

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO

JAQUELINE BRUMMELHAUS

VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA ENTRE OS SEXOS, VARIABILIDADE GENÉTICA E
INFERÊNCIA DE EXPANSÃO HISTÓRICA DE *Pygoscelis antarcticus*, NAS ILHAS
SHETLAND DO SUL, ANTÁRTICA

SÃO LEOPOLDO, RS

2013

JAQUELINE BRUMMELHAUS

VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA ENTRE OS SEXOS, VARIABILIDADE GENÉTICA E
INFERÊNCIA DE EXPANSÃO HISTÓRICA DE *Pygoscelis antarcticus*, NAS ILHAS
SHETLAND DO SUL, ANTÁRTICA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS.

Área da Concentração: Ecologia de Populações e de Comunidades.

Orientadora: Dra. Maria Virginia Petry

Coorientador: Dr. Victor Hugo Valiati

São Leopoldo, RS

2013

Ficha catalográfica

B893v Brummelhaus, Jaqueline
Variação morfométrica entre os sexos, variabilidade genética e inferência de expansão histórica de *Pygoscelis antarcticus*, nas ilhas Shetland do Sul, Antártica / por Jaqueline Brummelhaus. – 2013.
71 f.: il., 30 cm.
Tese (doutorado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2013.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Virginia Petry ; Coorientação: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati.
1. Pinguim-antártico. 2. Medidas morfométricas. 3. Sexagem molecular. 4. DNA mitocondrial. 5. Genética de populações.
I. Título.

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Vanessa Borges Nunes - CRB 10/1556

JAQUELINE BRUMMELHAUS

VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA ENTRE OS SEXOS, VARIABILIDADE GENÉTICA E
INFERÊNCIA DE EXPANSÃO HISTÓRICA DE *Pygoscelis antarcticus*, NAS ILHAS
SHETLAND DO SUL, ANTÁRTICA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos,
UNISINOS.

21 de novembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente da Banca e Orientadora: Prof. Dra. Maria Virginia Petry – UNISINOS

Coorientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati – UNISINOS

Membro Prof. Dra. Larissa Rosa de Oliveira – UNISINOS

Membro Prof. Dr. Ricardo Grunski – UNIPAMPA

Membro Dra. Vanda Simone da Fonseca – BIOIMAGENS CONSULTORIA AMBIENTAL
LTDA

Membro Prof. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas – UFMG

Dedico essa tese ao meu filho Marcos Eduardo e ao pai dele, meu amor José Germano, em quem sempre encontrei todo o apoio, conforto e motivação quando tanto precisava. Vocês são a minha vida!

AGRADECIMENTOS

ESTA TESE DE DOUTORADO: FINAL DE UM PROCESSO E INÍCIO DE UMA NOVA FASE...

Primeiramente agradeço ao meu pai Irineu (*in memoriam*) e minha mãe Dalita pela bênção da VIDA! Obrigada pelos valiosos exemplos de vida, sabedoria e humildade, sigo-os com orgulho!

Germano, me mostrastes um novo e magnífico conceito de VIDA: o de ser MÃE do nosso Marcos Eduardo! Sentimento infinito e indescritível! Como não superar qualquer adversidade do doutorado com tanta energia maravilhosa? Dedico todo meu trabalho a vocês dois! Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, mesmo que por longos períodos de grande distância, agradeço por todas as coisas boas que vocês me proporcionaram!

À orientadora, Dra. Maria Virginia Petry pela oportunidade de conhecer os fantásticos pinguins no incrível continente gelado. E por todos os ensinamentos dos verdadeiros valores da uma vida pessoal e profissional com sucesso.

Ao Coordenador do PPG da Biologia (UNISINOS) e Coorientador, Dr. Victor Hugo Valiati. Caí de paraquedas, e justamente por isso, muito obrigada pela excelente acolhida ao mundo invisível da Biologia Molecular, que faz tudo ter mais sentido! Às incansáveis explicações, leituras dos capítulos e da tese, muitas e muitas orientações! À sua competência, dedicação, humildade e amizade. Um simples diálogo sempre aliviava as minhas aflições e animavam a autoconfiança! Te admiro e respeito Professor!

Um agradecimento muito especial para a Roberta da Cruz Piuco! Verdadeira colega e amiga desde a Graduação de Biologia, estamos juntas até no dia da defesa da tese! Coincidência? Não sei, mas as inúmeras provações de coleguismo e amizade nesses anos todos nos tornaram comadres! Perfeito, uma ligação para sempre! Obrigada por tudo! E que venham muitos trabalhos para realizarmos pela frente!

À Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, ao corpo docente e funcionários do Programa de Pós Graduação em Biologia.

Aos colegas do Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos (LOAM – UNISINOS) pela coleta de dados que tornaram essa tese possível e pela confecção do mapa.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (UNISINOS) pela ótima acolhida e por todos os ensinamentos e auxílios nas atividades de bancada. E muitas risadas também.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados (LABEC – USP), muito obrigada pela acolhida, auxílio e aprendizagens nas atividades de biologia molecular.

Aos membros da banca avaliadora dessa tese, por suas valiosas contribuições.

Aos meus inúmeros e amáveis AMIGOS, distantes ou perto, que de alguma forma estiveram junto comigo nessa caminhada, fortalecendo meu entusiasmo e autoconfiança. São tantos, difícil citar todos, mas moram no meu coração!

Aos meus queridos colegas da Fundação Liberato Salzano Vieira da Cunha por todo apoio e compreensão, principalmente nesses momentos finais do desenvolvimento da tese!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais – INCT-APA, ao Programa Antártico Brasileiro, à Secretaria Interministerial para os Recursos do Mar – SECIRM e ao Ministério do Meio Ambiente – MMA.

À Associação de Pesquisadores e Educadores em Início de Carreira sobre o Mar e os Polos (APECS-Brasil) por me oportunizar o conhecimento e a prática de outra perspectiva da Ciência: a divulgação!

E um sentido maior à redação dessa tese terá com os capítulos publicados em periódicos científicos, ou seja, o trabalho continua!

Enfim, esses quatro anos de doutorado foram significativamente intensos na aprendizagem e construção de inúmeros conhecimentos, sejam científicos ou técnicos, profissionais ou pessoais e uma grande e valiosa oportunidade para desenvolver algumas artes: da paciência, da perseverança, da serenidade...

Por isso que...



MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS A TODOS!!!

RESUMO

O pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*) tem suas populações distribuídas principalmente nas Ilhas Sandwich do Sul, Georgia do Sul e Shetlands do Sul e na região da Península Antártica. Algumas de suas características são o baixo dimorfismo sexual, a monogamia e o comportamento filopátrico. Esta tese tem como objetivos: 1) quantificar o dimorfismo sexual através de medidas morfológicas, testar uma função discriminante e avaliar o dimorfismo sexual entre duas áreas de reprodução distantes (Ilhas Rei George e Elefante, Shetlands do Sul); 2) caracterizar a distribuição espacial da variabilidade genética populacional entre colônias de reprodução nas Ilhas Rei George e Elefante, através de marcador mitocondrial. Na avaliação do dimorfismo sexual de tamanho, através de caracteres morfológicos, foi encontrado que machos são 6 a 9,4% maiores que as fêmeas e a equação discriminante formulada classifica corretamente 80,6% das aves. Não foi encontrada diferença no dimorfismo sexual entre as colônias de reprodução das Ilhas Rei George e Elefante. Mesmo sendo uma alternativa na determinação sexual, as equações discriminantes devem ser usadas com cautela em locais diferentes do que foram produzidas por causa dos erros de classificação. Quando equações discriminantes das Ilhas Deception e Rei George foram testadas para os dados da Ilha Elefante, obteve-se apenas 67,7% e 71% de acerto. Desta forma, a abordagem molecular é uma opção eficiente na resolução de dúvidas relacionadas à sexagem. Quanto à variabilidade genética com uso de marcador mitocondrial, foram encontrados 38 haplótipos para 61 indivíduos analisados, sendo apenas dois compartilhados nas colônias e todos os demais são exclusivos. Os valores de F_{ST} e da AMOVA revelam que a divergência entre as populações é baixa e que a maioria da variação genética (98,3%) ocorreu dentro das populações. Isso poderia ser justificado por um alto fluxo gênico entre as populações, mas não corrobora com o comportamento filopátrico da espécie. Os testes de neutralidade e de expansão demográfica apontam para uma evolução neutra e possibilidade de expansão, que ocorreu há mais de dois milhões de anos atrás e no último um milhão de anos o tamanho efetivo populacional manteve-se constante. Os resultados ressaltam a ocorrência de uma expansão populacional a partir de uma população geneticamente homogênea e a manutenção do tamanho efetivo em longa escala de tempo pode ter amplamente contribuído para a falta de estruturação genética entre as colônias recentes de pinguim-antártico.

Palavras-chave: Pinguim-antártico. Medidas morfométricas. Sexagem molecular. DNA mitocondrial. Genética de populações.

ABSTRACT

Chinstrap penguin (*Pygoscelis antarcticus*) has their populations distributed mainly in South Sandwich, South Georgia and South Shetlands Islands, and the Antarctic Peninsula. This specie presents low sexual dimorphism, monogamy and philopatric behavior. This thesis aims to: 1) to evaluate sexual dimorphism among males and females and among two breeding areas (King George and Elephant Islands) using morphological characters and to obtain a discriminant function based on the characters that best identify the sex of Chinstrap penguins; 2) to determine the spatial structuring of population genetic variation among breeding colonies at King George and Elephant Islands, using mitochondrial control region. In the assessment of sexual dimorphism using morphological characters, were found that males were 6 to 9.4% larger than females and discriminant equation formulated correctly classifies 80.6% of the birds. There was no difference in sexual dimorphism between the breeding colonies of King George and Elephant Islands. However, the discriminant function should be used with caution in different locations than are produced because penguins may be misclassified. When discriminant equations from Deception and King George Islands were tested for Elephant Island data, we obtained only 67.7% and 71% accuracy. Where there is doubt in the field, it would be interesting to apply molecular sexing technique. For genetic variability using mitochondrial control region, were found 38 haplotypes for 61 individuals analyzed, only two were shared in the colonies and all others are exclusive. F_{ST} and AMOVA values revealed that the divergence between populations is low and that most of genetic variation (98.3%) occurred within populations. This could be explained by a high gene flow among populations, but does not corroborate with the philopatric behavior of this specie. The neutrality tests and *Mismatch distribution* point to a neutral evolution and possibility of expansion, which occurred more 2 Mya and the last 1 Mya, the effective population size remained constant. The results show the occurrence of a population expansion from a genetically homogeneous population and maintenance of effective size in long time scale can have widely contributed to the lack of genetic structuring among the current colonies of Chinstrap penguin.

Keywords: Chinstrap penguin. Morphometric measurements. Molecular sexing. Mitochondrial DNA. Genetic population.

APRESENTAÇÃO

Os capítulos desta tese de doutorado estão organizados em forma de artigos científicos, com o objetivo de sistematizá-los considerando as regras estabelecidas aos autores do periódico Antarctic Science minimizando o tempo para publicação dos resultados obtidos. Primeiramente, apresento uma introdução geral sobre o pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*) encontrado no ecossistema Antártico, destacando informações biológicas e ecológicas da espécie. Em seguida, o desenvolvimento dos capítulos componentes da tese, e ao final, uma conclusão geral envolvendo a relação das principais ideias de cada um dos capítulos.

O primeiro capítulo é intitulado “**Sexual Dimorphism in *Pygoscelis antarcticus*: Molecular Sexing and Discriminant Functions in the South Shetland Islands, Antarctica**”. Este tem como objetivos identificar o sexo de adultos reprodutores de pinguim-antártico através de abordagem molecular, avaliando o dimorfismo sexual de tamanho e usando-se os principais caracteres morfométricos na formulação de uma equação discriminante. Além disso, avaliar o dimorfismo sexual entre as Ilhas Rei George e Elefante, testando a validação de funções discriminantes. Este artigo foi submetido para o periódico Antarctic Science.

O segundo capítulo tem como título “**Evidências de expansão populacional na história evolutiva do pinguim-antártico, *Pygoscelis antarcticus*, Ilhas Shetland do Sul, Antártica**”. O principal objetivo é caracterizar distribuição espacial da variabilidade genética populacional entre colônias de reprodução do pinguim-antártico utilizando-se um segmento da região D-Loop do DNA mitocondrial, testando a hipótese de estruturação em decorrência da ausência de fluxo gênico entre as áreas de reprodução.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
APRESENTAÇÃO	10
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. Referências bibliográficas	19
2. CAPÍTULO 1: SEXUAL DIMORPHISM IN <i>Pygoscelis antarcticus</i>: MOLECULAR SEXING AND DISCRIMINANT FUNCTIONS IN THE SOUTH SHETLAND ISLANDS, ANTARCTICA	26
2.1. Abstract	27
2.2. Introduction	27
2.3. Methods	29
2.3.1. Molecular sexing	29
2.3.2. Statistical analysis	29
2.4. Results	30
2.4.1. Molecular sexing	30
2.4.2. Morphometric differences between sexes and breeding locations	30
2.4.3. Discriminant function analysis	31
2.5. Discussion	31
2.6. Acknowledgements	33
2.7. Literature cited	33
3. CAPÍTULO 2: EVIDÊNCIAS DE EXPANSÃO POPULACIONAL NA HISTÓRIA EVOLUTIVA DO PINGUIM-ANTÁRTICO, <i>Pygoscelis antarcticus</i>, ILHAS SHETLAND DO SUL, ANTÁRTICA	41
3.1. Resumo	42
3.2. Introdução	42
3.3. Materiais e Métodos	45
3.3.1. Amostragem	45
3.3.2. Extração de DNA e PCR	45
3.3.3. Análise de dados	46
3.4. Resultados	47

3.5. Discussão	48
3.6. Agradecimentos	51
3.7. Referências bibliográficas	52
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
4.1. Referências bibliográficas	69
5. ANEXO 1	70
6. ANEXO 2	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Spheniscidae é formada por 18 espécies de pinguins que possuem uma estrutura corporal similar, com uma grande variedade de aspectos relacionados à biologia reprodutiva: reproduzem desde ambientes desérticos até gélidos do Continente Antártico (STONEHOUSE, 1975; WILLIAMS, 1995). Uma das sete espécies que reproduzem ao sul do paralelo 60° é o pinguim-antártico, *Pygoscelis antarcticus*, o menor pinguim em relação às outras duas espécies do gênero (*P. adeliae* e *P. papua*) com 68-75 cm de altura e 4,1-6,2 kg de massa média, para adultos (STONEHOUSE, 1975; WILLIAMS, 1995). Assim como outras espécies de pinguins, não apresenta dimorfismo sexual de plumagem, apenas os machos são um pouco maiores que as fêmeas (AMAT et al., 1993; BERTELLOTTI et al., 2002; POLITO et al., 2012; VALENZUELA-GUERRA et al., 2013; ZAVALAGA e PAREDES, 1997).

O comportamento reprodutivo apresenta um ciclo que envolve a ausência do pinguim-antártico dos locais de reprodução entre maio e setembro de cada ano (inverno austral) e retorno para os mesmos entre final de setembro e início de novembro (primavera austral) (CONROY et al., 1975a; JABLÓNSKI, 1986; LUMPE e WEIDINGER, 2000; TRIVELPIECE e VOLKMAN, 1979; WILLIAMS, 1995). Sobre a maturidade sexual da espécie pouco é conhecido, mas juvenis retornam à colônia natal para a segunda muda e aos dois anos já formam pares (WILLIAMS, 1995). Em idade reprodutiva, os casais de pinguins se organizam em grupos distintos chamados de colônias, que podem ainda estar subdivididos em grupos de nidificação (JABLÓNSKI, 1984a; MÜLLER-SCHWARZE e MÜLLER-SCHWARZE, 1975; TRIVELPIECE e VOLKMAN, 1979). O tamanho das colônias varia de poucas dezenas até milhares de ninhos que estão distantes entre si entorno de 86,4 cm e são construídos principalmente com pequenos seixos, sempre em áreas livres de gelo (JABLÓNSKI, 1984b; MORENO et al., 1995; MÜLLER-SCHWARZE e MÜLLER-SCHWARZE, 1975). As colônias de reprodução podem ser mistas, ou seja, *P. antarcticus* pode reproduzir nas mesmas áreas utilizadas por *P. adeliae* e *P. papua*, mas o pinguim-antártico chega duas a quatro semanas mais tarde (CONROY et al., 1975b; MÜLLER-SCHWARZE e MÜLLER-SCHWARZE, 1975; TRIVELPIECE e VOLKMAN, 1979; STONEHOUSE, 1975). A incubação de um ou dois ovos durante 33-35 dias conta com a participação de ambos os indivíduos do casal, que se alternam em períodos iniciais de 5 a 10 dias e depois por períodos mais curtos. A eclosão ocorre no final de dezembro e início de janeiro, e como o filhote é nidículo, há a necessidade do cuidado parental em toda a fase de

guarda até a entrada da creche por volta dos 30 dias de vida. Durante o período de guarda, os adultos revezam-se em turnos de 12-24 horas para cuidado e alimentação dos filhotes. A formação da creche inicia quando ambos os adultos vão forragear para garantir o suprimento necessário para o filhote atingir o tamanho de um adulto e realizar a troca da penugem pelas penas definitivas. Na creche, acontece o desmanche dos ninhos e pequenos grupos de filhotes se juntam, sendo então cuidados por alguns adultos que se revezam na colônia. Esse período perdura entre 50 e 60 dias e os filhotes ainda são alimentados por seus pais, em intervalos de um até alguns dias. Ao final da creche, entre a metade de fevereiro e início de março, os adultos começam a ausentar-se das colônias de reprodução e vão para o mar para garantir a sua própria reserva de energia para o período de muda que se aproxima com o final da estação reprodutiva. O processo de muda dura por volta de 18 dias, e dessa forma os jovens são incentivados a partir para o mar (CONROY et al., 1975a,b; CROXALL e DAVIS, 1999; CROXALL e FURSE, 1980; TRIVELPIECE e TRIVELPIECE, 1990; TRIVELPIECE e VOLKMAN, 1979; TRIVELPIECE et al., 1987; WILLIAMS, 1995). Durante o inverno, o pinguim-antártico permanece em alto mar, próximo à região de convergência antártica, mas não associados ao gelo marinho como o *P. adeliae* (FRASER et al., 1992; TRIVELPIECE et al., 1990; TRIVELPIECE et al., 2007).

