

UFRGS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UERGS – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL

ANA CAROLINA DOS SANTOS PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL DE EXEMPLARES DE *Calonectris*
diomedea ENCONTRADOS NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**
ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

IMBÉ
2011

ANA CAROLINA DOS SANTOS PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL DE EXEMPLARES DE *Calonectris diomedea* ENCONTRADOS NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL
ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professora Doutora Melina Martha Baumgarten

Co-orientador: Professor Doutor Paulo Henrique Ott

IMBÉ

2011

Aos examinadores,

Este trabalho está formatado segundo as normas de GRANDI, Cleci *et al.* **Orientações para elaboração e apresentação de trabalhos e relatórios acadêmicos.** Porto Alegre: UERGS, 2010. 95 p. O qual segue as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

P436d Pereira, Ana Carolina dos Santos

Determinação da razão sexual de exemplares de *Calonectris diomedea* encontrados no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil através de técnicas moleculares / Ana Carolina dos Santos Pereira. -- 2011.

37 f.

Orientadora: Melina Martha Baumgarten.

Coorientador: Paulo Henrique Ott.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira, Imbé / Cidreira, BR – RS, 2011.

1. *Calonectris diomedea*. 2. Determinação sexual. 3. Técnicas moleculares. 4. Rio Grande do Sul, Brasil. I. Baumgarten, Melina Martha, orient. II. Ott, Paulo Henrique, Coorient. III. Título.

Adaptado do Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pela autora.

ANA CAROLINA DOS SANTOS PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL DE EXEMPLARES DE *Calonectris diomedea* ENCONTRADOS NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL
ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 08 / 07 / 2011

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa - UDESC/SC

Dra. Larissa Heinzelmann - UESC/BA

Prof. Dr. Eduardo Guimarães Barboza

Coordenador da atividade

Trabalho de Conclusão II – CBM

AGRADECIMENTOS

Na realização desta obra, agradeço:

A Deus, que me deu a oportunidade de poder estudar e entender melhor os processos de Sua incrível criação. Me capacitou para que eu pudesse chegar até esta etapa e me fortaleceu para agüentar a distância da família.

A minha família, que sempre me deu suporte financeiro, moral e principalmente emocional.

À querida orientadora, Profa. Dra. Melina Martha Baumgarten e ao **coorientador Prof. Dr. Paulo Henrique Ott** que foram mais do que professores, foram mestres e companheiros, tendo longanimidade para ensinar, compreender e ajustar.

Ao Prof. Dr. Sandro Bonatto e colegas do GENOMA da PUC pelo espaço, atenção e paciência.

À Dra. Cristina Miyaki e à Mestranda Ana Cristina Fazza, pela dedicação e ajuda nas análises.

Ao Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena Freitas da UFRGS pela ajuda nos últimos momentos e ao **Fabício Bertuol**, pela total atenção e dedicação que deu as minhas amostras.

Ao CERAM, representado pelo **Mauricio Tavares**, pelo empréstimo das amostras analisadas neste trabalho. Sem ele, este trabalho não teria sido realizado.

Ao Nicholas Daudt, Thomaz e Gabrieli Afonso, pessoal da **Coleção Didática de Vertebrados do CECLIMAR**, pela incrível devoção com que pararam todas as tarefas que tinham para me ajudar nas necropsias. Foram fundamentais para a continuidade deste trabalho. Minha dívida com esses colegas é altíssima.

Aos amigos Diogo, Luciana, Flávia, Belize, Sue e Samanta, pelos momentos de descontração que me mantiveram firme e sã nessa caminhada.

À todos os colegas da turma II de biologia das duas ênfases, pelos 4 anos juntos com muitas risadas, discussões e votações.

A todos vocês, minha gratidão eterna.

**“Mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias,
correm e não se cansam, caminham e não se fatigam”**

(Isaías 40:31)

RESUMO

A espécie *Calonectris diomedea* é uma ave marinha pertencente à ordem Procellariiformes, família Procellariidae. É uma das três espécies do gênero, possuindo duas sub-espécies: *C. diomedea borealis* e *C. diomedea diomedea*. Apresenta colônias na costa de Portugal e nas ilhas Açores, Madeira, Selvagens (Grande e Pequena), Berlenga e Canárias que ficam no Mediterrâneo e Atlântico. É uma espécie migratória que, após o período de nidificação, migra para o hemisfério sul chegando até águas argentinas.

No Brasil, exemplares desta espécie podem ser encontrados no litoral nos meses de dezembro a maio. O presente trabalho pretendeu demonstrar a proporção sexual dos indivíduos encontrados mortos em monitoramentos na costa do Rio Grande do Sul e de indivíduos recebidos pelo Centro de Reabilitação de Fauna Marinha e Silvestre (CERAM) entre os anos de 2009 e 2011. Sempre que possível, o sexo foi determinado visualmente através da necropsia. Quando o corpo encontrava-se em decomposição, foram coletadas amostras de tecido muscular do peito ou membrana interdigital para posterior determinação por meio de técnicas moleculares através da amplificação dos genes CHD-Z e CHD-W. Foram amostrados um total de 38 indivíduos, porém somente em 19 (50%) foi possível determinar o sexo. Puderam ser contabilizados 11 machos, representando 57,8% do total de indivíduos determinados e 8 fêmeas, representando 42,2%. Fêmeas foram mais encontradas de dezembro a abril, enquanto machos foram mais presentes em maio.

Palavras-chave: *Calonectris diomedea*, determinação sexual, técnicas moleculares, Rio Grande do Sul, Brasil.

ABSTRACT

Calonectris diomedea is a seabird species that belongs to order Procellariiformes, family Procellariidae. It is one of three species of the genus, which has two sub-species: *C. diomedea borealis* and *C. diomedea diomedea*. It presents colonies along the coast of Portugal and the Açores Islands, Madeira, Selvagens (Grande and Pequena), Berlenga and Canárias in Mediterranean Sea and Atlantic Ocean. It is a migratory species that flies to south hemisphere towards Argentinian coast, after breeding.

In Brazil, specimens can be found on the coast from December to May. In this work we investigated the sexual rate of birds found dead in monthly monitoring of the north coast of Rio Grande do Sul State or the birds received by the Centro de Reabilitação de Fauna Marinha e Silvestre (CERAM) between 2009 and 2011. When it was possible, the sex was determined through necropsy. Otherwise, breast muscle or interdigital membrane samples were collected to sex using molecular techniques based on amplification of CHD-Z and CHD-W genes. We collected 38 birds, but just in 19 (50%) it was possible to determine the sex. Were detected 11 males, representing 57,8% and 8 females, representing 42,2%. From December to April we found more females than males but we found more males in May.

