. *Biology of marine birds*. – CRC Press.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. – *Nat. Biotechnol.* 18: 233–234.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia brasileira: uma introdução*. – Nova Fronteira.
- Steadman, D. W. 1995. Prehistoric extinctions of Pacific island birds: biodiversity meets zooarchaeology. – *Science* 267: 1123–1131.
- Stewart, R. H. 2008. *Introduction to Physical Oceanography*. Texas A & M University. – E-book <http://oceanworld.tamu.edu/resources/ocng_textbook/PDF_files/book.pdf>, available online.
- Taylor, S. A. and Friesen, V. L. 2012. Use of molecular genetics for understanding seabird evolution, ecology and conservation. – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 451: 285–304.
- Valdes, A. M., Slatkin, M. and Freiner, N. B. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. – *Genetics* 133: 737–749.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. – *Evolution* 38: 1358–1370.
- Wiley, A. E., Welch, A. J., Ostrom, P. H., James, H. F., Stricker, C. A., Fleischer, R. C., Gandhi, H., Adams, J., Ainley, D. G., Duvall, F., Holmes, N., Hu, D., Judge, S., Penniman, J. and Swindle, K. A. 2012. Foraging segregation and genetic

divergence between geographically proximate colonies of a highly mobile seabird. – *Oecologia* 168: 119-130.

Zhang, B., Fang, S. G. and Xi, Y. M. 2004. Low genetic diversity in the Endangered crested ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. – *Bird Conserv. Int.* 14: 183–190.

Table 1. Microsatellite genetic diversity of Red-billed tropicbirds *Phaethon aethereus* on Abrolhos archipelago and of White-tailed tropicbirds *Phaethon lepturus* on Fernando de Noronha archipelago, Brazil. Number of alleles per locus (A), allelic richness (\bar{A}), observed heterozygosity (H_O), Nei's estimated heterozygosity (H_E), average heterozygosity (H), and inbreeding coefficient values (F_{IS}).

Locus	Red-billed tropicbird (n = 37)				White-tailed tropicbird (n = 35)			
	A	H_O	H_E	F_{IS}	A	H_O	H_E	F_{IS}
P3G12	3	0.029*	0.364	0.922	2	0.000*	0.061	0.664
P3D7	3	0.000*	0.377	1.000	5	0.468*	0.535	0.117
P3A3	2	0.000*	0.210	1.000	3	0.125	0.177	0.469
P4F2	3	0.205*	0.476	0.680	27	0.935	0.947	0.008
P3C1	7	0.382*	0.696	0.511	6	0.218*	0.563	0.647
P3F7	2	0.000*	0.421	1.000	15	0.903	0.883	0.005
P4G1	4	0.500	0.517	0.076				
P3A4	7	0.333*	0.419	0.218	8	0.354*	0.525	0.304
P3F3					4	0.517*	0.699	0.268
P3H10	3	0.117	0.113	-0.034	3	0.709	0.552	-0.157
P3F5	6	0.454*	0.531	0.163	5	0.312	0.285	-0.024
\bar{A}	4				7.8			
H		0.309				0.454		

* The loci with observed heterozygosity marked with an asterisk are in Hardy-Weinberg disequilibrium ($P < 0.01$ after Bonferroni correction).

Figure Captions

Figure 1. Map of study area, with Fernando de Noronha and Abrolhos archipelagos, Brazil

Figure 2. Estimated Ln Prob of Data $\ln \Pr(X|K)$ for each number of populations assumed (K). The K chosen as the best parameter for the ancestry model is that located on beginning of the plateau, where the curve stabilizes. $K = 4$ for RBT – red-billed tropicbird *Phaethon aethereus* and $K = 2$ for WTT – White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus*.

Figure 3. Distribution of allele frequencies in relation to the percentage of alleles at each locus, in two tropicbird species in Brazil. The graph indicates L-shaped distribution, indicating that populations of tropicbirds on the Brazilian coast were recently bottlenecked.

Figure 4. Intraspecific connectivity of tropicbirds on Brazilian islands based on ancestry model that test for migrants from percentual allelic frequencies. (a) White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus* sampled in Abrolhos (right bar) compared to the breeding population of Fernando de Noronha. The two Red-billed tropicbirds *Phaethon aethereus* sampled in Fernando de Noronha (right bars) compared to the breeding population of Abrolhos, assuming (b) four populations ($K = 4$), and (c) two populations ($K = 2$).



Figure 1.



Figure 2.