Este ciclo reprodutivo sincronizado é acompanhado de muitas atividades predatórias que podem ser observadas no entorno das colônias de reprodução do pinguim-antártico. Entre seus principais predadores está a skua-sub-antártica (*Stercorarius lonnbergi*), que possui preferência em defender seu território próximo às colônias de pinguins, onde obtém seu recurso alimentar (ovos, filhotes, carcaças) diretamente da colônia (PIETZ, 1987). Indivíduos de skua-sub-antártica podem ser observados com frequência na periferia das colônias de pinguim-antártico em busca de indivíduos vulneráveis (adultos e filhotes feridos e debilitados) e/ou ovos e filhotes abandonados por adultos (MORENO et al., 1998; PIETZ, 1987). A foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*) leva e ataca suas presas na água e parece ter preferência em alimentar-se onde podem ser encontradas colônias maiores de pinguins (colônias com dezenas de milhares de pares reprodutores), onde com muita frequência são observados pinguins feridos retornando do mar (CONROY et al., 1975b; MÜLLER-SCHWARZE e MÜLLER-SCHWARZE, 1975).

As populações do pinguim-antártico têm distribuição circumpolar e os oito milhões de indivíduos estimados estão distribuídos principalmente nas Ilhas Sandwich do Sul, Orkneys do Sul e Shetlands do Sul e também na Península Antártica (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2013; TRIVELPIECE e TRIVELPIECE, 1990). Nas Ilhas Shetland do Sul é a espécie de

pinguim mais numerosa (HARRIS, 2006). Nas Ilhas Rei George e Elefante, que fazem parte do Arquipélago das Shetlands do Sul, o pinguim-antártico pode ser encontrado em colônias de reprodução próximas de *P. adeliae* e *P. papua* (JABLÓNSKI, 1980; PETRY, 1994; SANDER et al., 2007a; TRIVELPIECE e TRIVELPIECE, 1990; TRIVELPIECE et al., 1987). Em relação ao estado de conservação e ameaças, a espécie é classificada como pouco preocupante, com tendência de crescimento populacional positivo (IUCN, 2013).

O principal recurso alimentar do pinguim-antártico é a *Euphasia superba* (krill-antártico) adulto, com cerca de 45 mm de comprimento (CROXALL e FURSE, 1980; MILLER e TRIVELPIECE, 2007; TRIVELPIECE et al., 1990; VOLKMAN et al., 1980; WARREN et al., 2009). Em anos com a diminuição da disponibilidade de krill-antártico, observou-se que o pinguim-antártico tem mudado o seu comportamento alimentar consumindo maior quantidade de peixes mictofídeos, além de adotar outras estratégias de forrageio (LYNNES et al., 2002; MILLER e TRIVELPIECE, 2008). É um mergulhador raso, a maioria dos indivíduos pesca entre 10 e 40 m de profundidade, alimentando-se em águas marinhas próximas das colônias de reprodução, numa distância média de 30 km do local de reprodução (CROXALL e LISHMAN, 1990; LYNNES et al., 2002; MILLER et al., 2010; MILLER e TRIVELPIECE, 2008; TRIVELPIECE et al., 1986; TRIVELPIECE et al., 1987; WILLIAMS, 1995).

Através de estudos com anilhamento, foi observado que o pinguim-antártico é uma espécie filopátrica, ou seja, maioria dos indivíduos retorna para o mesmo local de reprodução em sucessivas estações reprodutivas (AINLEY et al., 1995; TRIVELPIECE e TRIVELPIECE, 1990; WILLIAMS, 1995). Além disso, é monogâmico e isso implica sobre o esforço do cuidado biparental para a criação dos filhotes (MORENO et al., 2000; TRIVELPIECE e TRIVELPIECE, 1990; WILLIAMS, 1995). A partir dessas características da espécie, espera-se que ocorra a manutenção do tamanho populacional quando a razão sexual nas colônias de reprodução for 1:1 e quando o sucesso reprodutivo for igual a um. No entanto, o que se observa é uma flutuação populacional ao longo dos anos em colônias onde ocorre o monitoramento da espécie em ilhas do Arquipélago das Shetlands do Sul e na Península Antártica (Tabela 1). Alterações demográficas também acontecem com muitas outras populações de aves antárticas ou subantárticas (WOEHLER e CROXALL, 1997). Diversas condições podem influenciar a variação do tamanho populacional nas colônias de reprodução do pinguim-antártico, sendo bastante discutidas na literatura: ocupação de novas áreas de reprodução em áreas livres de gelo (CONROY, 1975; JABLÓNSKI, 1984a); competição por alimento e, portanto, disponibilidade das presas na época reprodutiva e

durante o inverno (AGUIRRE, 1995; CARLINI et al., 2009; CONROY, 1975; FRASER et al., 1992); o esforço parental no suprimento alimentar aos filhotes em período de escassez de presas (CROLL et al., 2006); mortalidade de jovens durante o inverno (HINKE et al., 2007); sucesso reprodutivo (BARBOSA et al., 1997; FARGALLO et al., 2004; MORENO et al., 1995); influências indiretas pelas mudanças climáticas (CARLINI et al., 2009; FORCADA et al., 2006; HINKE et al., 2007; KORCZAK-ABSHIRE, 2010); qualidade do cuidado parental (BELLIURE et al. 1999; LEÓN et al. 1998); predação (COSTA e ALVES 2007; MORENO et al. 1997) e atividades antrópicas (BARBOSA et al. 2012; CHWEDORZEWSKA e KORCZAK 2010; IAATO 2009; MARTIN et al. 2004).

Essa dinâmica populacional com eventos de aumento e/ou redução do tamanho populacional nos diferentes locais de reprodução do pinguim-antártico nas Shetlands do Sul pode afetar a variabilidade genética da espécie, sobretudo por se considerada uma espécie filopátrica (FRANKHAM, 1995; KORZAK-ABSHIRE et al., 2012; WILLIAMS, 1995). O sucesso reprodutivo, o tamanho populacional, a taxa de endogamia e desvio da razão sexual podem influenciar o tamanho efetivo da população em longo prazo, de forma que implicam no número de filhotes que retornarão às colônias natais para a reprodução, causando efeitos sobre os parâmetros demográficos (CARLINI et al., 2009; DANTAS, 2007; FRANKHAM, 1995). A perda da variabilidade genética nas populações geralmente associa-se à redução do sucesso reprodutivo e/ou mudanças de comportamentos, o que poderia ser uma hipótese para compreender a redução populacional das espécies de pinguins (KORZAK-ABSHIRE et al., 2012), mas muito pouco se sabe sobre a diversidade genética populacional de *P. antarcticus*.

O estudo da estrutura genética através de marcadores moleculares fornece uma alternativa para estudos comportamentais e de monitoramento para as espécies de pinguins que passam a maior parte de sua vida em alto mar (SCHLOSSER et al., 2003). Da mesma forma, são úteis para a solução de questões relevantes à conservação das espécies, pois permitem identificar se as espécies estão ameaçadas de extinção através da avaliação da perda de variabilidade, depressão por endocruzamento, gargalos populacionais e/ou fragmentação das populações (ROEDER et al., 2002).

Sob todo esse contexto, a presente tese envolve o estudo de características morfológicas e genéticas do *Pygoscelis antarcticus* na Baía do Almirantado (Ilha Rei George) e em Stinker Point (Ilha Elefante), Arquipélago Shetlands do Sul, Antártica. A pesquisa de medidas morfológicas relacionadas com ferramenta molecular na identificação do sexo permitiu avaliar se há diferenças morfológicas de tamanho corporal do pinguim-antártico entre as Ilhas Rei George e Elefante. Junto a isso, avaliou-se a estruturação genética entre as

colônias reprodutivas das duas ilhas com o uso da região controladora do DNA mitocondrial como marcador molecular de genética populacional.

A Baía do Almirantado é a maior baía localizada na costa sul da Ilha Rei George (oeste da Península Antártica) e onde se localiza a Estação Brasileira Comandante Ferraz. É chamada ASMA N° 1 (Área Antártica Especialmente Gerenciada) que inclui também a ASPA 128 (Área Antártica Especialmente Protegida) na costa oeste da Baía do Almirantado (ASPA N°. 128 MANAGEMENT PLAN, 2000). Nas áreas livres de gelo há praias bastante recortadas alternando geleiras, costões rochosos e ilhotas (HARRIS et al., 2011). Líquens dominam a área em altitudes superiores a 60 m, enquanto que nas áreas mais baixas são encontrados musgos e plantas com flores (ASPA N°. 128 MANAGEMENT PLAN, 2000). Stinker Point localiza-se na costa Sudoeste da Ilha Elefante, que está mais ao norte do Arquipélago das Shetlands do Sul, a aproximadamente a 153 km da Ilha Rei George (HARRIS et al., 2011). A Ilha Elefante é formada por rochas sedimentares metamorfoseadas bastante encobertas por neve ou geleiras (ALLISON e SMITH, 1973). Em suas áreas livres de gelo, há praias estreitas, penhascos íngremes e geleiras que adentram no mar, mas há terrenos adequados ao desenvolvimento de plantas e para áreas de reprodução de aves (ALLISON e SMITH, 1973).

Na ASPA 128 (Baía do Almirantado, Ilha Rei George) e em Stinker Point (Ilha Elefante) há importantes áreas para as aves (IBA – Important Bird Areas in Antarctica) classificadas pela BirdLife International e pelo Comitê Científico de Pesquisas Antárticas (SCAR – Scientific Committee on Antarctic Research), como IBA Ant066 e IBA Ant071 respectivamente (HARRIS et al., 2011). Com a atual definição da importância dessas áreas para a conservação das aves, a presente tese visa gerar e integrar informações sobre aspectos da biologia do pinguim-antártico que atualmente são escassas para a espécie e também para essas IBAs.

Tabela 1: Status de abundância de *P. antarcticus* em alguns locais da Península Antártica, Ilhas Orcadas do Sul e Shetland do Sul, Antártica.

Local	Pares reprodutores	Período	Referência
Península Antártica	aumento e redução	1971 – 2011	GONZÁLES-ZEVALLOS et al., 2013; WOEHLER e CROXALL, 1997.
Ilhas Orkney do Sul			
Laurie	redução e aumento	1945 – 1994	WOEHLER e CROXALL, 1997.
Ilhas Shetland do Sul			
Livingston	aumento e redução	1966 – 1996	SHUFORD e SPEAR, 1988; WOEHLER e CROXALL, 1997; HINKE et al., 2007.
Deception	aumento e redução	1957 – 2008	BARBOSA et al., 1997; BARBOSA et al., 2012; BÓ e COPELLO, 2000; MORENO et al., 1999; SHUFORD e SPEAR, 1988; WOEHLER, 1993.
Nelson	redução	1987 – 1995	SILVA et al., 1998; SHUFORD e SPEAR, 1988; WOEHLER e CROXALL, 1997.
Pinguim	redução	1979 – 2003	JABLÓNSKI, 1984a; SANDER et al., 2007a.
Rei George	aumento e redução	1973 – 2004	CIAPUTA e SIERAKOWSKI, 1999; JABLÓNSKI, 1984a; JABLÓNSKI, 1984b; JABLÓNSKI, 1986; SANDER et al., 2005; SANDER et al., 2007b; SHUFORD e SPEAR, 1988; SIERAKOWSKI, 1991; TRIVELPIECE et al., 1990; YAÑEZ et al., 1984; WOEHLER e CROXALL, 1997.
Seal	redução e aumento	1990 – 1992	CROLL et al., 2006.
Elefante	Redução	1971 – 2011	FURSE e BRUCE, 1972; PETRY, 1994; PIUCO et al., 2011.

1.1. Referências bibliográficas

- AINLEY, D. G.; NUR, N.; WOEHLER, E. J. Factors affecting the distribution and size of pygoscelid penguin colonies in the Antarctic. **The Auk**, v. 112, n. 1, p. 171-182, 1995.
- AGUIRRE, C. A. Distribution and abundance of birds at Plotter Península, 25 de Mayo (King George) Island, South Shetland, Antarctica. **Marine Ornithology**, v. 23, p. 23-31, 1995.
- ALLISON, J. S.; SMITH, R. I. L. The vegetation of Elephant Island, South Shetland Islands. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 33, 34, p. 185-212, 1973.
- AMAT, J. A.; VIÑUELA, J.; FERRER, M. Sexing Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) by morphological measurements. **Colonial Waterbirds**, v. 16, p. 213-215, 1993.
- ANTARCTIC SPECIALLY PROTECTED AREA (ASPA) No. 128 MANAGEMENT PLAN: Western shore of Admiralty Bay, King George Island. 2000.
- BARBOSA, A.; MORENO J.; POTTI J.; MERINO S. Breeding group size, nest position and breeding success in the Chinstrap Penguin. **Polar Biology**, v. 18, p. 410-414, 1997.
- BARBOSA, A.; BENZAL, J; De LEÓN, A.; MORENO, J. Population decline of chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) on Deception Island, South Shetlands, Antarctica. **Polar Biology**, v. 35, n. 9, p. 1453-1457, 2012.
- BELLIURE, J.; CARRASCAL, M. L. M.; MINGUEZ, E.; FERRER, M. Limited effects of egg size on chick growth in the chinstrap Penguin *Pygoscelis antarctica*. **Polar Biology**, v. 21, p. 80-83, 1999.
- BERTELLOTTI, M.; TELLA, J. L.; GODOY, J. A.; BLANCO, G.; FORERO, M. G.; DONÁZAR, J. A.; CEBALLOS, O. Determining sex of Magellanic penguins using molecular procedures and discriminant functions. **Waterbirds**, v. 25, p. 479-484, 2002.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL Species factsheet: *Pygoscelis antarcticus*. 2013, download <http://www.birdlife.org> em 08 jul. 2013.
- BÓ, M. S.; COPELLO S. Distribution and abundance of breeding birds at Deception Island, South Shetland Islands, Antarctica, February to April 2000. **Marine Ornithology**, v. 29, p. 39-42, 2000.
- CARLINI, A. R.; CORIA, N. R.; SANTOS, M. M.; LIBERTELLI, M. M.; DONINI, G. Breeding success and population trends in Adélie penguins in areas with low and high levels of human disturbance. **Polar Biology**, v. 30, p. 917-924, 2009.
- CHWEDORZEWSKA, K. J.; KORCZAK, M. Human impact upon the environment in the vicinity of Arctowski Station, King George Island, Antarctica. **Polish Polar Research**, v. 31, p. 45-60, 2010.

- CIAPUTA, P.; SIERAKOWSKI, K. Long-term population changes of Adélie, chinstrap, and gentoo penguins in the regions of SSSI No. 8 and SSSI No. 34, King George Island, Antarctica. **Polish Polar Research**, v. 20, n. 4, p. 355-365, 1999.
- CONROY, J. W. H. Recent increases in penguin populations in Antarctica and the Subantarctic. In: STONEHOUSE, B. (Ed.). **The Biology of penguins**. Baltimore: University Park Press, 1975, p. 321-336.
- CONROY, J. W. H.; DARLING, O. H. S.; SMITH, H. G. 1975a. The annual cycle of the Chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* on Signy Island, South Orkney Islands. In: STONEHOUSE, B. (Ed.). **The Biology of penguins**. Baltimore: University Park Press, 1975a, p. 353-362.
- CONROY, J. W. H.; WHITE, M. G.; FURSE, J. R.; BRUCE, G. Observations on the breeding biology of the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*, at Elephant Island, South Shetland Islands. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 40, p. 23-32, 1975b.
- COSTA, E. S.; ALVES, M. A. dos S. Alteração climática, retração glacial e as skuas de Ponta Hennequin, Ilha Rei George, Península Antártica. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 8., 2007, Caxambú. **Anais eletrônicos...** Caxambu, 2007.
- CROLL, D. A.; DEMER D. A.; HEWITT R. P.; JANSEN J. K.; GOEBEL M. E., TERSHY B. R. Effects of variability in prey abundance on reproduction and foraging in chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*). **Journal of Zoology**, v. 269, p. 506-513, 2006.
- CROXALL, J. P.; DAVIS, L. S. Penguins: paradoxes and patterns. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 1-12, 1999.
- CROXALL, J. P.; FURSE, J. R. Food Chinstrap penguins *Pygoscelis antarctica* and Macaroni penguins *Eudyptes chrysolophus* at Elephant Island Group, South Shetland Islands. **Ibis**, v. 122, p. 237-245, 1980.
- CROXALL, J. P.; LISHMAN, G. S. The food and feeding ecology of penguins. In: CROXALL, J.P. (Ed.) **Seabirds: feeding biology and role in marine ecosystems**. New York: Cambridge University Press, 1990, 408p.
- DANTAS, G. P. M. **Biologia reprodutiva, estrutura populacional e variabilidade genética de *Larus dominicanus***. 2007. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FARGALLO, J. A.; DÁVILA, J. A.; POTTI, J.; LÉON, A. de; POLO, V. Nest size and hatchling sex ratio in chinstrap penguins. **Polar Biology**, v. 27, p. 339-343, 2004.