Key-words: *Calonectris diomedea*, sexual determination, molecular techniques, Rio Grande do Sul, Brasil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Calonectris leucomelas</i>	10
1.2 <i>Calonectris edwardsii</i>	11
1.3 <i>Calonectris diomedea</i>	12
1.4 DETERMINAÇÃO DO SEXO BASEADA EM TÉCNICAS MOLECULARES	15
1.5 JUSTIFICATIVA	15
1.6 OBJETIVOS	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 ÁREA DE ESTUDO	17
2.2 COLETA DE AMOSTRAS	18
2.3 MÉTODOS DE LABORATÓRIO	19
2.3.1 Necropsia	19
2.3.2 Extração e amplificação de DNA	20
3 RESULTADOS	22
4 DISCUSSÃO	24
4.1 A PRESENÇA DA ESPÉCIE NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL	24
4.2 RAZÃO SEXUAL	25
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXOS	33

1 INTRODUÇÃO

O Brasil faz parte da rota migratória de milhares de espécies de aves que realizam seus ciclos de migração sazonal do Hemisfério Norte para o Hemisfério Sul e vice-versa (SICK, 1984). Segundo a Lista das Aves do Brasil feita pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2010), no Brasil ocorrem 1832 espécies de aves entre visitantes, vagantes e residentes.

A ordem Procellariiformes constitui a grande maioria das espécies de aves pelágicas do mundo. Compreende 4 famílias, 25 gêneros e 134 espécies (WORLD BIRD LIST, IOC). O gênero *Calonectris* pertence à ordem Procellariiformes, família Procellariidae. Possui 3 espécies: *Calonectris leucomelas*, que habita o Oceano Pacífico, *Calonectris edwardsii*, espécie endêmica do Cabo Verde (PORTER *et al.*, 1997) e *Calonectris diomedea*, que ocorre no Atlântico Norte e ilhas do Mediterrâneo (GÓMEZ-DÍAZ *et al.*, 2006). Segundo Mougín (1998), *C. diomedea* é dividido em duas sub-espécies: *C. diomedea borealis* e *C. diomedea diomedea*. A distribuição geográfica do gênero *Calonectris* pode ser observada na Figura 1.

1.1 *Calonectris leucomelas*

Espécie comum na região do Japão, Taiwan, leste da China e Coréia, costuma reproduzir-se em ilhas no leste e sudeste da Ásia. Nos meses de novembro a março, migram para os mares de Nova Guiné, norte da Austrália e Filipinas. A ilha Mikura, no Japão, abriga cerca de 1,75 a 3,5 milhões de aves, o que compreende 68-81% da população mundial (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Em estudo sobre a influência do ciclo lunar na atividade migratória das aves, Yamamoto *et al.* (2008) registraram 3 diferentes rotas de migração: i) os mares do norte de Nova Guiné, ii) o Mar da Arafura, ao norte da Austrália, no Oceano Pacífico e iii) o sul do mar da China. Também demonstraram que em noites de lua cheia as aves fazem vôos mais longos e pousos mais freqüentes na água, provavelmente para evitar a predação, que é facilitada pela maior luminosidade na lua cheia.

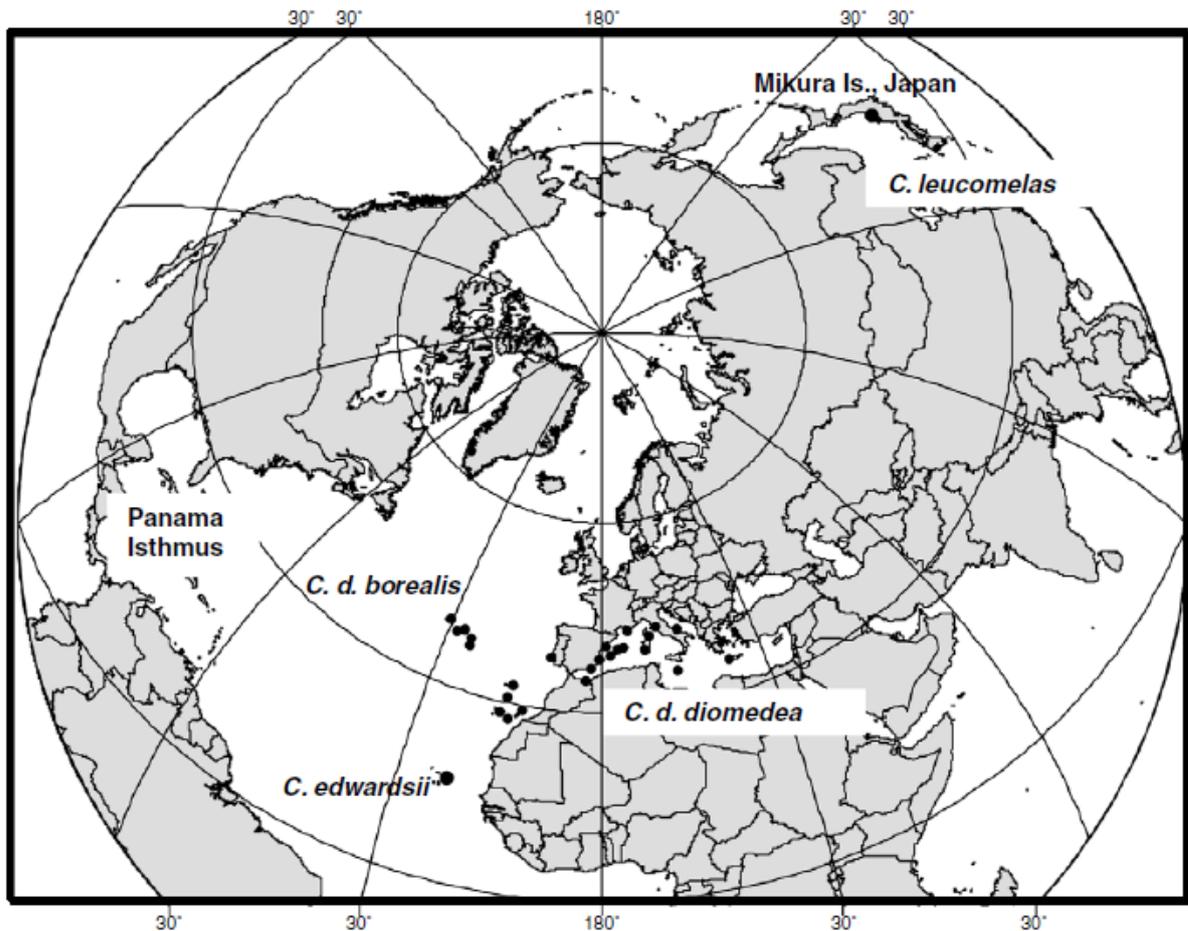


Figura 1: Mapa da distribuição das três espécies de *Calonectris*.

FONTE: Gómez-Díaz *et al.*, 2006.