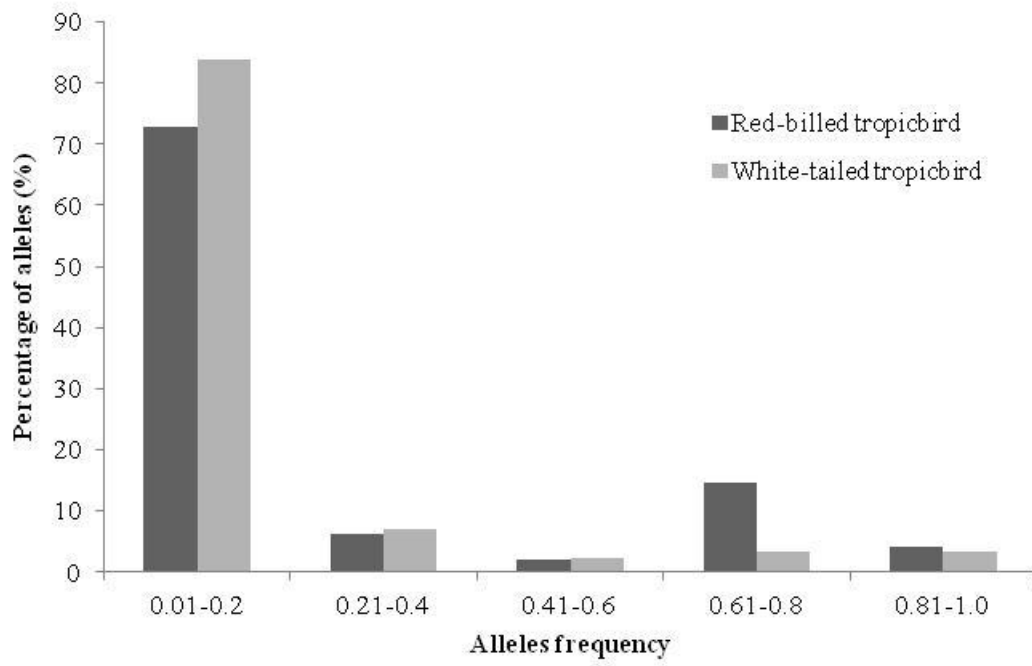


Figure 3.

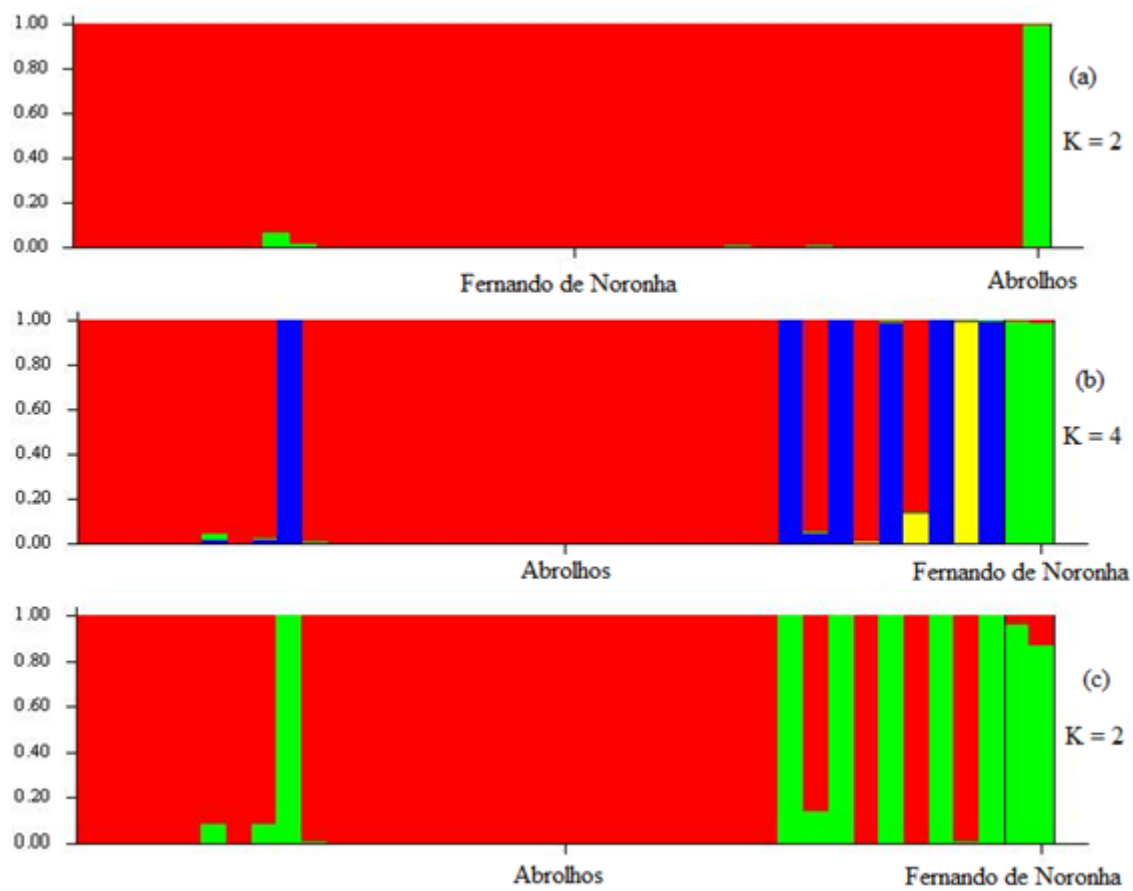


Figure 4.