- FORCADA, J.; TRATHAN, P. N.; REID, K.; MURPHY, J.; CROXALL, J. P. Contrasting population changes in sympatric penguin species in association with climate warming. **Global Change Biology**, v. 12, p. 411-423, 2006.
- FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. **Conservation Biology**, v. 10, p. 1500-1508, 1995.
- FRASER, W. R.; TRIVELPIECE, W. Z.; AINLEY, D. G.; TRIVELPIECE, S. G. Increases in Antarctic penguin population: reduced competition with whales or a loss of sea ice due to environmental warming? **Polar Biology**, v. 11, p. 525-531, 1992.
- FURSE, J. R.; BRUCE, G. **Ornitology Report**: joint service expedition to Elephant Island 1970-1971. London: 1972.
- GONZÁLES-ZEVALLOS, D.; SANTOS, M. M.; ROMBOLA, E. F.; JUÁRES, M.; CORIA, N. R. Abundance and breeding distribution of seabirds in the northern part of the Danco Coast, Antarctica Peninsula. **Polar Research**, v. 32, 11133, <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v32i0.11133>, 2013.
- HARRIS, C. M. Wildlife Awareness Manual: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Island. Wildlife Information Publication No. 1. Prepared for the UK Foreign & Commonwealth Office and HMS Endurance. Cambridge: Environmental Research & Assessment, 2006.
- HARRIS, C. M.; CARR, R.; LORENZ, K.; JONES, S. **Important Bird Areas in Antarctica**: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Islands – Final Report. Prepared for BirdLife International and the Polar Regions Unit of the UK Foreign & Commonwealth Office. Cambridge: Environmental Research & Assessment Ltd., 2011.
- HINKE, J. T.; SALWICKA, K.; TRIVELPIECE, S. G.; WATTERS, G. M.; TRIVELPIECE, W. Z. Divergent response of *Pygoscelis* penguins reveals a common environmental driver. **Oecologia**, v. 153, p. 845-855, 2007.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION OF ANTARCTICA TOUR OPERATORS (IAATO). **IAATO overview of Antarctic tourism: 2008-2009 Antarctic season and preliminary estimates for 2009-2010 Antarctic season**. ATCM 11, 2009. Disponível em: <www.iaato.org>. Acesso em: 27 abr. 2009.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1**. Suíça: 2013. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 11 Jul. 2013.
- JABLONSKI, B. Distribution and numbers of birds and pinnipedes on Penguin Island (South Shetland Islands) in January 1979. **Polish Polar Research**, v. 1, n. 1, p. 109-116, 1980.

- JABLÒNSKI, B. Distribution and numbers of penguins in the region of King George Island (South Shetland Islands) in the breeding season 1980/1981. **Polish Polar Research**, v. 5, p. 17-30, 1984a.
- JABLÒNSKI, B. Distribution, number and breeding preference of penguins in the region of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands Islands, Antarctica) in the season 1979/80. **Polish Polar Research**, v. 5, p. 5-16, 1984b.
- JABLÒNSKI, B. Distribution, abundance and biomass of a summer community of birds in the region of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica) in 1978/1979. **Polish Polar Research**, v. 7, p. 217-260, 1986.
- KORCZAK-ABSHIRE, M. Climate change influences on Antarctic Bird populations. **Papers on Global Change**, v. 17, p. 43-53, 2010.
- KORCZAK-ABSHIRE, M.; CHWEDORZEWSKA, K. L.; WAŚOWICZ, P.; BEDNAREK, P. T. Genetic structure of declining chinstrap penguin (*Pygoscelis antarcticus*) populations from South Shetlands Islands (Antarctica). **Polar Biology**, v. 35, n. 1, p. 1681-1689, 2012.
- LEÓN, A. de; FARGALLO, J. A.; MORENO, J. Parental body size affects meal size in the chinstrap Penguin (*Pygoscelis antarctica*). **Polar Biology**, v. 19, p. 358-360, 1998.
- LUMPE, P.; WEIDINGER, K. Distribution, numbers and breeding of birds at the Northern ice-free areas of Nelson Island, South Shetlands Islands, Antarctica, 1990-1992. **Marine Ornithology**, v. 28, p. 41-46, 2000.
- LYNNES, A. S.; REID, K.; CROXALL, J. P.; TRATHAN, P. N. Conflict or co-existence? Foraging distribution and competition for prey between Adélie and Chinstrap penguins. **Marine Biology**, v. 141, p. 1165-1174, 2002.
- MARTIN, J.; DE NEVE, L.; FARGALLO, J. A.; POLO, V.; SOLER, M. Factors affecting the escape behavior of juvenile Chinstrap Penguins, *Pygoscelis antarctica*, in response to human disturbance. **Polar Biology**, v. 27, p. 775-781, 2004.
- MILLER, A. K.; MICHELLE, A. K.; TRIVELPIECE, S. G.; Trivelpiece, W. Z. Foraging-niche separation of breeding Gentoo and Chinstrap penguins, South Shetlands Islands, Antarctica. **The Condor**, v. 112, n. 4, p. 683-694, 2010.
- MILLER, A.; TRIVELPIECE, W. Z. Cycles of *Euphasia superba* recruitment evident in the diet of Pygoscelid penguins and net trawls in the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v. 30, p. 1615-1623, 2007.
- MILLER, A.; TRIVELPIECE, W. Z. Chinstrap penguin alter foraging and diving behavior in response to the size of their principle prey, Antarctic krill. **Marine Biology**, v. 154, p. 201-208, 2008.

- MORENO, J.; BARBOSA, A.; POTTI, J.; MERINO, S. The effects of hatching date and parental quality on chick growth and creching age in the chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*): a field experiment. **The Auk**, v. 114, n. 1, p. 47-54, 1997.
- MORENO, J.; BUSTAMANTE, J.; VIÑUELA, J. Nest maintenance and Stone theft in the Chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*) 1. Sex roles and effects on fitness. **Polar Biology**, v. 15, p. 533-540, 1995.
- MORENO, J.; BOTO, L.; FARGALLO, J. A.; de LÉON, A.; POTTI, J. Absence of extra-pair fertilization in the Chinstrap Penguin *Pygoscelis antarctica*. **Journal of Avian Biology**, v. 31, p. 580-583, 2000.
- MORENO, J.; LÉON, A. de; FARGALLO, J. A.; MORENO, E. Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. **Oecologia**, v. 115, p. 312-319, 1998.
- MORENO, E.; MORENO, J.; LEÓN, A. The effect of nest size on stone-gathering behavior in the chinstrap penguin. **Polar Biology**, v. 22, p. 90-92, 1999.
- MÜLLER-SCHWARZE, C; MÜLLER-SCHWARZE, D. A survey of twenty-four rookeries of pygoscelid penguins in the Antarctic Peninsula region. In: STONEHOUSE, B. (Ed.). **The Biology of Penguins**. Baltimore: University Park Press, 1975, p. 309-319.
- PETRY, M. V. **Distribuição especial e aspectos populacionais da avifauna de Stinker Point – Ilha Elefante – Shetland do Sul – Antártica**. 1994. 234 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
- PIETZ, P. J. Feeding and nesting ecology of sympatric South Polar and Brown Skuas. **Auk**, v. 104, p. 617-627, 1987.
- PIUCO, R. C.; BRUMMELHAUS, J.; PETRY, M. V.; SANDER, M. Population fluctuation of *Pygoscelis papua* and *Pygoscelis antarctica*, Elephant Island, South Shetlands, Antarctica. In: VALENTIN, Y. Y.; DALTO, A. G.; LAVRADO, H. P. (Eds.). Annual Activity Report 2011 (INCT-APA). São Carlos: Editora Cubo, 2011, 210p.
- POLITO, M. J.; CLUCAS, G. V.; HART, T.; TRIVELPIECE, W. Z. A simplified method of determining the sex of *Pygoscelis* penguins using bill measurements. **Marine Ornithology**, v. 40, p. 89-94, 2012.
- ROEDER, A. D.; RITCHIE, P. A.; LAMBERT, D. M. New DNA markers for penguins. **Conservation Genetics**, v. 3, p. 341-344, 2002.
- SANDER, M.; BALBÃO, T. C.; COSTA, E. S.; SANTOS, C. R. dos; PETRY, M. V. Decline of the breeding population of *Pygoscelis antarctica* and *Pygoscelis adeliae* on Penguin Island, South Shetland, Antarctica. **Polar Biology**, v. 30, n. 5, p. 651-654, 2007a.

- SANDER, M.; BALBÃO, T. C.; POLITO, M. J.; COSTA, E. S.; CARNEIRO, A. P. B. Recent decrease in chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*) populations at two of Admiralty Bay's islets on King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v. 30, n. 5, p. 659-661, 2007b.
- SANDER, M.; CARNEIRO, A. P. B.; BALBÃO, T. C.; BAYS, S. R.; COSTA, E. S.; MASCARELLO, N. E.; OLIVA, T. D.; SANTOS, C. R. dos. Status and Trends of Antarctic Seabirds at Admiralty bay, King George Island. *Polarforschung*, v. 75, n. 2-3, p. 145-150, 2005.
- SCHLOSSER, J. A.; GARNER, T. W. J.; DUBACH, J. M.; MCELLIGOTT, A. C. Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p. 62-64, 2003.
- SIERAKOWSKI, K. Birds and Mammals in the region of SSSI n 8 in the season 1988/89 (South Shetlands, King George Island, Admiralty Bay). **Polish Polar Research**, v. 12, n. 1, p. 25-54, 1991.
- SILVA, M. P.; FAVERO, M.; CASAUX, R.; BARONI, A. The status of breeding birds at Harmony Point, Nelson Island, Antarctica in Summer 1995/96. **Marine Ornithology**, v. 26, p. 75-78, 1998.
- SHUFORD, W. D.; SPEAR, L. B. Surveys of breeding Chinstrap penguins in the South Shetland Islands, Antarctica. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 81, p. 19-30, 1988.
- STONEHOUSE, B. Introduction: The Spheniscidae. In: STONEHOUSE, B. (Ed.). **The Biology of Penguins**. Baltimore: University Park Press, 1975, p. 1-15.
- TRIVELPIECE, W. Z.; TRIVELPIECE, S. G.; GEUPEL, G. R.; KJELMYR, J.; VOLKMAN, N. J. Adélie and Chinstrap penguins: Their potential as monitors of the Southern Ocean Marine Ecosystem. In: KERRY, K. R.; HEMPEL, G. (Eds.). **Antarctic Ecosystems, Ecological Change and Conservation**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.
- TRIVELPIECE, W. Z.; BENGTSON, J. L.; TRIVELPIECE, S. G. Foraging Behavior of Gentoo and Chinstrap penguins as determined by new radiotelemetry techniques. **The Auk**, v. 103, p. 777-781, 1986.
- TRIVELPIECE, W. Z.; BUCKELEW, S.; REISS, C.; TRIVELPIECE, S. G. The winter distribution of chinstrap penguins from two breeding sites in the South Shetland Islands of Antarctica. **Polar Biology**, v. 30, p. 1231-1237, 2007.
- TRIVELPIECE, W. Z.; TRIVELPIECE, S. G. Courtship Period of Adélie, Gentoo and Chinstrap Penguins. In: DAVIS, L. S. e DARBY, J. T. (Eds.). **Penguin Biology**. San Diego, California: Academic Press, 1990, p. 113-127.

- TRIVELPIECE, W. Z.; TRIVELPIECE, S. G.; VOLKMAN, N. J. Ecological segregation of adelic, gentoo, and chinstrap penguins at King George Island, Antarctica. **Ecology**, v. 68, n. 2, p. 351-361, 1987.
- TRIVELPIECE, W. Z.; VOLKMAN, N. J. Nest-size competition between Adelie and Chinstrap penguins: an ecological interpretation. **The Auk**, v. 96, p. 675-681, 1979.
- VALENZUELA-GUERRA, P.; MORALES-MORAGA, D.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; VIANNA, J. A. Geographical variation of Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) and sex identification: using morphometric characters and molecular markers. **Polar Biology**, 2013. DOI 10.1007/s00300-013-1389-2.
- VOLKMAN, N. J.; PRESLER, P.; TRIVELPIECE, W. Z. Diets of Pygoscelid penguins at King George Island, Antarctica. **Condor**, v. 82, p. 373-378, 1980.
- WARREN, J. D.; SANTORA, J. A.; DEMER, D. A. Submesoescale distribution of Antarctic krill and its avian and pinniped predators before and after a near gale. **Marine Biology**, v. 156, p. 479-491, 2009.
- WILLIAMS, T. D. **The Penguins - Spheniscidae**. New York: Oxford University Press Inc., 1995.
- WOEHLER, E. J. **The distribution and abundance of Antarctic and Subantarctic penguins**. Cambridge: Scientific Committee on Antarctic Research, 1993.
- WOEHLER, E. J.; CROXALL, J. P. The status and trends of Antarctic and sub-Antarctic seabirds. **Marine Ornithology**, v. 25, p. 43-66, 1997.
- ZAVALAGA, C. B.; R. PAREDES. Sex determination of adult Humboldt penguins using morphometric characters. **Journal Field Ornithology**, v. 68, p. 102-112, 1997.
- YAÑEZ, J.; NUÑEZ, H.; VALENCIA, J.; SCHLATTER, R. Aumento de las poblaciones de pingüinos pigoscélidos en la isla Ardley, Shetland del Sur. **Serie Científica Instituto Antártico Chileno**, v. 31, p. 97-101, 1984.

2. CAPÍTULO 1

SEXUAL DIMORPHISM IN *Pygoscelis antarcticus*: MOLECULAR SEXING AND DISCRIMINANT FUNCTIONS IN THE SOUTH SHETLAND ISLANDS, ANTARCTICA¹



¹Artigo submetido para publicação no periódico *Antarctic Science*.

2.1. Abstract

Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarcticus*) show little sexual dimorphism, and sexing by direct observation can be difficult. Through molecular technique, we have identified male and female adults at Stinker Point, Elephant Island, Antarctica, in the 2010/2011 and 2011/2012 breeding seasons. After the assessment of sexual dimorphism using morphological characters, we found that males were 6 to 9.4% larger than females. From the most significant morphological measurements, we formulated a discriminant function that classified correctly 80.6% of the birds. In addition, we compared our data on bill length and depth with those in the literature in order to determine sexual dimorphism between different breeding locations and to test the performance of the discriminant function. There was no difference in the degree of sexual dimorphism between breeding locations; however, the discriminant function should be used with caution because some penguins may be misclassified. Where there is doubt in the field, it would be interesting to apply molecular sexing technique.

Keywords: CHD gene, Chinstrap penguin, genetic sexing, morphological sexing.

2.2. Introduction

Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarcticus*) are an Antarctic species that breeds during the austral summer in colonies on ice-free areas of coast, mainly on Sub-Antarctic islands and the Antarctic Peninsula. In the South Shetland Islands, the total breeding population was estimated to be 1,248,350 pairs (Harris 2006). As in other penguin species, they show little sex-linked size and plumage dimorphism, although males are usually bigger than females (Davis and Speirs 1990; Zavalaga and Paredes 1997; Bertellotti *et al.* 2002; Valenzuela-Guerra *et al.* 2013). Knowing the sex of individuals is essential for measuring several parameters of interest to the Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources (CCAMLR) and the Ecosystem Monitoring Program (CEMP). For Chinstrap penguins, the weight on arrival at the breeding colony and age-specific annual survival and recruitment are important population parameters that involve the knowledge of the penguin's sex (CCAMLR 2004). Moreover, sex identification is important in studies of life history, ecology, behavior, demography, conservation, and evolutionary changes.

Many studies determine the sex of penguins using morphometric measurements and discriminant functions (Amat *et al.* 1993; Zavalaga and Paredes 1997; Bertellotti *et al.* 2002; Hart *et al.* 2009; Poisbleau *et al.* 2010; Polito *et al.* 2012; Valenzuela-Guerra *et al.* 2013).

However, as is common for philopatric seabirds, many penguin species show considerable geographic variation in body size (Williams 1995), which makes it difficult to apply discriminant functions in locations other than where they were developed. Moreover, morphometric tests are potentially prone to a bias because males that are unusually small or late to develop may be scored as females (Hart *et al.* 2009). Immature penguins have smaller measurements than adults (Minguez *et al.* 1998), so immature males may be misclassified as adult females.

Other methods, such as observing mating behaviors are also used; however, they only involve a small window of the breeding season (Bertellotti *et al.* 2002). A potential alternative for accurately sexing penguins is a DNA-based method that uses polymerase chain reaction (PCR) to target CHD1-Z and CHD1-W genes using the primers P2/P8 (Griffiths and Tiwari 1993; Griffiths 2000). This tool has been broadly applied to birds (except ratite species) (Griffiths and Tiwari 1993; Griffiths 2000). The P2/P8 primer pair gives high concordance with the results of morphometric sexing, improving the certainty of sexing birds (Hart *et al.* 2009). Although genetic procedures have been applied to some species of penguins (Costantini *et al.* 2008; Hart *et al.* 2009; Poisbleau *et al.* 2010; Valenzuela-Guerra *et al.* 2013), these techniques have only been tested once in Chinstrap penguins (Polito *et al.* 2012). Another study also investigated the sexual dimorphism in Chinstrap penguins, but only through the use of a discriminant function (Amat *et al.* 1993). Moreover, the character of temporal attendance during incubation has also been used to determine sex in Chinstrap penguins and other penguins (Williams 1995). Nevertheless, previous studies showed that molecular sexing can complement methods based on morphology analysis in species with weak size dimorphism (Genovart *et al.* 2003; Jakubas and Wojczulanis 2007; Hart *et al.* 2009; Calabuig *et al.* 2011).

Our goal was investigate the sexual dimorphism from adult Chinstrap penguins through morphological characters and genetic sexing at Stinker Point, Elephant Island, South Shetlands Islands, Antarctica. Second, to obtain a discriminant equation to find diagnostic measurements for sex identification for adults of Chinstrap penguins. In addition, we compared the measures with those described by Polito *et al.* (2012) in order to evaluate the sexual dimorphism between breeding locations and to test the performance of the discriminant function.

2.3. Methods

Chinstrap penguin breeding adults were captured by hand near their nests at Stinker Point (Elephant Island) (61° 13' 20'' S; 55° 21' 36'' W), South Shetland Islands, Antarctic, in the 2010-2011 and 2011-2012 breeding seasons. We measured 35 birds (November 2011 and 2012, laying stage) and took blood samples from the foot of the penguin. Using calipers, we took four morphological measurements: bill (culmen) length (BL), bill depth (BD, taken through the center of the nostrils), and commissure width (CW, taken on the base of the bill where the mandibles join) to an accuracy of 0.1 mm. Flipper length (FL) (average of right and left flippers) we measured with a graduated rule. The same person conducted all measurements.