1.2 *Calonectris edwardsii*

Espécie endêmica do Arquipélago de Cabo Verde, era considerada uma sub-espécie de *C. diomedea* (GÓMEZ-DÍAZ *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2002; PATTESON e ARMISTEAD, 2004; PORTER *et al.*, 1997). Recentemente foi reclassificada como uma espécie plena (GÓMEZ-DÍAZ *et al.*, 2006; PATTESON e ARMISTEAD, 2004).

Segundo Patteson e Armistead (2004), apresenta uma população de aproximadamente 10.000 pares, dispersos em 6 ilhas do arquipélago. Entretanto, a população pode ser menor por problemas causados na interação com a pesca local.

As colônias reprodutivas localizam-se no Arquipélago de Cabo Verde e de acordo com Patteson e Armistead (2004), os indivíduos chegam às ilhas de reprodução no final de

fevereiro e fazem a postura em junho e julho. Existem poucas informações sobre *C. edwardsii* fora dos meses de reprodução, entretanto supõe-se que se dispersam do sul de Cabo Verde para o Atlântico norte e norte do Atlântico sul. Em revisão sobre a ocorrência da espécie em águas européias, Porter *et al.* (1997) não encontrou nenhum registro, mas a considerou comum na costa do Senegal no mês de outubro. Sobre o aparecimento de espécimes de *C. edwardsii* na costa leste dos Estados Unidos, Patteson e Armistead (2004) acreditam que ciclones tropicais e furacões que ocorrem no Atlântico Norte podem explicar esses registros.

No Brasil, o primeiro registro foi em junho de 1995, em monitoramento realizado por Lima e colaboradores no litoral da Bahia. O espécime foi encontrado morto, já em decomposição. Um segundo exemplar foi encontrado em 1998 (LIMA *et al.*, 2002).

Em relação à *C. diomedea*, é considerado 10% menor em medidas lineares e quase 30% menor em volume. Possui um marrom-acinzentado mais escuro no dorso e uma clara demarcação entre o dorso da cabeça, que é escuro, e a garganta branca. A asa e o corpo são mais finos e a cauda proporcionalmente mais longa e menor. Tem o bico cinza com uma faixa mais escura sub-terminal. Às vezes pode apresentar um bico amarelado, mas nada parecido com o amarelo característico de *C. diomedea*, além de ter uma vocalização muito diferente deste (PORTER *et al.*, 1997).

1.3 *Calonectris diomedea*

Na ilha Selvagem Grande, no litoral de Portugal reside a maior colônia desta espécie (cerca de 30.000 pares de nidificação). Esta ilha fica a 300 km da costa e tem cerca de 260 hectares (GRANADEIRO *et al.*, 2009). Reproduzem-se na costa de Portugal e nas ilhas do Mediterrâneo e Atlântico como Açores, Madeira, Selvagens (Grande e Pequena), Berlenga e Canárias (ALONSO *et al.*, 2009). Com aproximadamente 9 anos começam a se reproduzir e nidificam entre maio e setembro. De acordo com estudo realizado por Mougin, Jouanin e Roux (2002) sobre a reprodução na espécie, verificou-se que a cada ano os indivíduos se reproduzem no mesmo ninho, e em geral, com o mesmo parceiro, entretanto alguns indivíduos podem não reproduzir anualmente (em torno de 10%). Além disso, sobre os indivíduos imaturos, constatou-se que os jovens passam o período de imaturidade no mar nos primeiros anos de vida e após, seguem para terra. Entretanto, a inexperiência na reprodução

destes indivíduos não afeta o crescimento da população. Após o período de nidificação, as aves migram para o hemisfério sul chegando até águas argentinas (VOOREN e FERNANDES, 1989).

Segundo Mougín (2000), ainda sobre a biologia reprodutiva de *C. diomedea*, entre os indivíduos que reproduzem pela primeira vez, a filopatria (a volta ao mesmo lugar de nascimento) é muito maior em machos do que em fêmeas. Além disso, o autor observou que o acasalamento dentro da espécie é preferencialmente baseado na proximidade de indivíduos dentro da colônia. Desse modo, jovens não acasalam preferencialmente com jovens e nem reprodutores experientes acasalam-se entre si. Também não há cruzamentos preferenciais relacionados ao tamanho do bico e nem à massa corporal.

A espécie faz ninhos expostos em paredões, em tocas individuais profundas ou curtas para o casal ou em cavernas, dividindo o espaço com vários outros casais. Durante o período de incubação, machos podem perder até 18% da massa corporal inicial, e fêmeas até 22% (MOUGIN, 2000). Existe um comportamento de guarda de ninho na espécie. Os pais só saem após os primeiros 10 dias de vida do filhote, quando ele já consegue manter a sua própria temperatura corporal. Eles deixam os filhotes durante a noite, enquanto forrageiam e retornam pela manhã. Não há diferença entre o tempo de guarda e o tipo de ninho, ou seja, tanto ninhos expostos quanto em tocas recebem o mesmo investimento dos pais. (CATRY *et al.*, 2009).

Petry *et al.* (2009), registraram para a dieta de *C. diomedea* uma preferência por cefalópodes (com destaque para as espécies *Argonauta nodosa* e *Histioteuthis* sp.) e, secundariamente, espécies de peixes (*Paralichthys brasiliensis*, *Porichthys porosissimus* e *Prionotus punctatus*). Gaivotas e ratos estão entre os principais predadores dos filhotes nas ilhas. (CATRY *et al.*, 2009).

No Brasil, exemplares desta espécie podem ser encontrados nos meses de dezembro a maio (PETRY *et al.*, 2009). Lima *et al.* (2002) encontraram 3447 exemplares mortos de *C. diomedea borealis* ao longo de 7 anos de monitoramento da costa do nordeste do Brasil e o local com maior número de espécimes encontrados foi no estado da Bahia. Segundo Olmos (2002), no Brasil, a grande maioria das recapturas de espécimes anilhados são de indivíduos imaturos, e o estudo registra que a anilha mais antiga foi encontrada em Itamaracá (PE), 16 anos após sua colocação, na ilha Selvagem Grande. Adicionalmente, Azevedo *et al.* (2001), em Pernambuco, registraram a recuperação de um indivíduo anilhado em 1980, na Ilha Selvagem Grande. Tal indivíduo foi recuperado em dezembro de 1996 e classificado como jovem de primeiro ano.

Calonectris diomedea possui um tamanho corporal médio, tem o dorso cinza escuro amarronzado, rêmiges e retrizes marrons, com a porção ventral do corpo, das asas e da cauda branca. O bico, longo e robusto, e as patas, são de cor amarela (VOOREN e FERNANDES, 1989) (Figura 2).

Estudos de telemetria satelital mostraram que *C. diomedea* migra tanto durante o dia quanto à noite e alterna vôos longos a curtos e paradas no mar. Não foi possível saber qual o motivos das paradas, mas os autores acreditam se tratar de paradas para descanso, ventos desfavoráveis ou até mesmo ausência de vento. Também constataram que no retorno à ilha de reprodução, os espécimes capturados tomaram rotas diretas do ponto de partida (DALL'ANTONIA *et al.*, 1995).

Mougin (2000) mostra que há diferença no tamanho do bico entre machos e fêmeas de *C. diomedea*. Segundo o autor, é uma característica muito dimórfica, sendo maior em machos e menor em fêmeas. Uma vez que esta característica sofre muita variação, a diferença entre o tamanho de bico do macho em relação à fêmea representa o grau de dimorfismo sexual. Jouanin *et al.* (2001) determinaram o sexo das aves em 47 ninhos através da medição do bico. Diferenças no tamanho e na forma do bico podem indicar diferentes pressões seletivas atuando em machos e fêmeas (NAVARRO, KALIONTZOPOULOU e GONZÁLEZ-SOLÍS, 2009). Tanto ou mais variável do que tamanho do bico é a massa corporal, por isso não é considerada um bom padrão de referência. Mougin (2000) mostra que durante o período reprodutivo, os indivíduos podem perder até 20% do seu peso inicial, chegando às áreas de pós-reprodução em uma situação que não representa a real.



Figura 2. Aspecto geral de *Calonectris diomedea*. A: visão ventral. B: visão dorsal. C: Detalhe do bico com coloração amarela característica.

FONTE: Arquivo CERAM, 2011.

1.4 DETERMINAÇÃO DO SEXO BASEADA EM TÉCNICAS MOLECULARES

A determinação sexual através de técnicas moleculares é uma ferramenta que vem sendo largamente usada e se torna muito útil em estudos onde se tem indivíduos de diversas classes etárias ou classes indeterminadas. Em aves, os cromossomos que determinam machos apresentam-se em homozigose, ou seja, ZZ e os que determinam fêmeas em heterozigose, ou seja, ZW. Trabalhos de determinação sexual têm como alvo a amplificação de dois genes dentro desses cromossomos: o gene CHD-Z, localizado no cromossomo Z, com 600 pb e o gene CHD-W, localizado no cromossomo W, com 450 pb (FRIDOLFSSON E ELLEGREN, 1999).

1.5 JUSTIFICATIVA

Estudos sobre *Calonectris diomedea* vêm sendo realizados nas suas colônias reprodutivas e pesquisadores tentam entender melhor a ecologia e biologia da espécie. Uma vez que há pouca informação disponível sobre a espécie no litoral do Rio Grande do Sul, faz-se necessário um estudo de proporção sexual dos espécimes que chegam a esta região. Informações sobre a razão sexual trazem conhecimento sobre a dinâmica populacional, mostrando se a população encontra-se em equilíbrio, sobre os padrões de dispersão entre os sexos, a biologia reprodutiva e também o comportamento em áreas não reprodutivas. O Rio Grande do Sul está na área limite de distribuição da espécie e essa informação pode ajudar a esclarecer novas questões sobre o padrão de distribuição em período não reprodutivo.

1.6 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo determinar a razão sexual de espécimes da espécie *Calonectris diomedea* encontrados no litoral do Rio Grande do Sul durante os anos de 2009 e 2011, através de técnicas moleculares. Com esta informação pretendeu-se esclarecer a proporção de machos e fêmeas encontrada na área de estudo para entender melhor o padrão de dispersão e se há alguma divergência entre a distribuição de machos e fêmeas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

Estendendo-se por cerca de 620 km, o litoral do Rio Grande do Sul é delimitado ao norte pelo rio Mampituba (no município de Torres, divisa com o estado de Santa Catarina) e ao sul pelo arroio Chuí (que delimita a fronteira com o Uruguai) (BELTON, 1994) (Figura 3). Possui três comunicações estuarinas com o oceano, entretanto, possui uma faixa praial interrompida em dois trechos: uma em Rio Grande, através da Lagoa dos Patos e outra em Tramandaí, pelo rio Tramandaí. O terceiro estuário fica em Torres e por se tratar de uma divisa de estado, não interrompe a faixa praial (CALLIARI *et al.*, 2006). É caracterizado por uma linha de costa retilínea, com orientação SO-NE sendo em muitos pontos recobertos por extensos campos de dunas, os quais progradam sobre banhados e um conjunto de lagoas e lagunas costeiras. (VILLWOCK, 1984). De característica arenosa, as praias sofrem forte ação dos ventos, principalmente do vento nordeste, no verão, e do vento norte e sul, alternados, no inverno. O litoral tem a influência de duas principais correntes. No verão, a Corrente do Brasil traz águas quentes vindas do norte e a temperatura varia entre 20 e 24°C. No inverno, predomina a Corrente das Malvinas que traz águas mais frias (entre 13 e 18°C) do sul. As águas trazidas pela Corrente das Malvinas são conhecidas pela alta quantidade de nutrientes e produtividade, o que atrai muitas espécies de animais inclusive de aves marinhas (VOOREN e FERNANDES, 1989).



Figura 3: Imagem do Rio Grande do Sul. Em detalhe as fronteiras do Estado.

FONTE: Adaptado de Google Mapas, 2011.

2.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras deste estudo foram obtidas através de duas maneiras: do empréstimo de tecido dos animais recebidos pelo CERAM (Centro de Reabilitação de Fauna Marinha e Silvestre), situado no CECLIMAR (Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos) e por monitoramentos de praia realizados pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS), que coletava o tecido de animais encontrados mortos no litoral do Rio Grande do Sul. Foram realizados monitoramentos mensais, nos anos de 2009 a 2011, totalizando 25 monitoramentos a partir do município de Torres até o município de Mostardas (Figura 4). Utilizou-se veículo motorizado a velocidade média de 25 km/h que percorria a orla da praia. Sempre que algum animal foi avistado, fez-se uma pausa para recolhimento das amostras.

As amostras coletadas foram preservadas em etanol absoluto para posteriores trabalhos em laboratório. No total, foram colhidas e analisadas 38 amostras de tecido muscular do peito ou membrana interdigital.



Figura 4. Área percorrida pelos monitoramentos nos anos de 2009 a 2011.

FONTE: Adaptado de Google Mapas, 2011.

2.3 MÉTODOS DE LABORATÓRIO

2.3.1 Necropsia

As necropsias foram realizadas no CECLIMAR e os espécimes de *C. diomedea* encontravam-se congelados em freezers do CERAM. Antes do início da necropsia o indivíduo era medido e fotografado. Adicionalmente foi realizada incisão na altura do esterno, para coleta de tecido muscular do peito e de órgãos para análises relacionadas a outros projetos. Quando identificadas, as gônadas foram utilizadas para a determinação do sexo (Figura 5).

Após a necropsia, o esqueleto de cada espécime foi tombado na Coleção Didática de Vertebrados do CECLIMAR.