2.3.1. Molecular sexing

Genomic DNA was isolated from blood samples through a standard phenol/chloroform technique with digestion by proteinase K. Blood samples were refrigerated and stored in a sample bank at Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos. We amplified the CHD region of the sex chromosomes by PCR using the primers P2 and P8 (Griffiths and Tiwari 1993; Griffiths 2000). We then analyzed the PCR products by electrophoresis in 3% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV transillumination. Because females are the heterogametic sex, they have both CHD-Z and CHD-W genes, which differ in length and therefore appear as two bands on the gel. Males are homogametic and therefore show a single band (Griffiths and Tiwari 1993; Griffiths 2000).

2.3.2. Statistical analysis

Dimorphism between males and females was calculated for each measurement using the Storer's index (SI): $SI = (V_m - V_f) / ((V_m + V_f) * 0.5)$, where V_m corresponds to the mean value for males and V_f to the mean value for females of the variable considered (Storer 1966; Blondel *et al.* 2002; González-Solís 2004; Mariano-Jelicich *et al.* 2007). We compared morphological measurements between the sexes and breeding locations and interactions (Stinker Point – Elephant Island and Admiralty Bay – King George Island) using two-way analyses of variance (ANOVAs). We used Pearson correlations to examine the relationships among the morphometric characters.

We performed a stepwise discriminant function analysis to assign individuals to a sex based on morphological measurements (BD, BL, CW, FL) that had a significant influence on the assignment of males and females (F -test of Wilk's Lambda – test of equality of group means). Individuals with positive scores in discriminant function equations (D) were classified as males, while those with negative scores were classified as females. We used a cross-validation technique (leave-one-out test) to verify the accuracy of the discriminant function. This algorithm chooses the function that has the lowest percentage of misclassification. All data satisfied the Levene test of normality. The cut-off point was calculated as the weighted average of values of discriminant scores (i.e., average value of the mean of each sex; means were weighted by the number of males and females). Adults with discriminant scores greater than the cut-off point were classified as male and those with lower scores were classified as female. We applied the Ds from Amat *et al.* (1993) and Polito *et al.* (2012) to Stinker Point. This allowed us to quantify how transferable the discriminant equation was to other breeding sites.

All statistical analyses were performed using SPSS 18.0 (SPSS 2009). All tests were two-tailed, and differences were considered significant at $p \leq 0.05$ level and values are presented as mean \pm standard deviation (SD).

2.4. Results

2.4.1. Molecular sexing

Of 35 samples at Stinker Point, Elephant Island, 19 were male and 16 were female. PCR produced a single band of about 375 base pairs (bp) for males and two bands of about 375 and 390 bp for females.

2.4.2. Morphometric differences between sexes and breeding locations

The BD, BL, and CW differed significantly between sexes, with males being 6–9.4% larger than females, even though there was overlap in some morphological measurements (Table 1, Fig. 1). The Storer's index of CW, BD, and BL was 10%, 8%, and 6%, respectively (Table 1). Males also had a greater FL (1.5%), but this difference was not significant (Table 1). We found significant effects of breeding location and sex on BD; however, the interaction between location and sex was not significant. Therefore, there was no variation in this

measure between the sexes in breeding location (Table 1, Fig. 2). For BL, only significant difference was between males and females, but not between Admiralty Bay and Stinker Point (Table 1, Fig. 2). Pearson correlations among morphometric measurements are shown in Table 2, and were less than 0.50, indicating that there was no multicollinearity (low to moderate correlation) between variables.

2.4.3. Discriminant function analysis

For discriminant function analysis, bill depth (BD) and length (BL) and commissure width (CW) had the highest canonical correlations (0.629) and best classified breeding male and female adults at Stinker Point (Fig. 1). The accuracy of the classification of Chinstrap penguins was 80.6% and 80.6% after cross-validation. The discriminant function (equation) was $DF = 0.301BD + 0.207BL + 0.191CW - 22.349$, where all measurements are in mm. The result in the cut-off point for discriminant function was $D = -0.076$. Chinstrap penguins with a discriminant score greater than this were classified as male and those with a lower score were classified as female (Fig. 1 and 3). Misclassifications were, in general, when females were larger; these could be erroneously classified as males and small males could be erroneously classified as females (Fig. 1).

2.5. Discussion

For Chinstrap penguins, the results showed that males were significantly larger than females for three morphological measurements (BD, BL, and CW) (Table 1, Fig. 1). This shows that there is sexual dimorphism in this species, and it is possible to obtain information about sex in the field. Other authors have found similar results for seabirds (Amat *et al.* 1993; Serrano-Meneses and Székely 2006; Polito *et al.* 2012). In socially monogamous seabirds, sexual size dimorphism is correlated with sexually selected male displays, such that males are typically larger than females in those species in which the males display on the ground rather than in the air (Serrano-Meneses and Székely 2006). Other functional explanations that may account for male penguins being larger are intrasexual competition (males compete for access to females or for control of a resource) and intersexual competition (competition for food is reduced by males and females exploiting prey of different sizes) (Davis and Speirs 1990). Male Chinstrap penguins are more aggressive in nest defense towards potential stone thieves than females; males also collect more and larger stones for their nest maintenance (Moreno *et*

al. 1995). Nevertheless, when it comes to feeding, there is no difference in meal size between male and female Chinstrap penguins (León *et al.* 1998).

At Stinker Point, Elephant Island, BD, BL, and CW were the most reliable morphological measurements for assessing sex, and allowed us to sex birds with an accuracy of 80.6% (Fig. 1 and 3). BD and BL are also the most useful measurements for distinguishing between males and females and are often highly dimorphic in a variety of penguin species (Amat *et al.* 1993; Zavalaga and Paredes 1997; Poisbleau *et al.* 2010; Polito *et al.* 2012). Morphometric sexing is useful when there is limited time to manipulate birds, and can provide instant information in field studies (Zavalaga and Paredes 1997; Poisbleau *et al.* 2010).

Previous studies claim that the Chinstrap penguin does not display geographic variation (Marchant and Higgins 1990; Amat *et al.* 1993). In our study, this species exhibited morphological variation among breeding locations for one of our variables—bill depth (BD)—which differed significantly between Admiralty Bay and Stinker Point (Table 1). However, the interaction between location and sex was not significant for CW and, for BL, there was only a significant difference between males and females, but not between Admiralty Bay and Stinker Point (Table 1). Despite this, Chinstrap penguins on Elephant Island appeared to have a tendency to have larger morphometric measurements (Fig. 2). However, this trend should be taken very carefully, because we understand that there is a need for a larger sample. As highlighted by Zavalaga and Paredes (1997), the results of a discriminant function based on one breeding location are not necessarily widely applicable.

Several authors have found discriminant functions that classify adult penguins more accurately than ours: Amat *et al.* (1993) correctly identify sex of 94.6% of adult Chinstrap penguins on Deception Island and Polito *et al.* (2012) correctly classified 96.7% of the same penguin species on King George Island. Likewise, Poisbleau *et al.* (2010) correctly classified 96.2% of Rockhopper penguins, and Bertellotti *et al.* (2002) correctly classified 97% of Magellanic penguins. Our discriminant function classified 80.6% of birds correctly, but applying the discriminant function of Polito *et al.* (2012) and Amat *et al.* (1993) to our data correctly classified even fewer individuals (67.7% and 71% of birds, respectively). Moreover, both discriminant functions also gave a bias towards identifying true females as males. The reliability of sexing adults through biometry may therefore be questioned, especially when applying a discriminant function to a region other than where it was developed. Large females, or males that are unusually small or late to develop, may be miscategorized. Despite these limitations, our discriminant function may be useful in the field. It is a fast technique, practical and cost effective, especially if there is the need to sex a large number of adult

penguins at any stage of the breeding season. For individuals in which the value of D is very close to the cut-off point of $D = -0.076$ or where the researcher has doubts regarding the sexing, it is important to use another reliable technique such as molecular sexing. Like other authors (Bertellotti *et al.* 2002; Costantini *et al.* 2008; Hart *et al.* 2009; Polito *et al.* 2012), we also found molecular analysis to be quite an effective and reliable method for sexing Chinstrap penguins.

Through the use of molecular techniques to determine the sex of *P. antarcticus*, it was possible to confirm the usefulness of a discriminant function constructed from morphological measurements at Stinker Point, Elephant Islands. It is important to remember that discriminant function analyses should be used in the field with caution. Where there is doubt, they should be associated with molecular sexing, for which there are easy and inexpensive methods (Costantini *et al.* 2008; Quintana *et al.* 2008).

2.6. Acknowledgements

The Brazilian data were made possible through financial projects like INCT-APA (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais), (CNPq Process No. 574018/2008-5, FAPERJ E-26/170.023/2008) and were supported by Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação and Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SeCIRM). The authors are grateful to Roberta da Cruz Piuco (UNISINOS) who conducted all morphological measures in the field activities, and laboratory operators Igor Radamés de Oliveira and Guilherme Pinto Cauduro (UNISINOS) for the technical support provided.

2.7. Literature cited

- Amat, J. A., J. Viñuela and M. Ferrer. 1993. Sexing Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) by morphological measurements. *Colonial Waterbirds* 16: 213-215.
- Bertellotti, M., J. L. Tella, J. A. Godoy, G. Blanco, M. G. Forero, J. A. Donazar and O. Ceballos. 2002. Determining sex of Magellanic penguins using molecular procedures and discriminant functions. *Waterbirds* 25: 479-484.
- Blondel, J., P. Perret, M. C. Anstett and C. Thebaud. 2002. Evolution of sexual dimorphism in birds: test of hypotheses using blue tits in contrasted Mediterranean habitats. *Journal Evolution Biololy* 15: 440-450.

- Calabuig, C. P., A. J. Green, M. Ferrer, R. Muriel and H. Moreira. 2011. Sexual size dimorphism and sex determination by morphometric measurements in the Coscoroba Swan. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 469: 177-184.
- Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources (CCAMLR). 2004. Tasmania, Australia. <http://www.ccamlr.org>, accessed 26 July 2012.
- Costantini, V., A. C. Guaricci, P. Laricchiuta, F. Rausa and G. M. Lacalandra. 2008. DNA sexing in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Animal Reproduction Science* 105: 162-167.
- Davis, L. S. and E. A. Speirs. 1990. Mate choice in Penguins. Pages 377-397 *in* Penguin biology (Davis, L. S. and J. T. Darby, Eds.). Academic Press.
- Genovart, M., M. McMinn and D. Bowler. 2003. A discriminant function for predicting sex in the Balearic Shearwater. *Waterbirds* 26: 72-76.
- González-Solís, J. 2004. Sexual size dimorphism in northern giant petrels: ecological correlates and scaling. *Oikos* 105: 247-254.
- Griffiths, R. 2000. Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 14-26.
- Griffiths, R. and B. Tiwari. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 8324-8326.
- Harris, C. M. 2006. Wildlife awareness manual: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Island. Wildlife information publication No. 1. Prepared for the UK Foreign & Commonwealth Office and HMS Endurance. Environmental Research & Assessment.
- Hart, T., E. Fitzcharles, P. N. Trathan, T. Coulson and A. D. Rogers. 2009. Testing and improving the accuracy of discriminant function tests: a comparison between morphometric and molecular sexing in Macaroni penguins. *Waterbirds* 32: 437-443.
- Jakubas, D. and K. Wojczulanis. 2007. Predicting the sex of Dovekies by discriminant analysis. *Waterbirds* 30: 92-96.
- Léon, A. de, J. A. Fargallo and J. Moreno. 1998. Parental body size affects meal size in the Chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*). *Polar Biology* 19: 358-360.
- Marchant, S. and P. J. Higgins. 1990. Handbook of Australian, New Zealand and Antarctic Birds. Vol. 1, Part A. Oxford University Press.
- Mariano-Jelicich, R., E. Madrid and M. Favero. 2007. Sexual dimorphism and diet segregation in the Black Skimmer *Rynchops niger*. *Ardea* 95: 115-124.
- Minguez, E., J. A. Fargallo, A. de Leon, J. Moreno and E. Moreno. 1998. Age-related variations in bill size in chinstrap penguins. *Colonial Waterbirds* 21: 66-68.

- Moreno, J., J. Bustamante and J. Viñuela. 1995. Nest maintenance and Stone theft in the Chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*) 1. Sex roles and effects on fitness. *Polar Biology* 15: 533-540.
- Poisbleau, M., L. Demongin, H. J. van Noordwijk, I. J. Strange and P. Quillfeldt. 2010. Sexual dimorphism and use of morphological measurements to sex adults, immature and chicks of Rockhopper penguins. *Ardea* 98: 217-224.
- Polito, M. J., G. V. Clucas, T. Hart and W. Z. Trivelpiece. 2012. A simplified method of determining the sex of *Pygoscelis* penguins using bill measurements. *Marine Ornithology* 40: 89-94.
- Quintana, F., G. C. López and G. Somoza. 2008. A cheap and quick method for DNA-based sexing of birds. *Waterbirds* 31: 485-488.
- Serrano-Meneses, M. A. and T. Szélely. 2006. Sexual size dimorphism in seabirds: sexual selection, fecundity selection and differential niche-utilisation. *Oikos* 113: 385-394.
- SPSS. 2009. SPSS Base 10.0 User's Guide. SPSS Inc.
- Storer, R. W. 1966. Sexual dimorphism and food habits in three North American Accipiters. *Auk* 83: 423-436.
- Valenzuela-Guerra, P., D. Morales-Moraga, D. González-Acuña and J. A. Vianna. 2013. Geographical variation of Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) and sex identification: using morphometric characters and molecular markers. *Polar Biology*. DOI 10.1007/s00300-013-1389-2.
- Williams, T. D. 1995. *The penguins – Spheniscidae*. Oxford University Press Inc.
- Zavalaga, C. B. and R. Paredes. 1997. Sex determination of adult Humboldt penguins using morphometric characters. *Journal Field Ornithology* 68: 102-112.

Table 1. Morphological measurements for adult male and female Chinstrap penguins captured at Stinker Point (Elephant Island). We compared sexes and breeding locations (Admiralty Bay, King George Island – Polito *et al.* (2012) and Stinker Point, Elephant Island) using a two-way analysis of variance (ANOVA). SI: Storer's index; SD: standard deviation.

Measurements (mm)	(n) Mean \pm SD (range) - Elephant Island			SI	<i>F</i> -test of Wilk's λ	Two-way ANOVA		
	Female	Male				Breeding locations	Sex	Interaction
Bill depth	(14) 20.1 \pm 1.4 (17.0-22.5)	(17) 21.8 \pm 2.1 (19.3-27.2)		0.08	$\lambda=0.80$ $F_{1,29}=7.080$ P=0.013	$F_{1,57}=29.431$ P=0.000	$F_{1,57}=42.264$ P=0.000	$F_{1,57}=0.158$ P=0.775
Bill length	(16) 46.9 \pm 3.0 (42.0-50.5)	(19) 49.9 \pm 2.3 (47.0-54.0)		0.06	$\lambda=0.74$ $F_{1,33}=11.723$ P=0.002	$F_{1,61}=0.926$ P=0.340	$F_{1,61}=43.436$ P=0.000	$F_{1,61}=3.081$ P=0.084
Commissure width	(16) 29.8 \pm 2.9 (26.3-36.0)	(19) 32.9 \pm 3.3 (27.7-40.4)		0.10	$\lambda=0.80$ $F_{1,33}=8.249$ P=0.007			
Flipper length	(16) 191.1 \pm 6.3 (182.0-204.0)	(19) 194.1 \pm 5.2 (185.0-202.5)		0.02	$\lambda=0.93$ $F_{1,33}=2.330$ P=0.136			

Table 2. Pearson correlation coefficients (r) among morphometric measurements (n=31) for Chinstrap penguins from Stinker Point, Elephant Island.

Pearson correlation coefficient (r)			
	Bill depth	Bill length	Commissure width
Bill length	0.397		
Commissure width	0.066*	0.238	
Flipper length	0.187	0.430*	-0.101

Significance level: * $P < 0.05$

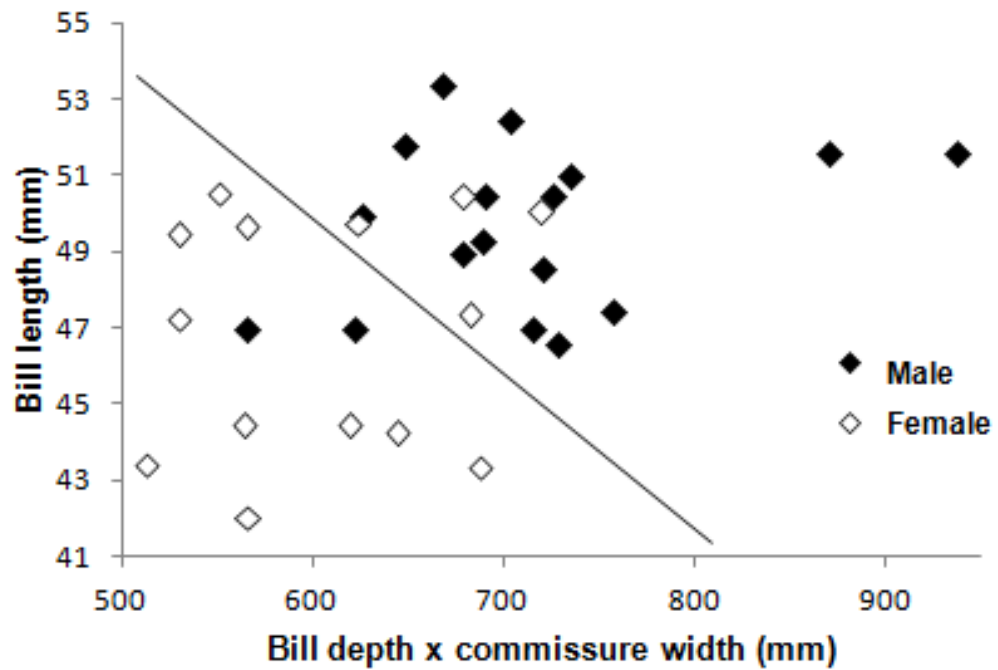


Figure 1. Discriminant function separating male and female Chinstrap penguins using bill length (BL), bill depth (BD), and commissure width (CW) at Stinker Point, Elephant Island. The solid line represents the statistical boundary between males and females, derived from the discriminant function. N = 17 males and 14 females. True sexes were determined by a molecular technique.

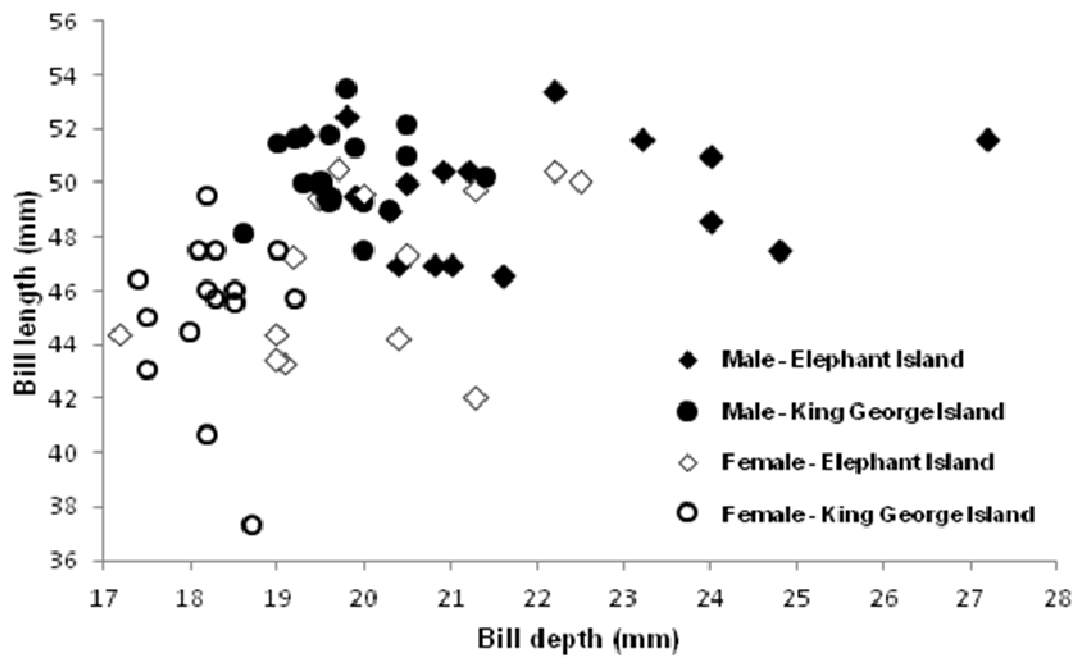


Figure 2. Bill length and bill depth for breeding adult Chinstrap penguins at Admiralty Bay, King George Island (Polito *et al.* 2012) and Stinker Point, Elephant Island, Antarctica.

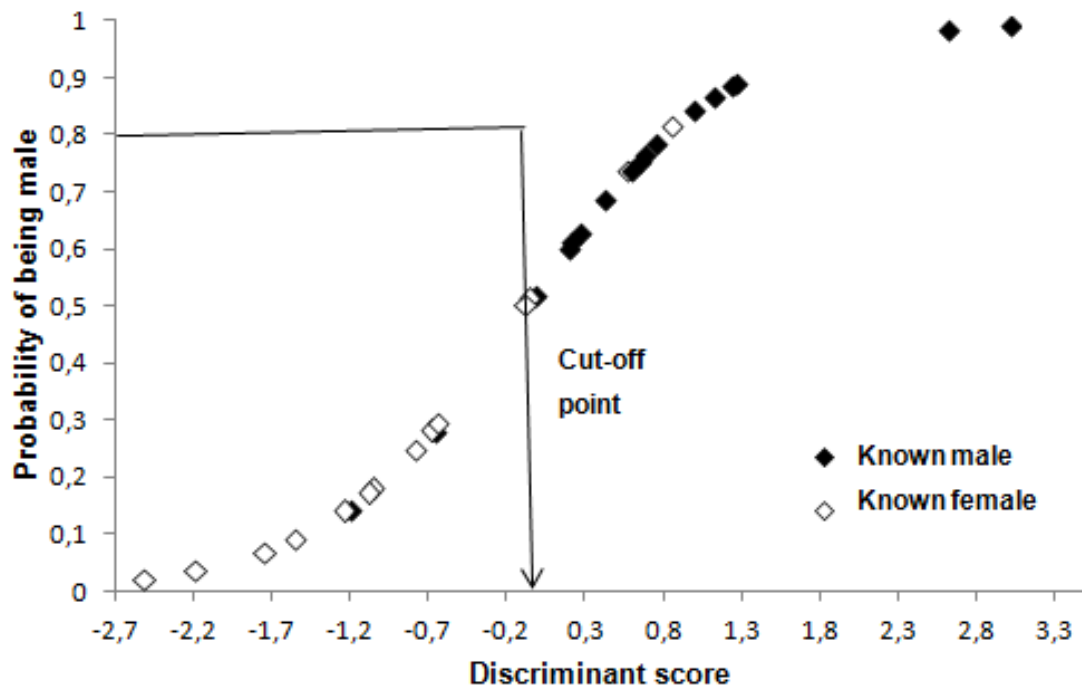


Figure 3. Probability of a Chinstrap penguin being male in relation to discriminant score at Stinker Point, Elephant Island, Antarctica.

3. CAPÍTULO 2

EVIDÊNCIAS DE EXPANSÃO POPULACIONAL NA HISTÓRIA EVOLUTIVA DO PINGUIM-ANTÁRTICO, *Pygoscelis antarcticus*, ILHAS SHETLAND DO SUL, ANTÁRTICA



3.1. Resumo

O pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*) possui um comportamento filopátrico e suas colônias de reprodução estão distribuídas principalmente em arquipélagos na região da Península Antártica. O objetivo do estudo é caracterizar a estruturação espacial da variabilidade genética populacional entre colônias de reprodução nas Ilhas Rei George e Elefante (Shetlands do Sul, Antártica), através do uso da região controle do DNA mitocondrial, testando a hipótese de que não existe fluxo gênico entre as áreas de reprodução. Foram encontrados 38 haplótipos para os 61 indivíduos analisados, sendo apenas dois compartilhados nas três colônias e todos os demais são exclusivos. Os valores de F_{ST} e da AMOVA revelam que a divergência entre as populações é baixa e que a maioria da variação genética (98,3%) ocorreu dentro das populações. Isso poderia ser justificado por um alto fluxo gênico entre as populações, mas não corrobora com o comportamento filopátrico da espécie. Os testes de neutralidade e de expansão demográfica apontam para uma evolução neutra e possibilidade de expansão, que ocorreu por volta de 2,5 milhões de anos atrás e desde então, o tamanho efetivo populacional manteve-se constante. Os resultados ressaltam a ocorrência de uma expansão populacional a partir de uma população geneticamente homogênea e a manutenção do tamanho efetivo em longo período de tempo pode ter amplamente contribuído para a falta de estruturação genética entre as colônias de pinguim-antártico recentes.

Palavras chave: Baía do Almirantado; DNA mitocondrial; filopatria natal; genética de populações; marcador molecular; Pinguim-antártico.

3.2. Introdução

O pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*: Spheniscidae) é uma espécie endêmica do Continente Antártico e tem distribuição circumpolar. Sua abundância é estimada em oito milhões de indivíduos distribuídos principalmente nas Ilhas Sandwich do Sul, Orkney do Sul e Shetland do Sul, e também na Península Antártica (Trivelpiece e Trivelpiece 1990; Harris 2006; BirdLife International 2013). Os indivíduos adultos possuem cerca 68-75 cm de altura e 4,1-6,2 kg de massa média (Williams 1995). O seu principal alimento é *Euphasia superba* (krill-antártico), possuindo preferência por indivíduos adultos, com 45 mm (Croxall 1987; Trivelpiece *et al.* 1990; Warren *et al.* 2009).

O ciclo reprodutivo é distinto, envolvendo a primavera e verão austral (setembro a março) com o retorno às colônias de reprodução, incubação de um a dois ovos, fases de

guarda e creche dos filhotes e a saída de adultos e jovens antes do inverno (Conroy *et al.* 1975; Trivelpiece e Volkman 1979; Jablònski 1986; Williams 1995; Lumpe e Weidinger 2000). Durante o inverno, o pinguim-antártico permanece em alto mar, próximo à região de convergência antártica, mas não associado ao gelo marinho (Trivelpiece *et al.* 1990; Fraser *et al.* 1992; Trivelpiece *et al.* 2007). Muito frequentemente, ocorre uma sobreposição de áreas de reprodução com os outros pigoscelídeos: *P. adeliae* e *P. papua*, formando colônias mistas em áreas livres de gelo (Stonehouse 1975; Jablònski 1980; Trivelpiece e Trivelpiece 1990; Warren *et al.* 2009).

É uma espécie filopátrica, de forma que a maioria dos indivíduos retorna para o mesmo local de reprodução em sucessivas estações reprodutivas (Trivelpiece e Trivelpiece 1990; Woehler 1993; Ainley *et al.* 1995; Williams 1995). Apesar de serem realizadas extensas viagens ao mar para alimentação durante o período reprodutivo (Trivelpiece *et al.* 1987; Miller *et al.* 2010; Valls 2013), a filopatria sugere que haja pouco movimento de pinguins entre as colônias de reprodução, e por isso, grandes distâncias entre as colônias podem diminuir o fluxo gênico (Roeder *et al.* 2001). Isso foi inferido em estudo de monitoramento do pinguim-antártico durante 30 anos na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Shetlands do Sul, no qual foi observado que são poucos os indivíduos que se deslocam de suas áreas de reprodução para outras colônias próximas, distantes até 3 km (Hinke *et al.* 2007). A monogamia é outra característica do pinguim-antártico e está relacionada com o esforço do cuidado biparental dos adultos reprodutores para a criação dos filhotes (Williams 1995; Moreno *et al.* 2000).

Apesar do pinguim-antártico ser considerada uma espécie de menor preocupação em relação ao seu status de conservação (IUCN 2013), a distribuição e abundância de pares reprodutores têm mostrado alternância de aumento e/ou declínio em suas áreas de reprodução ao longo dos últimos 40 anos. Essas flutuações populacionais têm sido atribuídas a diversas condições como disponibilidade de recurso alimentar, variação nas áreas livres de gelo necessárias para a reprodução, mudanças climáticas e aumento do turismo e atividades pesqueiras (Conroy 1975; Jablònski 1984; Woehler e Croxall 1997; Croxal *et al.* 2002; Sander *et al.* 2005; Hinke *et al.* 2007; Sander *et al.* 2007; Piuco *et al.* 2011; Trivelpiece *et al.* 2011; Lynch *et al.* 2012). A variabilidade genética pode ser afetada com essas flutuações e sabe-se que em populações naturais menores há maior perda de variabilidade do que em populações maiores, ainda mais quando se considera uma espécie filopátrica (Frankham 1995). O sucesso reprodutivo, o tamanho populacional, a taxa de endogamia, desvio da razão sexual e sobrevivência de jovens e adultos podem influenciar o tamanho efetivo de uma

população, pois reflete na quantidade de indivíduos reprodutores que retornarão às colônias natais para a reprodução (Frankham 1995; Carlini *et al.* 2009).

Considerando a vasta extensão do Continente Antártico, a distribuição das áreas de reprodução e a característica filopátrica, sugerir a existência de uma diferenciação genética considerável entre essas áreas para o pinguim-antártico é uma hipótese plausível. No entanto, análises genéticas de duas populações em declínio de abundância para essa espécie nas Ilhas Rei George e Pinguim mostraram acasalamentos aleatórios, não rejeitando a panmixia (Korczak-Abshire *et al.* 2012). Para outras espécies de pinguins foram encontrados resultados genéticos variados com interpretações relacionadas à biologia e ecologia das populações (Roeder *et al.* 2001; Jouventin *et al.* 2006; Nims *et al.* 2008; Overeem *et al.* 2008; Bouzat *et al.* 2009; Schlosser *et al.* 2009; Dinechin *et al.* 2012). Em *P. adeliae*, por exemplo, também foi encontrada uma falta de heterogeneidade, mas possivelmente causada pela formação de colônias de reprodução em novas áreas livres de gelo geradas depois do último período glacial, quando até então as áreas de reprodução da espécie eram restritas às ilhas oceânicas e limitados pontos do continente (Roeder *et al.* 2001). Por sua vez, a dinâmica demográfica de *Spheniscus magellanicus*, na Patagônia e Ilhas Malvinas, foi enquadrada sob o modelo de metapopulações, que é baseado no conceito de que as espécies são espacialmente estruturadas em população reprodutora local que habitam áreas com diferente produtividade e que estão interligadas por migração (Bouzat *et al.* 2009).

Para este estudo, o objetivo é caracterizar a distribuição espacial da variabilidade genética populacional entre colônias de reprodução de *Pygoscelis antarcticus* nas Ilhas Rei George e Elefante (Shetlands do Sul, Antártica), testando a hipótese de estruturação em decorrência da ausência de fluxo gênico entre as áreas de reprodução. Para tanto, utilizou-se as frequências dos haplótipos de um segmento da região controladora do DNA mitocondrial entre as duas ilhas. O uso de marcador molecular para avaliar o movimento de indivíduos entre áreas de reprodução pode ser mais eficiente do que o uso do anilhamento tradicional, por ser menos intrusivo e atingir maior quantidade de indivíduos reprodutivos de diferentes locais (Roeder *et al.* 2001; Jackson e Wilson 2002). Apesar das vantagens do uso de ferramentas moleculares e a observação de várias características relacionadas à variabilidade genética em espécies de pinguins, este é o primeiro estudo da variação genética entre áreas de reprodução para *P. antarcticus* utilizando marcador mitocondrial.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Amostragem

As coletas de 61 amostras biológicas (sangue e penas) foram realizadas durante a primavera polar (outubro a dezembro) em 2010 e 2011, nas Ilhas Rei George (62°05'S; 58°23'W) e Elefante (61°13'20,5"S; 55°21'36"W), Ilhas Shetland do Sul, Antártica (Figura 1), distantes entre si 153 km (Harris *et al.* 2011) (Tabela 1).

As amostras de sangue (~0,5 mL cada amostra) foram coletadas na veia da aleta ou da pata, acondicionada com álcool etílico 100%, refrigerada e estocada no banco de amostras biológicas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Vale do Rio dos Sinos. A coleta de penas foi realizada com a extração de ~10 penas do peito do pinguim e armazenadas em envelope plástico e acondicionadas em temperatura ambiente até a chegada ao Laboratório de Biologia Molecular, onde foram processadas e analisadas.

3.3.2. Extração de DNA e PCR

O DNA genômico total das amostras de sangue foram extraído pelo método orgânico fenol-clorofórmio e proteína K, conforme descrito Sambrook *et al.* (1989) e para as amostras de penas a extração de DNA foi de acordo com Costantini *et al.* (2008). Para amplificar aproximadamente 600 pb da região D-loop do DNA mitocondrial foram utilizados os *primers* “C L-tRNA^{Glu}” (5'-CCCGCTTGGCTTYTCTCCAAGGTC-3') e “D H-Dbox” (5'-CTGACATAGGAACCAGAGGCGC-3') (Ritchie e Lambert 2000; Roeder *et al.* 2002). As condições para amplificação foram: para um volume de 25 µL foi utilizado 8,4 µL de água ultra pura, 2,5 µL de Tampão, 1,0 mM de MgCl₂, 1,0 µL de cada *primer*, 0,5 µL de DNTPs, 0,1 µL de Taq Polimerase e 1 µL de DNA, com o seguinte programa para amplificação por PCR: 94 °C por 60 s; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 50°C por 20 s e extensão a 72 °C por 40 s; extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados pelo método enzimático EXO-SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase - Exonuclease I - Fermentas, Lithuania) e sequenciados pela *Advancing through Genomics MACROGEN* (Coréia do Sul). Para o sequenciamento utilizou-se apenas do *primer* D H-Dbox em no mínimo dois PCRs independentes.

3.3.3. Análise dos dados

A qualidade do sequenciamento do DNA mitocondrial foi verificada no *software Chromas 2.33* (<http://www.technelysium.com.au>), a identidade das sequências utilizando-se o BlastN (Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide) (*NCBI site*), alinhamento no *software ClustalX* (Thompson *et al.* 1997), e quando necessário corrigidas no *Bioedit 5.0.9* (Hall, 1999) a fim de se obter uma sequência consenso para cada um dos indivíduos.

No *DnaSP 4.5* (Rozas *et al.* 2003), foram analisadas as frequências, a distribuição e a coalescência dos haplótipos. As estimativas de polimorfismo do DNA, como o número de haplótipos, a diversidade haplotípica (*Hd*) (probabilidade de dois haplótipos aleatórios sejam diferentes em uma amostra) e a diversidade nucleotídica (π) (média da diversidade nucleotídica por sítio entre duas frequências), e *S* que é o número de sítios polimórficos foram determinadas através dos programas *DnaSP 4.5* (Rozas *et al.* 2003).

Com o *Arlequin 3.1* (Excoffier *et al.* 2005) foi estimado: o grau de separação genética entre populações, utilizando-se o índice de fixação (F_{ST}); as estimativas de subdivisões populacionais; a Análise de Variância Molecular (AMOVA); a hipótese de distribuição aleatória dos indivíduos entre pares de populações; os testes de neutralidade baseados em polimorfismos de sequências e a *Mismatch Distribution*.