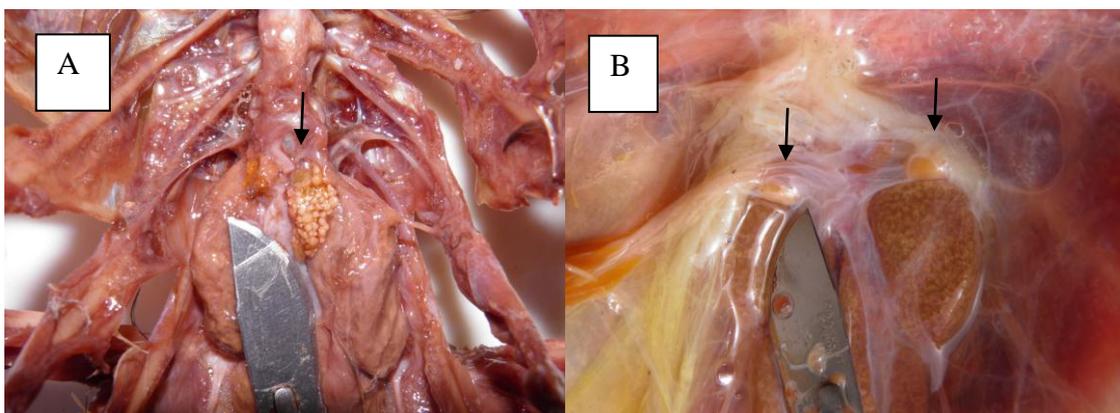


Figura 5. Gônadas de *Calonectris diomedea*. A: Ovário de fêmea necropsiada. B: Testículos de macho necropsiado (setas).

FONTE: Arquivo CERAM, 2011.

2.3.2 Extração e amplificação de DNA

O material coletado foi analisado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica (PUC) de Porto Alegre e no Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O processo de extração de DNA foi realizado na PUC, entretanto a determinação do sexo foi feita na UFRGS.

A extração do DNA se deu de três maneiras. As primeiras 30 amostras foram extraídas conforme protocolo do kit *DNeasy Tissue Kit* (Anexo 1). Foi também utilizado o protocolo de extração com fenol-clorofórmio (Anexo 2). As últimas extrações foram feitas segundo protocolo específico usado no laboratório da UFRGS que utilizava CTAB (Anexo 3).

A etapa de determinação do sexo foi realizada na UFRGS. As amostras analisadas utilizaram os primers 2550F e 2718R (FRIDOLFSSON E ELLEGREN, 1999). Após passar pelo processo de amplificação, o DNA foi colocado em gel de acrilamida 6% e submetido à corrente elétrica (35mA por 1h45min). Como resultado, obteve-se a formação das bandas que indicam o sexo. Espera-se uma única banda representando macho e duas representando fêmea (Figura 6).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguiu procedimento padrão do laboratório utilizado para amplificação dos genes sexuais de aves. O protocolo é: 5 minutos a 94°C, seguido de 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 46°C por 1 minuto, uma extensão

de 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. O DNA de cada amostra foi quantificado através de Espectrofotômetro e diluições foram feitas até obter-se a quantidade de 25 ng/μL de DNA.

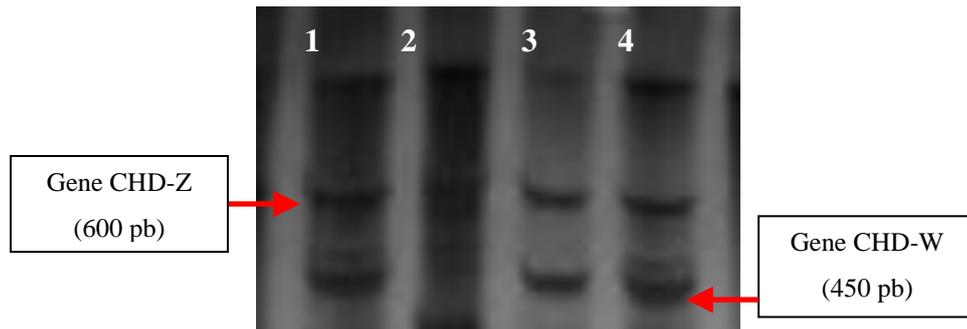


Figura 6. As setas indicam a amplificação dos genes CHD-Z (600 pb), no cromossomo Z e CHD-W (450 pb), no cromossomo W. A presença de duas bandas determina fêmea (1, 3 e 4). Uma banda representa macho (2).

FONTE: Autora, 2011.

3 RESULTADOS

No total, foram amostrados 38 indivíduos da espécie *Calonectris diomedea*, coletados no litoral do Rio Grande do Sul entre os anos de 2009 e 2011. Dentre estes, 19 apresentaram falha na amplificação dos genes, não sendo possível determinar o sexo. Provavelmente a qualidade da amostra influenciou este resultado, já que alguns espécimes foram coletados já em alto grau de decomposição, ou seja, com o DNA muito degradado.

Foi possível a determinação do sexo em 19 indivíduos, representando 50% da amostra. Destes, 11 (57,8%) foram classificados como machos e 8 (42,2%) como fêmeas. Este resultado representa uma razão sexual de 1,375 machos: 1 fêmea na amostra. Entretanto, dado o pequeno tamanho amostral não é possível afirmar se essa proporção entre os sexos desvia da esperada (1:1).

Tanto machos quanto fêmeas foram encontrados nos meses esperados para esta espécie (dezembro a maio). Evidenciou-se maior número de machos encontrados no mês de maio (n=5) em detrimento de fêmeas (n=1). Fêmeas foram mais comuns entre os meses de dezembro a abril, sendo apenas uma encontrada no mês de maio. Todavia, como dito anteriormente, o número amostral é muito baixo, não sendo possível afirmar que seja uma frequência dentro da espécie.

Um total de 25 monitoramentos foi realizado, onde em alguns meses nenhum exemplar de *C. diomedea* foi encontrado. A Tabela 1 mostra o número de indivíduos encontrados em cada mês e quantos puderam ter o sexo determinado.

Tabela 1. Tabela mostrando o número de indivíduos encontrados em cada mês de monitoramento (continua).