Para estimar se a variabilidade observada desvia da variabilidade esperada sob o modelo de neutralidade foram realizados os testes de *D* de Tajima (Tajima 1989), *n* (diferença entre o número de sítios segregantes ou polimórficos e a média do número de diferenças par a par) e *Fu* e *Li* (D^* e F^*) (Fu e Li 1993). Ambos testam a hipótese de todas as mutações serem neutras e foram calculados através do programa *Arlequin* (Excoffier *et al.* 2005).

Para inferir as relações entre os haplótipos, foram construídas redes haplotípicas no programa *Network 4.5.0.2* (Bandelt *et al.* 1999). Inicialmente utilizou-se o *Reduced Median Network*, para inferir quais as mutações com recorrência mais elevadas testou-se um *reduced threshold* igual 2. Em decorrência da manutenção de uma rede com elevada reticulação de difícil visualização, optou-se por um *reduced threshold* igual 1 a qual foi a base para a construção da rede haplotípica.

A fim de investigar a história demográfica de *P. antarcticus* foi utilizado o *Bayesian Skyline Plot* (BSP). O método que estima a variação do tamanho efetivo da população ao longo do tempo sem a necessidade de especificação, *a priori*, de um modelo demográfico (ex. tamanho constante ou crescimento exponencial) (Drummond *et al.* 2005). O BSP foi construído no programa *BEAST 1.5.4* (Drummond *et al.* 2005). Foi utilizado o modelo de

substituição SYM+I+G, selecionado através do Modeltest 3.06 usando o AIC (*Akaike Information Criterion*) (Posada e Crandall 1998), e as taxas de mutação foram às descritas por Lambert *et al.* (2002). Foi assumido um relógio molecular estrito, dada a igualdade das taxas evolutivas entre as sequências (Tajima 1993), testadas no *software* Mega 5 (Tamura *et al.* 2011), com as datas médias de divergência e valores de desvio padrão para refletirem as mediana de 95% de intervalo de credibilidade (IC) ao inferir mudanças demográficas usando BSP.

Para o conjunto de sequências de 438 pb correspondente a um fragmento da região D-Loop, foram empregadas 60 milhões de interações de MCMC (Markov Chain Monte Carlo) para ESS (*Effective Sample Size*) maior ou igual a 200. Amostras foram realizadas a cada 1000 interações, sendo 10% das amostras iniciais descartadas como *burn-in*. O gráfico BSP obtido a partir das interações foi gerado com o programa Tracer 1.5 (Drummond *et al.* 2005).

3.4. Resultados

Foram recuperados do sequenciamento e analisados 438 pb da região controladora do DNA mitocondrial de 34 indivíduos de *Pygoscelis antarcticus* na Ilha Rei George (Baía do Almirantado: Chabrier Rock) e 10 indivíduos da Colônia 1 e 17 para a Colônia 2 de Stinker Point, na Ilha Elefante (Tabela 2). A composição média de nucleotídeos foi de 24% para Timina, 23,3% para Citosina, 30,5% para Adenina e 22,3% para Guanina.

Foram encontrados 38 haplótipos nas três populações analisadas (Tabela 2, Anexo 2). Somente dois haplótipos (H6 e H7) são compartilhados por todas as populações, os demais, são exclusivos (Figura 1). O haplótipo H6 foi o mais frequente, representando 14,8% do total de haplótipos observados, e o haplótipo H7 representou 9,8% das observações (Figura 1). A quantidade de haplótipos por área de reprodução varia entre nove e 18, com uma diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) observada entre $Hd=0,938$ a $0,985$ e $\pi=0,0063$ a $0,0078$, respectivamente (Tabela 2).

As comparações dos F_{ST} par-a-par entre os três grupos populacionais demonstraram não haver diferenças genéticas significativas entre as mesmas (Tabela 3). A Análise da Variância Molecular (AMOVA) demonstrou que não há estruturação destas populações e os maiores percentuais de variabilidade genética (98,3%) estariam dentro de cada uma das populações ($F_{\phi_{ST}} = 0,01705$; $P < 0,0685$). A variância molecular é ínfima quando são consideradas as populações das comparações entre as Ilhas Rei George e Elefante com somente 0,82% da variação (Tabela 4).

A relação entre os 38 haplótipos de D-Loop está representada pela rede na Figura 2. Os círculos representam cada um dos haplótipos cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos portando tal característica. Os haplótipos H6 e H7 compartilhados pelos três grupos, como referidos anteriormente, são provavelmente ancestrais dos demais segundo a configuração da rede resultante.

Com a finalidade de detecção de possíveis eventos demográficos na história evolutiva de *P. antarcticus* na região, foram aplicados os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997), além das análises de *Mismatch Distribution* e *Bayesian Skyline Plot* (BSP). Os testes de neutralidade apresentaram valores negativos e significativos para quase todas as amostras (Tabela 5) apontando para a possibilidade de expansão populacional. Da mesma forma, o teste de expansão demográfica (*Mismatch distribution*) não rejeita a hipótese inicial de expansão das populações (Tabela 5). Isso é corroborado pela Figura 3, onde as diferenças par a par observadas ajustam-se às diferenças esperadas para todas as colônias de reprodução, ou seja, as curvas unimodais da distribuição das diferenças suportam a hipótese de expansão populacional de *P. antarcticus*. A Figura 4 (*Bayesian Skyline Plots*) mostra que essa expansão populacional ocorreu há mais de dois milhões de anos atrás e no último um milhão de anos o tamanho efetivo populacional manteve-se constante.

3.5. Discussão

A região da Península Antártica e do Arquipélago das Shetlands do Sul possui uma vasta extensão de áreas livres de gelo durante o verão austral, de forma a possibilitar ampla distribuição das colônias de reprodução do *P. antarcticus*. Incluindo a característica filopátrica da espécie, é razoável sugerir que poderia haver uma considerável diferenciação genética entre as colônias, principalmente as situadas em ilhas mais distantes. No entanto, os resultados do F_{ST} e Φ_{ST} para este estudo (Tabela 3 e 4) demonstraram que as divergências entre as populações são baixas e apontou que quase toda a variância molecular ocorre dentro dos grupos populacionais. Korczak-Abshire *et al.* (2012), utilizando-se do marcador AFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados), detectaram fraca estruturação populacional entre as colônias de reprodução da Baía do Almirantado (Ilha Rei George) e Ilha Pinguim e apontaram para a ocorrência de deriva genética compensada com grande fluxo gênico para os resultados encontrados. Também, apoiam a hipótese da redução do comportamento filopátrico do pinguim-antártico.

O pinguim-antártico parece estar buscando por outras áreas livres de gelo favoráveis para reprodução por diversos motivos como a competição intra-específica por local de construção do ninho, a retração das geleiras ou mesmo a disponibilidade de alimento (Jablònski 1984; Lynch *et al.* 2012), o que poderia influenciar na sua caracterização como espécie filopátrica (Ainley *et al.* 1995; Macdonald *et al.* 2002) e poderia suportar a existência de fluxo gênico que resultaria na falta de estruturação. Considerando os valores de F_{ST} , Korczak-Abshire *et al.* (2012) estimaram em 2,997 migrantes por geração entre duas colônias com 32 km de distância. No entanto, estudo de monitoramento contínuo durante 30 anos na Baía do Almirantado (Ilha Rei George) revela uma taxa de emigração menor do que 1% para as três espécies de pigoscelídeos para áreas adjacentes até 3 km de distância e não há evidências de deslocamentos para colônias mais distantes na Ilha Rei George durante a época de reprodução (Hinke *et al.* 2007).

Todavia, a falta de estruturação genética não indica necessariamente um grande nível de dispersão de indivíduos entre as colônias de reprodução. Isso é bem discutido para *P. adeliae* que também apresenta resultados não significativos para a heterogeneidade genética para 13 colônias de reprodução distribuídas ao redor do Continente Antártico e as causas apontadas estão relacionadas à história das populações dessa espécie e não diretamente pela existência de fluxo gênico (Roeder *et al.* 2001).

Há outras espécies de pinguins que também exibem um nível de similaridade genética. *Spheniscus mendiculus*, Arquipélago de Galápagos, é sugerida como uma população panmítica, por apresentar baixo nível de diversidade genética populacional e alto nível de fluxo gênico entre as colônias de reprodução (Nims *et al.* 2008). Apesar de longas distâncias e diferenças ecológicas e morfológicas em *Eudyptula minor*, no sudeste da Austrália, foi encontrada extensa homogeneidade genética entre as colônias (Overeem *et al.* 2008). Os autores sugerem uma grande contribuição de aves imigrantes devido à observação de rápido aumento populacional nas áreas de reprodução ou uma expansão populacional histórica.

Por outro lado, para outras espécies de pinguins, marcadores moleculares mitocondriais e/ou nucleares apontam para a estruturação genética das populações. Para *Spheniscus magellanicus*, na Patagônia e Ilhas Malvinas, é aplicado o modelo de metapopulação (Bouzat *et al.* 2009). Para *Pygoscelis papua* e *Eudyptes moseleyi* a heterogeneidade genética associada a diferenças ecológicas e biológicas nas espécies permitiu a formação de clados distintos (Jouventin *et al.* 2006; Dinechin *et al.* 2012).

A rede haplotípica deste estudo é resultante da avaliação dos 38 haplótipos identificados para 61 indivíduos (Figura 2). A configuração estrelada, especialmente a partir

dos haplótipos H6 e H7, os mais antigos, com ramificações partindo destes haplótipos mais frequentes em direção a haplótipos únicos (exclusivos) é um indicativo de expansão populacional. Portanto, a falta de estruturação populacional apresentada pelo F_{ST} e pela AMOVA possivelmente não deva ser em decorrência de fluxo gênico das fêmeas e sim de uma pequena quantidade de características haplotípicas após uma redução populacional. Ou seja, em um primeiro momento, parece ter ocorrido uma redução populacional muito grande e uma expansão de poucos haplótipos e, desta forma resulta nesta suposta falta de estruturação genética para o pinguim-antártico.

A hipótese efeito fundados seguido de expansão populacional para o pinguim-antártico é confirmada e sustentada com os resultados dos testes de neutralidade D de Tajima e teste F_s de Fu que apresentaram valores negativos e significativos, e também pelos valores dos desvios da soma dos quadrados (SSD) do *Mismatch distribution* e as curvas unimodais para as distribuições das diferenças par a par para cada população. Korczak-Abshire *et al.* (2012) descartaram a hipótese de expansão e explicam que declínios populacionais observados nas últimas décadas nas Ilhas Rei George e Pinguim poderiam ser um início ao processo de mudanças demográficas, além de ter efeitos sobre a estrutura genética do pinguim-antártico. Contudo, o que registramos neste trabalho é uma expansão histórica que ocorreu com a espécie após uma intensa glaciação e, bem como Korczak-Abshire *et al.* (2012), descartamos reduções nos tamanhos efetivos das populações em um tempo recente.

Através do resultado do Bayesian Skyline Plots foi demonstrado que o início da expansão populacional para o pinguim-antártico ocorreu há aproximadamente dois milhões de anos, e desde então, o tamanho efetivo populacional manteve-se constante (Figura 4). Anterior a essa data houve uma glaciação, um intenso período de resfriamento do planeta, no período de transição entre o Plioceno e Pleistoceno há 2,5 milhões de anos. A espécie do pinguim-antártico teve sua origem por volta de 14,1 milhões de anos, junto a um cenário de transição climática na metade do Mioceno, quando houve grande aumento do volume de gelo na Antártica e a intensificação da corrente circumpolar antártica (Baker *et al.* 2006). Assim como os pinguins *Aptenodytes* e demais *Pygoscelis*, a espécie permaneceu adaptada às condições mais frias, embora tivessem se refugiado do continente nas glaciações máximas durante o Pleistoceno, quando as áreas de reprodução seriam inacessíveis (Baker *et al.* 2006). Todo o Pleistoceno, com várias épocas de glaciações, é visto como um período de diferenciação das populações de aves ativas, levando a muitas especiações (Avice e Walker 1998). Neste cenário, com a utilização de um segmento da região controladora do mtDNA,

apontamos pela primeira vez que as atuais populações do pinguim-antártico podem ser derivadas de um grupo geneticamente homogênea que colonizou as ilhas antárticas.

A maior concentração populacional da espécie está nas Ilhas Sandwich do Sul, e acredita-se que este seja o seu maior centro de origem (Kooyman 2002; Trivelpiece *et al.* 2007). A expansão populacional pode ter ocorrido a partir de uma população geneticamente homogênea oriunda desse arquipélago, refletindo um efeito fundador. Além disso, houve a expansão de colônias de reprodução da espécie para novas áreas livres de gelo, principalmente em meados do século passado (Jablònski 1984; Poncet e Poncet 1987; Lynch *et al.* 2012). E por isso, é possível haver um centro de origem mais recente nas Ilhas Shetland do Sul (Trivelpiece *et al.* 2007). E além do mais, esses autores mostram rotas migratórias de inverno com o deslocamento de indivíduos adultos reprodutores da Ilha Rei George para a região das Ilhas Sandwich do Sul.

Dessa forma, a expansão populacional a partir de uma população geneticamente homogênea em longo período de tempo pode ter amplamente contribuído para a falta de estruturação genética entre as recentes colônias de pinguim-antártico. Mesmo com um comportamento filopátrico, a baixa taxa de circulação de indivíduos reprodutores entre diferentes colônias de reprodução pode estar sendo subestimada, devido ao aumento da dispersão para novas áreas livres de gelo. Cabe ressaltar também que, os aparentes declínios populacionais para a espécie descritos na literatura são parte da flutuação do tamanho populacional causada por um conjunto de fatores relacionados entre si, pois os resultados aqui apontam que o tamanho populacional efetivo manteve-se constante desde o início de sua expansão demográfica. São necessários mais esforços a fim de investigar a homogeneidade genética das colônias do pinguim-antártico, especialmente em seus centros de origem e distribuição, através do uso de marcadores moleculares.

3.6. Agradecimentos

A coleta dos dados foi possível por meio de projeto financiado pelo INCT-APA (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais), (CNPq Processo No. 574018/2008-5, FAPERJ E-26/170.023/2008) e pelo suporte do Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e da Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SeCIRM). A CAPES pela bolsa de doutorado. Agradecemos também a Igor Radamés de Oliveira e Guilherme Pinto Cauduro (UNISINOS) pelo suporte durante as atividades técnicas de laboratório.

3.7. Referências

- Ainley, D.G.; N. Nur; E.J. Woehler. 1995. Factors affecting the distribution and size of pygoscelid penguin colonies in the Antarctic. *The Auk* 112(1): 171-182.
- Avise, J.C.; D. Walker. 1998. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceeding of the Royal Society B* 265: 457-463.
- Baker, A.J.; S.L. Pereira; O.P. Haddrath; K. Edge. 2006. Multiple gene evidence for expansion of extant penguins out of Antarctica due to global cooling. *Proceeding of the Royal Society B* 273: 11-17.
- Bandelt, H.J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology Evolution* 16(1): 37-48.
- Bouzat, J.; B.G. Walker; P.D. Boersma. 2009. Regional genetic structure in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) suggests metapopulation dynamics. *The Auk* 126(2): 326-334.
- BirdLife International (2013) Species factsheet: *Pygoscelis antarcticus*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 08/07/2013.
- Carlini, A.R.; N.R. Coria; M.M. Santos; M.M. Libertelli; G. Donini. 2009. Breeding success and population trends in Adélie penguins in areas with low and high levels of human disturbance. *Polar Biology* 30: 917-924.
- Conroy, J.W.H. 1975. Recent increases in penguin populations in Antarctica and the Subantarctic. P.321-336. In: Stonehouse, B. (ed.). *The Biology of penguins*. University Park Press. 555p.
- Conroy, J.W.H.; O.H.S. Darling; H.G. Smith. 1975. The annual cycle of the Chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* on Signy Island, South Orkney Islands. P.353-362. In: Stonehouse, B. (ed.). *The Biology of penguins*. University Park Press, Baltimore, 555p.
- Costantini, V.; A.C. Guaricci; P. Laricchiuta; F. Rausa; G.M. Lacalandra. 2008. DNA sexing in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Animal Reproduction Science* 105:162-167.
- Croxall, J.P. 1987. *Seabirds: feeding biology and role in marine ecosystems*. Cambridge University Press, New York, 408p.
- Croxall, J.P.; P.N. Trathan; E.J. Murphy. 2002. Environmental change and Antarctic seabird populations. *Science* 297:1510-1514.

- Dinechin, M. de; F.S. Dobson; P. Zehtindjiev; R. Mercheva; C. Couchoux; A. Martin; P. Quillfeldt; P. Jouventin. 2012. The biogeography of Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*). *Canadian Journal of Zoology* 90: 352-360.
- Drummond, A.J.; Rambaut, A.; Shapiro, B.; Pybus, O.G. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences *Molecular Biology Evolution* 22(5):1185-1192.
- Excoffier, L.; G. Laval; S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Frankham, R. 1995. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10:1500-1508.
- Fraser, W.R.; W.Z. Trivelpiece; D.G. Ainley; S.G. Trivelpiece. 1992. Increases in Antarctic penguin population: reduced competition with whales or a loss of sea ice due to environmental warming? *Polar Biology* 11:525-531.
- Fu, Y.X.; W.H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Harris, C.M. 2006. Wildlife Awareness Manual: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Islands. Wildlife Information Publication No. 1. Prepared for the UK Foreign & Commonwealth Office and HMS Endurance. Environmental Research & Assessment, Cambridge.
- Harris, C.M., R. Carr, K. Lorenz; S. Jones. 2011. Important Bird Areas in Antarctica: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Islands – Final Report. Prepared for BirdLife International and the Polar Regions Unit of the UK Foreign & Commonwealth Office. Environmental Research & Assessment Ltd., Cambridge.
- Hinke, J.T.; K. Salwicka; S.G. Trivelpiece; G.M. Watters; W.Z. Trivelpiece. 2007. Divergent response of *Pygoscelis* penguins reveal common environmental driver. *Oecologia* 153: 845-855.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 July 2013.
- Jablònski, B. 1980. Distribution and numbers of birds and pinnipedes on Penguin Island (South Shetland Islands) in January 1979. *Polish Polar Research* 1(1): 109-116.
- Jablònski, B. 1984. Distribution and numbers of penguins in the region of King George Island (South Shetland Islands) in the breeding season 1980/1981. *Polish Polar Research* 5(1-2): 17-30.