Mês	Número de indivíduos	Machos sexados	Fêmeas sexadas
fev-09	1	0	1
Março a novembro/ 2009	0	0	0
dez-09	3	1	2
jan-10	1	1	0
fev-10	0	0	0
mar-10	2	1	1
abr-10	1	0	1
mai-10	25	5	1

Mês	Número de indivíduos	Machos sexados	Conclusão
			Fêmeas sexadas
junho a outubro/ 2010	0	0	0
nov-10	2	0	2
dez-10	1	1	0
jan-11	1	1	0
fev-11	1	1	0

FONTE: Autora, 2011

4 DISCUSSÃO

4.1 A PRESENÇA DA ESPÉCIE NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

A migração é uma atividade extremamente importante na vida das aves marinhas. Elas atravessam milhares de quilômetros entre as áreas de reprodução e alimentação duas vezes por ano. Os cálculos da migração devem levar em conta os gastos em relação ao tempo e distância. Nesse sentido, as aves migratórias utilizam as correntes de ventos para otimizar suas viagens. Às vezes uma rota mais curta pode apresentar ventos desfavoráveis, enquanto que uma viagem mais longa pode gerar um menor custo de energia por contar com o auxílio dos ventos. González-Solís *et al.* (2009) demonstraram que *C. diomedea* perfaz uma rota migratória das Ilhas Canárias à Corrente de Benguela um pouco maior do que se esperaria em função do menor custo energético que tal rota lhe proporciona. Também registraram que apesar das rotas pelo centro do Atlântico serem mais curtas são evitadas, pois apresentam águas oligotróficas e pobres em peixes e cefalópodes epipelágicos. As rotas utilizadas são as que passam mais perto da costa do Brasil. Nos meses em que essa espécie costuma aparecer na costa do Rio Grande do Sul, a Corrente das Malvinas (com águas mais frias) encontra-se deslocada mais ao sul desta região (Figura 8), o que poderia explicar a sua presença no estado e até a Argentina. Sabe-se que esta corrente apresenta águas com uma riqueza muito alta de nutrientes, podendo ser o motivo pelo qual os espécimes escolhem perfazer esta rota. (VOOREN e FERNANDES, 1989).

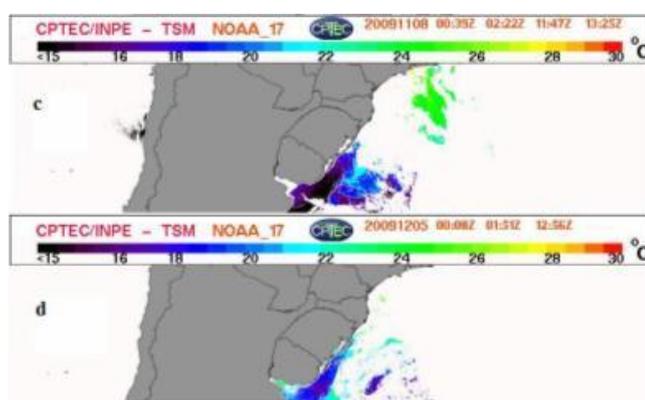


Figura 8. Imagens do Satélite NOAA 17 referentes à Temperatura Superficial do Mar indicando a Corrente das Malvinas. **c:** novembro, **d:** dezembro.

Fonte: Extraído e modificado de Nunes, 2010.

4.2 RAZÃO SEXUAL

A razão sexual assimétrica tem se mostrado comum em Procelariiformes. Em estudo com albatrozes e petréis, essa assimetria mostrou-se evidente, entretanto dependente das características das espécies analisadas. Isso pode ser devido à distribuição diferencial entre os sexos no mar imposta pela hierarquia do macho, ou pela agressividade, dependendo da espécie (BUGONI, GRIFFITHS E FURNESS, 2010).

Adicionalmente, os autores acima citados, concordam com afirmação de que o dimorfismo sexual pode influenciar a proporção sexual assimétrica. Neste sentido, espécies com maior dimorfismo sexual apresentam maior diferença entre o número de machos e fêmeas nas áreas pós-reprodutivas. As espécies mais similares morfologicamente tendem a apresentar uma razão sexual mais próxima de 1:1.

Em estudo sobre a migração da espécie *C. leucomelas*, Takahashi *et al.* (2008) relataram a diferença entre os sexos na época da dispersão da colônia reprodutiva após acasalamento. Os autores mostraram que fêmeas dispersavam antes dos machos. Também que possivelmente o que poderia determinar os lugares de migração é a busca por alimento. Estas duas observações podem representar uma estratégia das fêmeas para compensar as possíveis desvantagens na competição com machos nas áreas de forrageamento. A partir disso, poderia-se explicar a presença de fêmeas nos meses de dezembro a abril no estado através da hipótese de um possível deslocamento causado pela competição com machos na região em que se encontra a Corrente das Malvinas, ou seja, mais ao sul do Rio Grande do Sul. Sabe-se que essa corrente tem alta riqueza de nutrientes que atrai muitas espécies de aves e é sazonal na região do estudo. Ela é a corrente predominante nos meses de inverno, porém perde força nos meses de verão, ficando na região do Uruguai e Argentina (VOOREN e FERNANDES, 1989). É na época de verão que a espécie costuma aparecer e onde foram encontradas mais fêmeas, apesar de no total da amostra serem em baixo número.

Jouanin *et al.* (2001) estudaram o período da pré-postura em *C. diomedea* e relataram que fêmeas ficam mais tempo ausentes das ilhas reprodutivas, provavelmente forrageando devido ao gasto energético da ovipostura. Elas precisam ter um peso maior do que o de épocas não reprodutivas para evitar uma queda letal na época do jejum imposto por este período. Os machos ficam menos tempo ausentes, porém chegam após as fêmeas nas ilhas de reprodução, praticamente na época em que se inicia a temporada reprodutiva. Possivelmente, é nesta época

que as fêmeas fazem efetivamente suas reservas, aproveitando a ausência dos machos para caçarem presas maiores. A chegada tardia dos machos pode ser o resultado da saída, também tardia, de áreas de forrageio como o Rio Grande do Sul, explicando a maior presença de machos no mês de maio (mês que inicia a temporada reprodutiva) encontrada neste estudo, embora o número amostral possa não representar a realidade.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo teve seu objetivo atingido ao alcançar a determinação do sexo de parte dos espécimes encontrados mortos no litoral do Rio Grande do Sul. Esta informação contribui para o conhecimento a respeito dos padrões da espécie durante épocas não reprodutivas em áreas de forrageio.

Os resultados aqui apresentados se referem a uma amostragem bastante pequena. Apesar de embasados na literatura científica atual, as questões aqui levantadas a respeito da proporção sexual dos indivíduos de *C. diomedea* na costa do Rio Grande do Sul são apenas hipóteses. Neste sentido, futuros estudos sobre a espécie na costa do Brasil que tratem do comportamento, da biologia, dos padrões de migração e das rotas utilizadas pelos indivíduos precisam ser realizados.

Com este trabalho espera-se despertar maior interesse na investigação dos hábitos gerais de *Calonectris diomedea* na costa do Rio Grande do Sul visto a pouca informação que se tem da espécie na região.

REFERÊNCIAS

ALONSO, H. *et al.* Moulting strategies of Cory's Shearwaters *Calonectris diomedea borealis*: the influence of colony location, sex and individual breeding status. **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.150, n.2, p. 329-337, 2009. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/q13242x53x471k14/>>. Acesso em 20 out. 2010.

AZEVEDO, S. M. A. J. *et al.* Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. **Ararajuba**, Rio de Janeiro, RJ., v.9, n.1, p. 33-42, 2001. Disponível em <<http://www.ararajuba.org.br/sbo/ararajuba/artigos/Volume91/ara91art5.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2010.