- Jablònski, B. 1986. Distribution, abundance and biomass of a summer community of birds in the region of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands Islands, Antarctica) in 1978/79. *Polish Polar Research* 7: 217–260.
- Jackson, S.; T.P. Wilson. 2002. The potencial costs of flipper-bands to penguins. *Functional Ecology* 16:141-148.
- Jouventin, P.; R.J. Cuthbert; R. Ottvall. 2006. Genetic isolation and divergence in sexual traits: evidence for the northern rockhopper penguin *Eudyptes moseleyi* being a sibling species. *Molecular Ecology* 15: 3413-3423.
- Kooyman, G.L. 2002. Evolutionary and ecological aspects of some Antarctic and sub-Antarctic penguin distributions. *Oecologia* 130:485-495.
- Korczak-Abshire, M.; K.J. Chwedorzewska; P. Wąsowicz; P.T. Bednarek. 2012. Genetic structure of declining chinstrap penguin (*Pygoscelis antarcticus*) populations from South Shetlands Islands (Antarctica). *Polar Biology* 35(1): 1681-1689.
- Lambert, D.M.; Ritchie, P.A.; Millar, C.D.; Holland, B.; Drummond, A.J.; Baroni, C. 2002. Rates of evolution in ancient DNA from Adélie Penguins. *Science* 295: 2270-2273.
- Lumpe, P.; K. Weidinger. 2000. Distribution, numbers and breeding of birds at the Northern ice-free areas of Nelson Island, South Shetlands Islands, Antarctica, 1990-1992. *Marine Ornithology* 28:41-46.
- Lynch, H.; R. Naveen; P. Trathan; W. Fagan. 2012. Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology* 93(6):1367-1377.
- Macdonald, J.A.; K.J. Barton; P. Metcalf. 2002. Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) nesting on Sabrina Islet, Balleny Islands, Antarctica. *Polar Biology* 25: 442-447.
- Miller, A.K.; M.A. Kappes; S.G. Trivelpiece; W.Z. Trivelpiece. 2010. Foraging-niche separation of breeding Gentoo and Chinstrap penguins, South Shetlands Islands, Antarctica. *The Condor* 112(4): 683-695.
- Moreno, J.; L. Boto; J.A. Fargallo; A. de León; J. Potti. 2000. Absence of extra-pair fertilization in the Chinstrap Penguin *Pygoscelis antarctica*. *Journal of Avian Biology* 31: 580-583.
- Nims, B.D.; F.H. Vargas; J. Merkel; P.G. Parker. 2008. Low genetic diversity and lack of population structure in the endangered Galápagos penguin (*Spheniscus mendiculus*). *Conservation Genetic* 9: 1413-1420.

- Overeem, R.L.; A.J. Peucker; C.M. Austin; P. Dann; C.P. Burridge. Contrasting genetic structuring between colonies of the World's smallest penguin, *Eudyptula minor* (Aves: Spheniscidae). *Conservation Genetic* 9: 893-905.
- Piuco, R.C.; J. Brummelhaus; M.V. Petry; M. Sander. 2011. Population fluctuation of *Pygoscelis papua* and *Pygoscelis antarctica*, Elephant Island, South Shetlands, Antarctica. In.: Valentin, Y.Y.; Dalto, A.G.; Lavrado, H.P. (eds.). Annual Activity Report 2011 (INCT-APA). Editora Cubo, São Carlos. 210p.
- Poncet S.; J. Poncet. 1987. Censuses of penguin populations of the Antarctic Peninsula, 1983-1987. *British Antarctic Survey Bulletin* 77: 109-129.
- Posada, D.; Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1:817-818.
- Ritchie, P.A.; D.M. Lambert. 2000. A repeat complex in the mitochondrial control regions of Adélie penguins from Antarctica. *Genome* 43: 613-618.
- Roeder, A.D.; R.K. Marshall; A.J. Mitchelson; T. Visagathilagar; P.A. Ritchie; D.R. Love; T.J. Pakai; H.C. McPartlan; N.D. Murray; N.A. Robinson; K.R. Kerry; D.M. Lambert. 2001. Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology* 10: 1645-1656.
- Roeder, A.D.; P.A. Ritchie; D.M. Lambert. 2002. New DNA markers for penguins. *Conservation Genetics* 3: 341-344.
- Rozas, J.; J.C. Sanchez-delbarrio; X. Messeguer; R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and others methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch; T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659p.
- Sander, M.; T.C. Balbão; M.J. Polito; E.S. Costa; A.P.B. Carneiro. 2007. Recent decrease in chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*) populations at two of Admiralty Bay's islets on King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biology* 30: 659-661.
- Sander, M.; Carneiro, A.P.B.; Balbão, T.C.; Bays, S.R.; Costa, E.S.; N.E. Mascarello; T.D. Oliva; C.R. Santos. 2005. Status and Trends of Antarctic Seabirds at Admiralty bay, King George Island. *Polarforschung* 75(2-3): 145-150.
- Schlosser, J.A.; J.M. Dubach; T.W.J. Garner; B. Araya; M. Bernal; A. Simeone; K.A. Smith; R.S. Wallace. 2009. Evidence for gene flux differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetic* 10:839-849.

- Stonehouse, B. 1975. Introduction: The Spheniscidae. P: 1-15. In: Stonehouse, B. (ed.) *The Biology of Penguins*. University Park Press, Baltimore, 555p.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology Evolution* 28: 2731-2739.
- Thompson, J.D.; T.J. Gibson; F. Plewniak; F. Jeanmougin; D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.
- Trivelpiece, W.Z.; S.G. Trivelpiece. 1990. Courtship Period of Adélie, Gentoo, and Chinstrap Penguins. p. 113-127. In: Davis, L.S. e Darby, J.T. (eds.). 1990. *Penguin Biology*. Academic Press. San Diego, California. 467p.
- Trivelpiece, W.Z.; S.G. Trivelpiece; G.R. Geupel; J. Kjelson; N.J. Volkman. 1990. Adélie and Chinstrap penguins: Their potential as monitors of the Southern Ocean Marine Ecosystem. In: Kerry, K.R.; Hempel, G. (eds.). *Antarctic Ecosystems, Ecological Change and Conservation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Trivelpiece, W.Z.; S. Buckelew; C. Reiss; S.G. Trivelpiece. 2007. The winter distribution of chinstrap penguins from two breeding sites in the South Shetland Islands of Antarctica. *Polar Biology* 30:1231-1237.
- Trivelpiece, W.Z.; J.T. Hincke; A.K. Miller; C.S. Reiss; S.G. Trivelpiece. 2011. Variability in krill biomass links harvesting and climate warming to penguin population changes in Antarctica. *PNAS* 108(18):7625-7628.
- Trivelpiece, W.Z.; S.G. Trivelpiece; N.J. Volkman. 1987. Ecological segregation of adélie, gentoo, and chinstrap penguins at King George Island, Antarctica. *Ecology* 68(2):351-361.
- Trivelpiece, W.Z.; N.J. Volkman. 1979. Nest-size competition between Adélie and Chinstrap penguins: an ecological interpretation. *The Auk* 96: 675-681.
- Valls, F.C.L. 2013. *Ecologia alimentar de Sphenescidade na Ilha Elefante, Antártica*. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 63f.
- Warren, J.D.; J.A. Santora; D.A. Demer. 2009. Submesoscale distribution of Antarctic krill and its avian and pinniped predators before and after a near gale. *Marine Biology* 156: 479-491.
- Williams, T.D. 1995. *The Penguins – Spheniscidae*. Oxford University Press Inc., New York.

- Woehler, E.J. 1993. The distribution and abundance of Antarctic and Subantarctic penguins. Cambridge: Scientific Committee on Antarctic Research.
- Woehler, E.J.; J.P. Croxall. 1997. The status and trends of Antarctic and sub-Antarctic seabirds. *Marine Ornithology* 25: 43–66.

Tabela 1: Colônias de reprodução amostradas, tamanho da população reprodutiva e amostras coletadas de *Pygoscelis antarcticus*, nas Ilhas Rei George e Elefante, Shetlands do Sul, Antártica, nas estações reprodutivas 2010 e 2011.

	Nº pares reprodutores		N amostral	
	2010	2011	Sangue (2010)	Penas (2011)
Colônias de reprodução				
Ilha Elefante (Sinker Point)				
Colônia I	5250	438	10	0
Colônia II		4841	17	0
Ilha Rei George (Baía do Almirantado)				
Chabrier Rock	997	613	19	15

Tabela 2. Número de haplótipos, diversidade haplotípica, nucleotídica e compartilhamentos de haplótipos para *Pygoscelis antarcticus* na Ilha Rei George (Chabrier Rock) e Ilha Elefante – Stinker Point (Colônias 1 e 2).

Colônias de reprodução	Nº Amostras	Nº Haplótipos	Diversidade haplotípica ($Hd \pm DP$)	Diversidade nucleotídica ($\pi \pm DP$)	Haplótipos
Ilha Rei George					
Chabrier Rock	34	18	$0,938 \pm 0,025$	$0,0063 \pm 0,0007$	H1-H2-H3-H4-H5- H6-H7 -H8-H9-H10-H11-H12-H13-H14-H15- H16-H17-H18
Stinker Point – Ilha Elefante					
Colônia 1	10	9	$0,978 \pm 0,054$	$0,0057 \pm 0,0009$	H6-H7 -H19-H20-H21-H22-H23-H24-H25
Colônia 2	17	15	$0,985 \pm 0,025$	$0,0078 \pm 0,0009$	H6-H7 -H26-H27-H28-H29-H30-H31-H32-H33-H34-H35-H36-H37-H38
Total	61	38	$0,966 \pm 0,013$	$0,00687 \pm 0,0005$	

Haplótipos em negrito são compartilhados.

Tabela 3. Valores de F_{ST} par a par (abaixo da diagonal) e os valores de P (acima da diagonal) entre 61 espécimes de *Pygoscelis antarcticus* na Ilha Rei George (Chabrier Rock) e Ilha Elefante – Stinker Point (Colônias 1 e 2).

Populações		Chabrier Rock	Colônia 1	Colônia 2
Ilha Rei George	Chabrier Rock	-	0,24641	0,06593
Ilha Elefante - Stinker Point	Colônia 1	0,01191	-	0,41639
	Colônia 2	0,02078	0,00611	-

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para *Pygoscelis antarcticus* na Ilha Rei George (Chabrier Rock) e Ilha Elefante – Stinker Point (Colônias 1 e 2) com base nas frequências dos 38 haplótipos encontrados.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Som dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação	F/Φ Estatística	P
Entre os grupos	1	0,698	0,00401	0,82	$F \Phi_{CT} = 0,00824$	$P = 0,3295$
Entre as populações	1	0,532	0,00429	0,88	$F \Phi_{SC} = 0,00888$	$P = 0,4269$
Dentro das populações	58	27,753	0,4785	98,3	$F \Phi_{ST} = 0,01705$	$P = 0,0685$
Total	60	28,984	0,4868			

Tabela 5. Resultados dos testes de neutralidade e *Mismatch distribution*, a partir das sequências de um fragmento de 438 pb da região D-loop de *Pygoscelis antarcticus* na Ilhas Rei George (Chabrier Rock) e Ilha Elefante – Stinker Point (Colônias 1 e 2). θ_1 , tamanho populacional antes da expansão; θ_2 , tamanho populacional após a expansão; SSD, teste do desvio da soma dos quadrados; *P* SSD, valor de *P* para o SSD.

Populações	<i>Mismatch Distribution</i>	D de Tajima	<i>P</i>	Fs de Fu	<i>P</i>
Ilha Rei George (Chabrier Rock)	$\theta_1 = 0,000$	-1,38106	0,0740	-11,12747	0,0000
	$\theta_2 = 99999.000$				
	SSD = 0,00100				
	<i>P</i> SSD = 0,7730				
Ilha Elefante (Stinker Point) Colônias 1 e 2	$\theta_1 = 0,0000$	-1,76792	0,0150	-21,4895	0,0000
	$\theta_2 = 99999.000$				
	SSD = 0,00861				
	<i>P</i> SSD = 0,17300				
Ilha Rei George / Ilha Elefante	$\theta_1 = 0,0000$	-1,87062	0,0100	-26,44019	0,0000
	$\theta_2 = 99999.000$				
	SSD = 0,000499				
	<i>P</i> SSD = 0,09400				

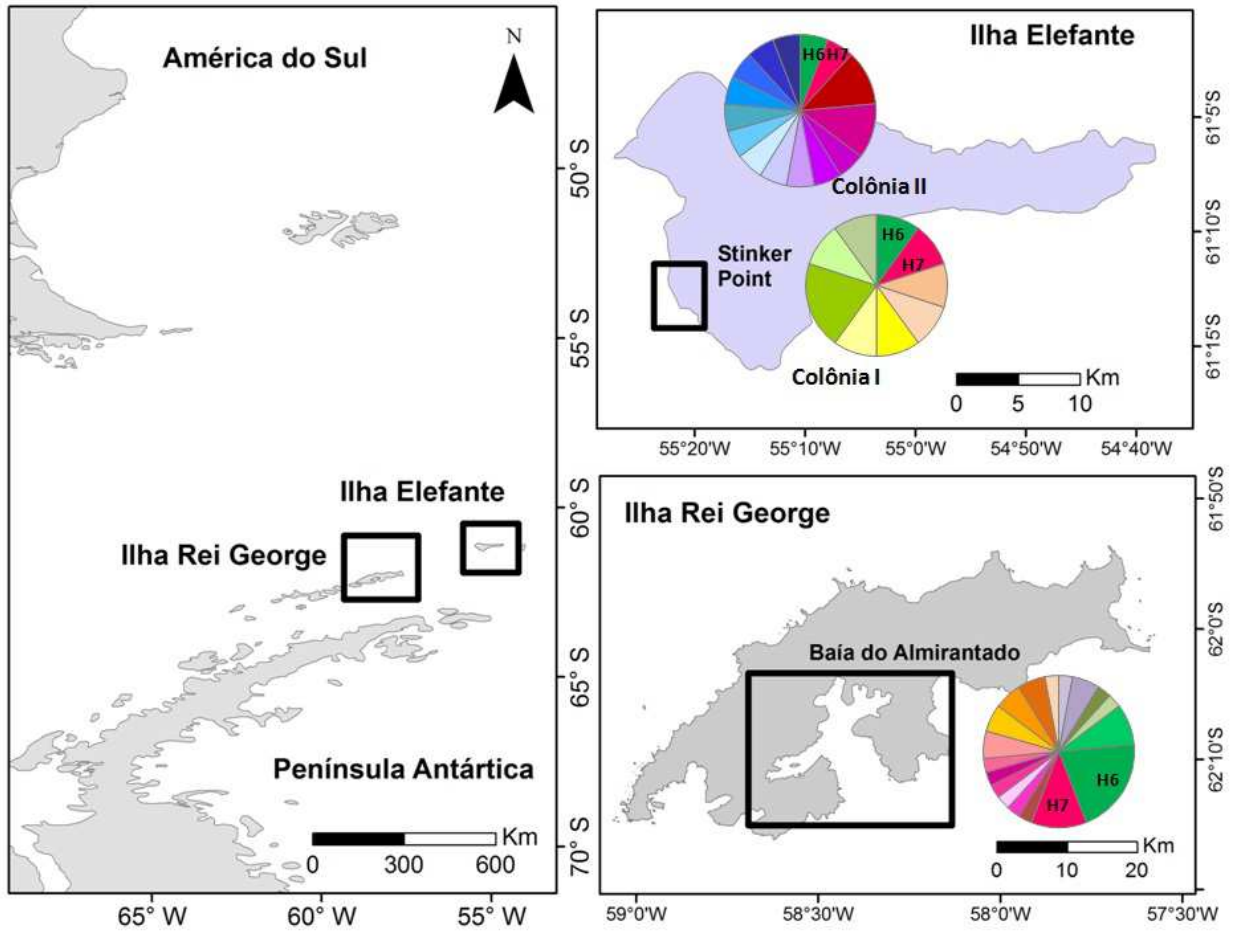


Figura 1. Distribuição dos 38 haplótipos de *Pygoscelis antarcticus* nas três áreas de reprodução: Ilha Rei George – Baía do Almirantado (Chabrier Rock) e Ilha Elefante – Stinker Point (Colônias 1 e 2), Ilhas Shetlands do Sul, Antártica.

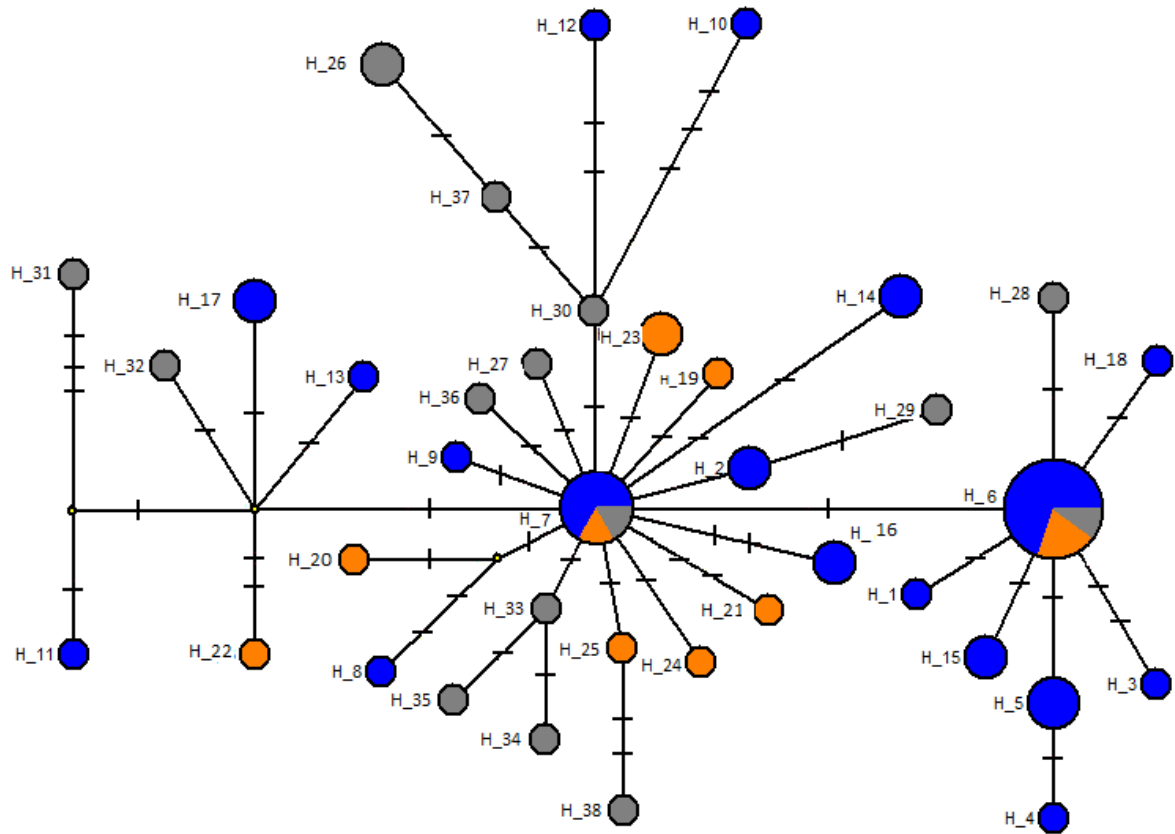


Figura 2. Rede dos 38 haplótipos identificados entre os 61 indivíduos de *Pygoscelis antarcticus* na Ilha Rei George (Chabrier Rock – Azul) e Ilha Elefante – Stinker Point (Colônia 1 - Laranja e Colônia 2 - Cinza). Os haplótipos são representados por círculos, cujo tamanho é proporcional ao número de indivíduos que os portam. As cores indicam a frequência dos haplótipos em cada população e os traços indicam os passos mutacionais que separam os haplótipos.

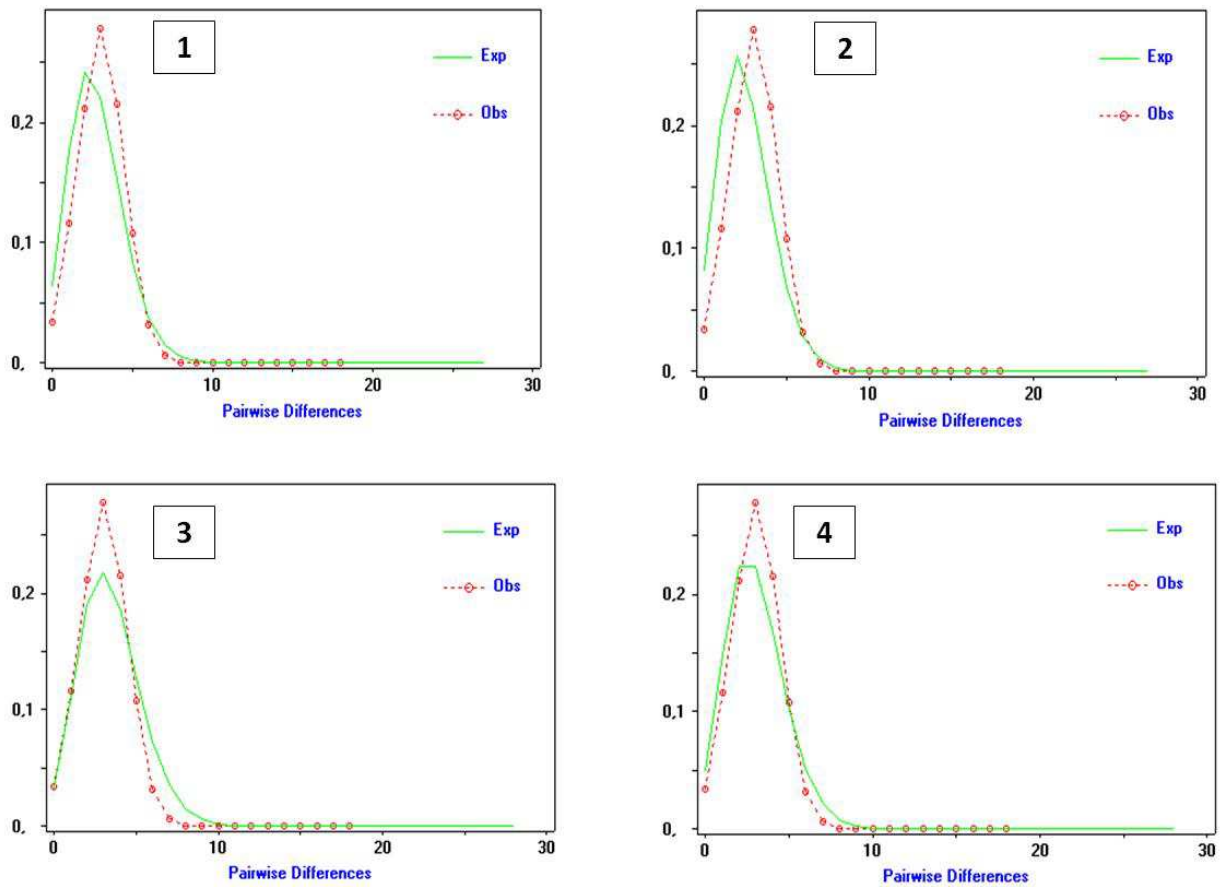


Figura 3. Representação gráfica das diferenças par a par (*Mismatch distribution*) entre as sequências de um fragmento de 438 pb da região D-loop de *Pygoscelis antarcticus*. 1 – Ilha Rei George (Chabrier Rock); 2 – Ilha Elefante – Stinker Point (Colônia 1); 3 – Ilha Elefante – Stinker Point (Colônia 2); 4 – Todas as 61 amostras. Linha pontilhada (vermelho) representa as diferenças par a par observadas, enquanto linha contínua (verde) representa as diferenças par a par esperadas com eventos de expansão populacional.

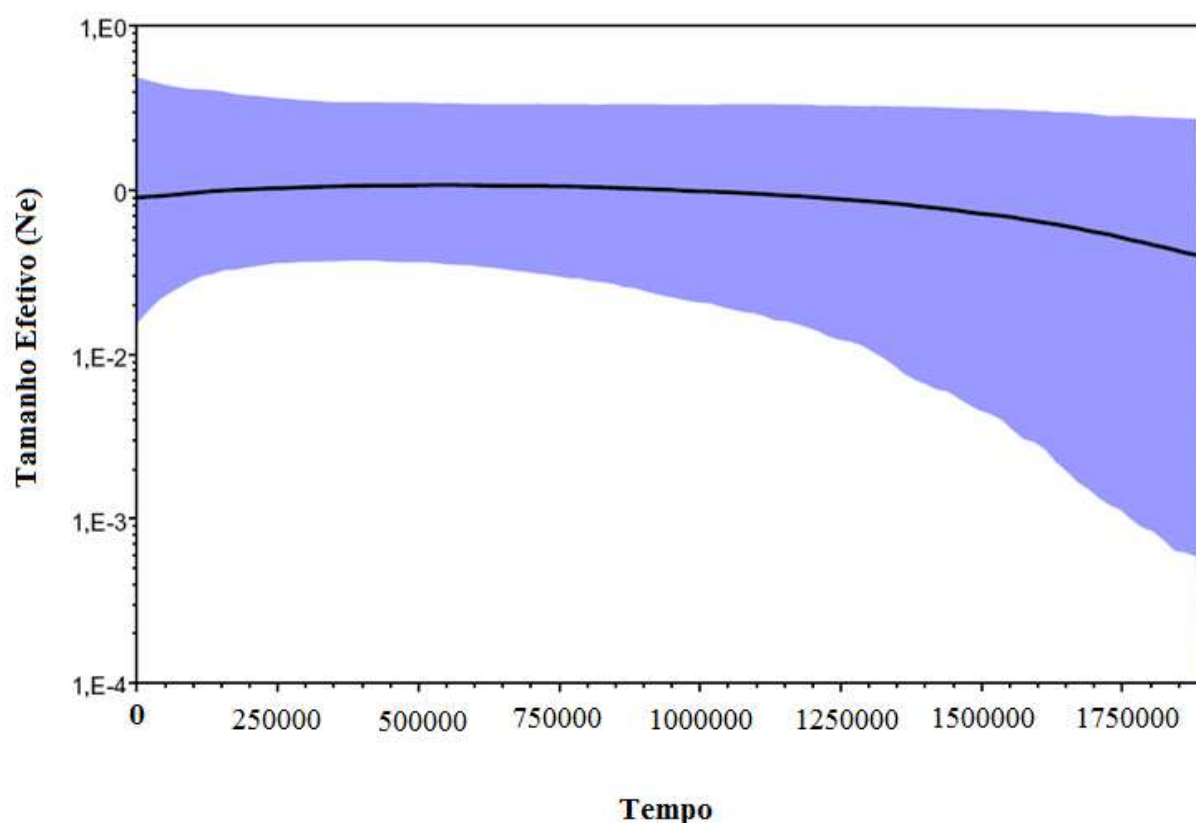


Figura 4. *Bayesian Skyline Plots* a partir das sequências de um fragmento de 438 pb da região D-loop de *Pygoscelis antarcticus* nas Ilhas Rei George (Chabrier Rock) e Elefante – Stinker Point (Colônias 1 e 2), estimado com 10 milhões de MCMC (cadeias de Markov) e amostradas a cada 1000 passos. O eixo Y mostra os tamanhos efetivos populacionais e o X o tempo. A taxa de mutação utilizada foi de 1,4% por milhão de anos, sugerida por Lambert *et al.* (2002). As histórias demográficas são mostradas na linha tracejada grossa, as estimativas medianas (limites de 95%) são mostradas pela área azul.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*), como outras espécies de pinguins, não possui características físicas que facilmente permitam identificar o sexo de forma visual. Mas os machos são significativamente maiores em medidas morfométricas como o comprimento e altura do bico e a largura da comissura do bico, em Stinker Point, na Ilha Elefante. Isso permite a construção de uma equação discriminante viabilizando a sexagem morfométrica de adultos reprodutores com uma eficácia de 80,6% para aquela área de reprodução. Essa equação discriminante poderá ser utilizada em futuros estudos para a espécie na ilha, lembrando o valor de corte é $D = -0.076$. Resultados muito próximos a esse ponto de corte podem gerar dúvidas que devem ser resolvidas com a técnica de sexagem molecular que é muito eficiente. A sexagem dos indivíduos se faz necessária em inúmeras atividades de coleta de dados em campo, principalmente em estudos de ecologia e monitoramento do pinguim-antártico, pois é uma das espécies de interesse da Comissão para a Conservação dos Recursos Marinhos Vivos da Antártica (CCAMLR, 2004).

Para os parâmetros de pesquisa e monitoramento populacional do pinguim-antártico, descritos pela CCAMLR (2004), como o peso de chegada às colônias de reprodução a cada nova estação reprodutiva, sobrevivência anual e recrutamento é solicitado o conhecimento do sexo do indivíduo, e para essa identificação na Ilha Elefante é recomendado o uso da equação discriminante desenvolvida nesta tese. O uso de outra equação discriminante, desenvolvida na Ilha Deception (AMAT et al. 1993) reduz-se o acerto para 71%. Da mesma forma, a equação discriminante desenvolvida para a Ilha Rei George por Polito et al., (2012) acerta o sexo dos pinguins para apenas 67,7% dos indivíduos da Ilha Elefante. Considerando-se o comportamento filopátrico da espécie, espera-se que haja variação geográfica em relação às medidas morfométricas, principalmente entre ilhas mais distantes. Este estudo mostra uma variação significativa para a altura do bico entre os adultos das Ilhas Rei George e Elefante, no entanto, essa variação não é observada quando considerada a diferença entre machos e fêmeas nas duas ilhas. O comprimento do bico também não variou entre os sexos nas duas ilhas. Por não haver diferenças significativas, num primeiro momento, poderia considerar-se o uso de uma única equação discriminante, porém, há grande probabilidade de classificação do sexo de forma incorreta como mostrado aqui. Dessa forma, é recomendado o uso cauteloso da equação discriminante em locais de reprodução diferentes de onde foi desenvolvida.

Para uma espécie em que 94% dos machos e 82% das fêmeas retornam ao mesmo par e ao mesmo ninho da colônia de reprodução durante anos sucessivos na Ilha Rei George

(TRIVELPIECE e TRIVELPIECE 1990), espera-se alguma diferença nas características morfológicas entre as Ilhas Rei George e Elefante. A respeito disso, espera-se também que não ocorra troca de pares reprodutores entre as colônias dessas duas ilhas. Os resultados aqui apresentam uma possível interpretação de ocorrência de fluxo gênico entre as colônias de pinguim-antártico pela falta de estruturação genética apontada pelos resultados de F_{ST} e AMOVA. Mas essa falta de estruturação genética não indica necessariamente a troca efetiva e constante de adultos reprodutores entre as colônias.

O primeiro indicativo contrário a essa ideia é quando a análise haplotípica aponta apenas dois haplótipos (H6 e H7) compartilhados nas três populações, e os demais 36 são exclusivos de cada população. A rede de haplótipos mostra que esses dois haplótipos certamente são os ancestrais dos demais. Apesar do conhecimento do comportamento filopátrico da espécie, esse resultado aponta a possibilidade de expansão populacional, confirmado pelos testes de neutralidade e expansão demográfica, que apresentaram valores negativos e significativos. Além disso, as distribuições das diferenças par a par para cada população são representadas em curvas unimodais. Ou seja, em um primeiro momento, parece ter ocorrido uma redução populacional muito grande e uma expansão de poucos haplótipos por volta de dois milhões de anos resultando nesta suposta falta de estruturação genética para as populações recentes de pinguim-antártico. Também, é apontado para uma constância do tamanho populacional efetivo no último milhão de ano.

Desta forma, o cenário evolutivo é de uma expansão demográfica ocorrida a partir um grupo geneticamente homogêneo que colonizou as ilhas antárticas, pois o maior centro de origem e de concentração populacional da espécie está nas Ilhas Sandwich do Sul (KOOYMAN, 2002; TRIVELPIECE et al., 2007). Apesar do comportamento filopátrico, tem-se observado ao longo das últimas décadas a colonização de novas áreas com condições adequadas à reprodução, e aliado a diversos fatores que influenciam a dinâmica populacional e ao tamanho efetivo populacional constante encontrado nesse estudo, configuram-se panoramas de flutuações populacionais menores para o pinguim-antártico e não declínios populacionais como descritos na literatura.

As informações produzidas nessa tese, que envolvem principalmente a possibilidade de variação morfométrica do pinguim-antártico entre as Ilhas Rei George e Elefante, a baixa variabilidade genética e a expansão populacional histórica com tamanho efetivo constante, são importantes ferramentas que apoiam a identificação e a caracterização de IBAs (Important Bird Areas in Antarctica), bem como a criação de novas Áreas Antártica Especialmente Protegidas (ASPAs).

4.1. Referências bibliográficas

- AMAT, J. A.; VIÑUELA, J.; FERRER, M. Sexing Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) by morphological measurements. **Colonial Waterbirds**, v. 16, p. 213-215, 1993.
- COMMISSION FOR THE CONSERVATION OF ANTARCTIC MARINE LIVING RESOURCES (CCAMLR). 2004. Tasmania, Australia: 2004. Disponível em: <<http://www.ccamlr.org>>. Acesso em: 26 Jul. 2012.
- KOOYMAN, G.L. Evolutionary and ecological aspects of some Antarctic and sub-Antarctic penguin distributions. **Oecologia**, v. 130, p. 485-495, 2002.
- POLITO, M. J.; CLUCAS, G. V.; HART, T.; TRIVELPIECE, W. Z. A simplified method of determining the sex of *Pygoscelis* penguins using bill measurements. **Marine Ornithology**, v. 40, p. 89-94, 2012.
- TRIVELPIECE, W. Z.; BUCKELEW, S.; REISS, C.; TRIVELPIECE, S. G. The winter distribution of chinstrap penguins from two breeding sites in the South Shetland Islands of Antarctica. **Polar Biology**, v. 30, p. 1231-1237, 2007.
- TRIVELPIECE, W. Z.; TRIVELPIECE, S. G. Courtship Period of Adélie, Gentoo and Chinstrap Penguins. In: DAVIS, L. S. e DARBY, J. T. (Eds.). **Penguin Biology**. San Diego, California: Academic Press, 1990, p. 113-127.

5. ANEXO 1:

Confirmação da submissão do Capítulo 1: Sexual dimorphism in *Pygoscelis antarcticus*: molecular sexing and discriminant functions in the South Shetland Islands, Antarctica, para o periódico científico Antarctic Science, no dia 04 de novembro de 2013.

Antarctic Science - Manuscript ID AntSci-2013-SP-0894

1 mensagem

scoo@bas.ac.uk <scoo@bas.ac.uk>

4 de novembro de 2013 21:30

Para: jaquebrummelhaus@gmail.com

04-Nov-2013

Dear Dr. Brummelhaus

Your manuscript entitled "Morphometric variation in *Pygoscelis antarcticus*: Molecular Sexing and Discriminant Functions in the South Shetland Islands, Antarctica" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the journal Antarctic Science.

Your manuscript ID is AntSci-2013-SP-0894.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/antsci> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/antsci>.

Thank you for submitting your manuscript to Antarctic Science.

Sincerely
Sharon Cooke
Journal Administrator
Antarctic Science Editorial Office