BELTON, W. **Aves do Rio Grande do Sul: distribuição e biologia**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1994. 584 p.

BENCKE, G. A. **Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2001. 102 p.

BUGONI, L.; GRIFFITHS, K. e FURNESS, R. W. Sex-biased incidental mortality of albatrosses and petrels in longline fisheries: differential distributions at sea or differential access to baits mediated by sexual size dimorphism? **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/d23x6567077j1g2x/>>. Acesso em: 07 jan. 2011.

CALLIARI, L. *et al.* Rio Grande do Sul. In: MUEHE, D. (Org.). **Erosão e progradação no litoral brasileiro**. Brasília: MMA, 2006. p. 437-475.

CATRY, P. *et al.* Brood-guarding behaviour in Cory's Shearwaters *Calonectris diomedea*. **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.150, n. 1, p. 103-108, 2009. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/y513763278466874/>>. Acesso em: 20 out. 2010.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Listas das aves do Brasil**. 9. ed. 2010. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 10 out. 2010.

DALL'ANTONIA, L. *et al.* The homing behaviour of Cory's Shearwaters (*Calonectris diomedea*) studied by means of a direction recorder. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, Inglaterra, v. 198, p. 359-362, 1995. Disponível em <<http://jeb.biologists.org/content/198/2/359.short>>. Acesso em: 16 fev. 2011.

FRIDOLFSSON, A. K. e ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology**, Copenhagen, DK., v. 30, n. 1, p. 116-121, 1999. Disponível em <<http://www.jstor.org/pss/3677252>>. Acesso em: 28 out. 2010.

GÓMEZ-DÍAZ, E. *et al.* Phylogeography of the *Calonectris* shearwaters using molecular and morphometric data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, Fla., v. 41, n.2 p. 322-332, 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790306001801>>. Acesso em: 15 out. 2010.

GONZÁLEZ-SOLÍS, J. *et al.* Influence of sea surface winds on shearwater migration detours. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, Alemanha, v. 391, p. 221-230, 2009.

GRANADEIRO, J. P. *et al.* Mysterious attendance cycles in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*: an exploration of patterns and hypotheses. **Animal Behaviour**, London, GB, v.78, n. 6, p. 1455-1462, 2009. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347209004448> >. Acesso em: 20 out. 2010.

GRIFFITHS, R. *et al.* A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, Oxford, Inglaterra, v. 7, p. 1071-1075, 1998. Disponível em <<http://seq.ege.fcen.uba.ar/materias/ecomoleculareMaterial/Comportamiento.%20Paternidad%20y%20sistemas%20de%20apareamiento/bibliografia/Griffiths%20et%20al%201998.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

INTERNATIONAL ORNITHOLOGICAL COMMITTEE. **World Bird List**. Version 2.6. Disponível em < <http://www.worldbirdnames.org/names.html>>. Acesso em: 20 out. 2010.

JOUANIN, C. *et al.* Prelaying exodus of Cory's Shearwaters (*Calonectris diomedea borealis*) on Selvagem Grande. **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.142, n. 2, p. 212-217, 2001. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0361.2001.00073.x/full>>. Acesso em: 20 out. 2010.

LIMA, P. C. *et al.* Notas sobre os registros brasileiros de *Calonectris edwardsii* (Oustalet, 1883) e *Pelagodroma marina hypoleuca* (Moquin-Tandon, 1841) e primeiro registro de *Phalacrocorax bransfieldensis* Murphy, 1936 para o Brasil. **Ararajuba**, Rio de Janeiro, RJ., v. 10, n. 2, p. 263-265. 2002. Disponível em <<http://www.ararajuba.org.br/sbo/ararajuba/artigos/Volume102/ara102CBRO2.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2010.

MOUGIN, J. L. Factors affecting egg dimensions and breeding success in the Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*) of Selvagem Grande. **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.139, n.2, p. 179-184, 1998. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/k47125k068775585/>>. Acesso em: 20 out. 2010.

MOUGIN, J. L. Pairing in the Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*) of Selvagem Grande. **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.141, n. 3, p. 319-326, 2000. Disponível em < <http://www.springerlink.com/content/265k62510m621623/>>. Acesso em: 09 jan. 2011.

MOUGIN, J. L.; JOUANIN, C. e ROUX, F. Inexperienced birds and breeding in the Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*). **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.143, n.1, p. 57-63, 2002. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0361.2002.01003.x/full>>. Acesso em: 19 out. 2010.

NAVARRO, J.; KALIONTZOPOULOU, A. e GONZÁLEZ-SOLÍS, J. Sexual dimorphism in bill morphology and feeding ecology in Cory's shearwater (*Calonectris diomedea*). **Zoology**, Agra, Índia, v. 112, n. 2, p. 128-138, 2009. Disponível em

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944200608000755>>. Acesso em: 21 set. 2010.

NUNES, G. T. **Determinação da proporção sexual do pinguim-de-Magalhães *Spheniscus magellanicus* na costa do Rio Grande do Sul, Brasil, através de técnicas moleculares.**

Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé, 2010

OLMOS, F. Non-breeding seabirds in Brazil: a review of band recoveries. **Ararajuba**, Rio de Janeiro, RJ., v. 10, n. 1, p. 31-42. 2002. Disponível em

<<http://www.ararajuba.org.br/sbo/ararajuba/artigos/Volume101/ara101art4.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2010.

PATTESON, J. B. e ARMISTEAD, G. L. First Record of Cape Verde Shearwater (*Calonectris edwardsii*) for North America. **North American Birds**, Colorado Springs, Colo., v. 58, n. 4, p. 468-473, 2004.

PETRY, M. V. *et al.* Diet and ingestion of synthetics by Cory's Shearwater *Calonectris diomedea* off southern Brazil. **Journal of Ornithology**, Lawrence, Kan., v.150, n.3, p. 601-606, 2009. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/t514604304540551/>>. Acesso em: 27 out. 2010.

PORTER, R. *et al.* Identification of Cape Verde Shearwater. **Birding World**, v. 10, p. 222–228, 1997.

TAKAHASHI, A. *et al.* Post-breeding movement and activities of two Streaked Shearwaters in the north-western Pacific. **Ornithological Science**, v. 7, n. 1, p. 29-35, 2008. Disponível em <[http://www.bioone.org/doi/abs/10.2326/1347-0558\(2008\)7%5B29:PMAAOT%5D2.0.CO%3B2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.2326/1347-0558(2008)7%5B29:PMAAOT%5D2.0.CO%3B2)>. Acesso em: 03 mar. 2011.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Vol.1. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 1984.

- VILLWOCK, J. A. Geology of the coastal province of Rio Grande do Sul, southern Brazil: a synthesis. **Pesquisas**, Porto Alegre, n. 16, p. 5-49. 1984.
- VOOREN, C. M. e FERNANDES, A. C. **Guia de albatrozes e petréis do sul do Brasil**. Porto Alegre: Sagra, 1989. 99 p.: il.
- YAMAMOTO, T. *et al.* The lunar cycle affects at-sea behaviour in a pelagic seabird, the streaked shearwater, *Calonectris leucomelas*. **Animal Behaviour**, London, GB., v. 76, n. 5, p. 1647-1652, 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347208003497>>. Acesso em: 03 mar. 2011.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de Extração de DNA de tecidos por *DNeasy and tissue Kit*

I. Antes do início da extração:

1. Verificar se os tampões ATL e AL têm precipitados. Se tiver, incubá-los a 56°C até os precipitados dissolverem.
2. Tampões AW₁ e AW₂ são concentrados. Adicionar quantidade apropriada de etanol (96-100%).
3. Preparar banho de agitação a 55°C para usar no passo 2 e um banho a 70°C para usar no passo 3.

II. Passos:

1. Cortar 20-25mg de tecido em pequenos pedaços (ou triturar com nitrogênio líquido) e colocar em tubo de 1,5 mL e adicionar 180µL de tampão ATL.
2. Adicionar 20 µL de proteinase K, misturar por vórtex (5-10 segundos) e incubar a 56°C até o tecido ser completamente lisado. Vorteczar ocasionalmente durante a incubação para dispersar a amostra ou colocar num banho de agitação ou no *shaker* (1-3 horas). Tempo de lise varia dependendo do tipo, idade e quantidade de tecido sendo processado. A lise é usualmente completa em 1-3 h ou 6-8 h, mas melhores resultados serão obtidos depois de lise *overnight*.

Obs: O lisado não deve parecer gelatinoso.

Opcional: Adicionar 4 µL de RNase A (100 mg/mL), misturar por vórtex e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente (15-20°C).

3. Vorteczar por 15 segundos. Adicionar 200 µL de tampão AL à amostra, misturar completamente por vórtex.

Obs: A amostra e o tampão devem ser misturados imediatamente para produzir uma solução homogênea. Um precipitado branco deve se formar na adição do tampão AL, o qual se dissolverá durante a incubação em 70°C.

4. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) à amostra e misturar completamente por vórtex.

Obs: Um precipitado branco deve se formar. É essencial aplicar todo o precipitado ao *DNeasy mini spin column*.

5. Pipetar a mistura do passo 4 para dentro do *DNeasy mini spin column* colocado em um tubo de coleção (*collection tube*) de 2mL fornecido. Centrifugar em 8000 RPM por 1 minuto. Descartar o tubo de coleção com o fluxo passado.

6. Colocar o *DNeasy mini spin column* em um novo tubo de coleção, adicionar 500µL de tampão AW₁, e centrifugar por 1 minuto (8000 RPM). Descartar o tubo de coleção com o fluxo passado.

7. Colocar o *DNeasy mini spin column* em um tubo de coleção de 2mL (fornecido), adicionar 500 µL de tampão AW₂ e centrifugar por 3 minutos (14000 RPM) para secar a membrana *DNeasy*. Descartar o tubo de coleção com o fluxo passado.

Obs: Essa centrifugação garante que nenhum etanol residual será carregado durante a eluição. Muito cuidado para remover o *DNeasy mini spin column* para não entrar em contato com o fluxo passado.

8. Colocar o *DNeasy mini spin column* em um tubo de 1,5 ou 2 mL (não fornecido no kit) e pipetar 200 µL de tampão AE diretamente na membrana *DNeasy*. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto e então centrifugar por 1 minuto (8000 RPM) para eluir.

Obs: Eluição com 100 µL (ao invés de 200 µL) aumenta a concentração final de DNA, mas diminui o produto de DNA total.

9. Repetir eluição uma vez como descrito no passo 8.

Obs: Um novo tubo deve ser usado para a segunda eluição para evitar diluição do primeiro eluído. Alternativamente, o tubo do passo 8 pode ser usado para a segunda eluição.

Anexo 2: Protocolo de extração de DNA (modificado) com fenol-clorofórmio

1. Colocar picado de 20 mg de tecido em um tubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 430 µL de tampão de lise STE.
3. Adicionar 22,5 µL de proteinase K (20 mg/mL).
4. Incubar a 65°C por 3 horas ou até digerir o tecido (com agitação 200 RPM).
5. Desproteínizar com uma mistura de um volume (450 µL) de fenol-clorofórmio (3:1) e centrifugar por 10 minutos (14000 RPM).

Fenol-clorofórmio (3:1)

75% Fenol = 337,5 μ L

25% Clorofórmio = 112,5 μ L

Clorofórmio-álcool isoamílico (24:1)

6. Transferir sobrenadante para outro tubo de 1,5 mL (descartar fundo).
7. Adicionar um volume (450 μ L) de clorofórmio e centrifugar por 10 minutos (14000 RPM).
8. Transferir sobrenadante para outro tubo de 1,5 mL (descartar fundo).
9. Adicionar um volume (450 μ L) de isopropanol gelado.
10. Incubar a -20°C por 30 minutos (*freezer*).
11. Centrifugar por 10 minutos (14000 RPM).
12. Inverter e secar (banho seco a 55°C – *low*).
13. Ressuspender em 50 μ L de água mili-Q.
14. Deixar ressuspendendo sobre a bancada ou em geladeira (*overnight*).

Anexo 3: Protocolo de extração de DNA – CTAB

I. Extração:

1. Colocar o tecido em um tubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 500 μ L de CTAB.
3. Adicionar 15 μ L de proteinase K.
4. Incubar em banho-maria a 60°C *overnight*.

II. Limpeza:

1. Adicionar clorofórmio-álcool isoamil (24:1) em um volume igual ao do CTAB.
2. Inverter o tubo gentilmente por 2 minutos.
3. Centrifugar por 10 minutos a 15000 RPM.
4. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL previamente identificado, quantificando o volume de sobrenadante retirado.

III. Precipitação:

1. Adicionar $2/3$ do volume de etanol absoluto ao sobrenadante em cada tubo (por exemplo, se foi retirado 450 μL de sobrenadante, adicionar 300 μL de etanol).
2. Deixar precipitando 1 hora a -20°C ou *overnight*.

IV. Lavagem:

1. Centrifugar por 10 minutos a 15000 RPM.
2. Descartar gentilmente o sobrenadante.
3. Adicionar 500 μL de etanol 70%.
4. Centrifugar por 10 minutos a 15000 RPM.
5. Descartar gentilmente o sobrenadante.

V. Secagem:

1. Deixar os tubos abertos sobre o papel toalha a temperatura ambiente para o precipitado de DNA secar.
2. Quando o *pellet* estiver seco, adicionar 100 μL de TE 1x.
3. Incubar os tubos na estufa a 60°C por no mínimo 20 minutos para completa eluição do DNA.