

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Populações brasileiras da espécie exótica invasora
Bubulcus ibis: distribuição da diversidade genética
avaliada pelos microssatélites

EMELINE BONI CAMPANINI

São Carlos - SP

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

EMELINE BONI CAMPANINI

Populações brasileiras da espécie exótica invasora
Bubulcus ibis: distribuição da diversidade genética
avaliada pelos microssatélites

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientação: Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama

São Carlos - SP

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C186pb

Campanini, Emeline Boni.

Populações brasileiras da espécie exótica invasora
Bubulcus ibis : distribuição da diversidade genética
avaliada pelos microssatélites / Emeline Boni Campanini. --
São Carlos : UFSCar, 2011.
101 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Genética de populações. 2. Invasão biológica. 3.
Diversidade genética. 4. Genética de aves. 5. Isolamento de
microssatélites. 6. Amplificação cruzada. I. Título.

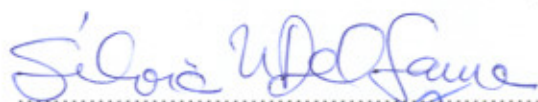
CDD: 575.15 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

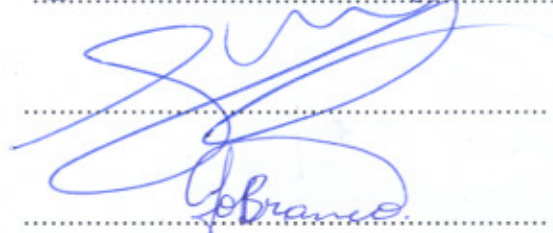
Dissertação de Mestrado de EMELINE BONI CAMPANINI

Banca Examinadora

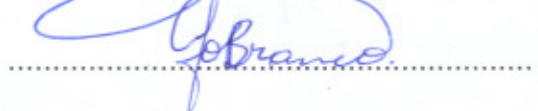
Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama


.....

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes


.....

Prof. Dr. Joaquim Olinto Branco


.....

Dedico esse trabalho aos meus pais Rubens e Rosemeire, aos meus irmãos Andrei e Eike, e a Daniel Italiano, por todo o amor, apoio, compreensão e pela fé incondicional que sempre depositaram em meus sonhos...

"Sim, diz o comedido capelão, o processo histórico que vos deu origem é destruidor, cruel e vil. Mas exultem com a vossa existência, porque esse mesmo processo cometeu involuntariamente o grave erro de negar-se a si mesmo. Trata-se, por certo, de uma negação local, pequena, somente: apenas uma espécie, e somente uma minoria dos membros dessa espécie. Mas ainda assim, há uma esperança. Exultem ainda mais porque o algoritmo grosseiro e cruel da Seleção Natural deu origem a uma máquina capaz de internalizar esse mesmo algoritmo, erigindo um modelo de si mesma - e, mais que isso, erigindo-o num microcosmo no interior do crânio humano."

(Richard Dawkins)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama, pela orientação e presença constante, pela amizade, confiança e por toda a ajuda com a qual sempre pude contar.

À UFSCar e ao programa de pós-graduação em *Genética Evolutiva e Biologia Molecular*.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes e Prof. Dr. Joaquim Olinto Branco, pela atenção nas correções e pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos meus tios, avós e primos, que sempre acreditaram em mim, me apoiando em todas as minhas decisões.

À Alexandra Sanches e ao Emmanuel Moralez da Silva pela amizade, carinho e valiosa ajuda que sempre me ofereceram durante todo o trabalho.

Aos docentes com os quais tive o prazer de cursar disciplinas, em especial ao Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito e ao Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, que ministraram as disciplinas mais interessantes e estimulantes que já tive em toda a minha experiência acadêmica.

À Profa. Dra. Terumi Hatanaka e ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva e seus alunos Fernando Fonseca e Danyelle Toyama pela ajuda durante a construção das bibliotecas genômicas.

Ao Centro Nacional de Pesquisas para a Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE) e ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) pela concessão das licenças para coleta e transporte das amostras utilizadas neste estudo.

Aos colaborados nas coletas: Scherezino Scherer (IBAMA/RS), Roberta Rodrigues (UFPE/CEMAVE) e Jean Carlos Ramos da Silva (UFRPE).

Aos queridos amigos do Laboratório de Genética de Aves: Andiana Silos, Carlos Castillo, Carolina Miño, Cynthia Villar, Elaine Dantas, Jorge Malaver e Thaís Correa pela amizade, ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Também aos amigos dos outros laboratórios, em especial: Aline Galindo, Alline Braga, Ana Carolina Arantes, Antônio Bergamaschi, Juliana Afonso, Juliano Almeida, Natália Cerântola e Savana Diegues.

À Vanessa Morgan e ao Marcelo Cervini pela ajuda com as genotipagens.

Às secretárias do programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Greissi, Heloísa e Ivanildes, por todo o auxílio e atenção que sempre nos prestaram.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Evolução.

Aos meus amigos de São Carlos, que não vou citar nomes porque felizmente são muitos, aos amigos desde a infância, aos amigos dos treinos, das baladas, com quem muitas vezes dividi a pressão nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de Jaboticabal: Alessandra Otuka, Ana Paula Battel, Andrezza Rodrigues, Fernanda Lima, Jéssica Santos, Lucas Peres, Maria Laura Pereira, Mariana Lima, Mariana Ragazzi e Rodolfo Almeida, pela amizade que a distância não consegue diminuir.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*) é uma ave de médio porte, de origem africana, considerada espécie exótica invasora no continente americano. No Brasil, o primeiro registro foi na região norte, em 1964. A espécie vem mantendo um padrão de crescimento populacional constante, ameaçando a reprodução e sobrevivência de outras espécies nativas, como observado no arquipélago de Fernando de Noronha. Os objetivos desse trabalho foram isolar locos de microssatélites específicos para a espécie e caracterizar geneticamente as populações brasileiras, iniciando um estudo que contribui para a compreensão do processo de colonização ocorrido no país. Com esse intuito, foram construídas duas bibliotecas genômicas parciais enriquecidas, cujos fragmentos gerados foram posteriormente sequenciados e analisados quanto à presença de sequências de microssatélites, sendo de 15,74% a eficiência de clonagem. Foram selecionados 32 locos de microssatélites para as análises, dos quais 11 mostraram-se polimórficos. O conteúdo de informação polimórfica para esses locos variou de 0,079 à 0,453. Fragmentos de tamanho esperado foram amplificados nos onze locos polimórficos em outras seis espécies da mesma família. Seis populações de diferentes latitudes do país foram genotipadas em sete locos polimórficos. Uma baixa variabilidade foi encontrada, com valores médios de heterozigosidade esperada variando de 0,408 à 0,562 nas populações. A população detentora de maior diversidade foi a da região norte, mais próxima do ponto do local do primeiro registro histórico da espécie no país. Foi detectada baixa estruturação genética pela AMOVA e alguns valores de F_{st} e R_{st} par-a-par se mostraram significativos quando o par incluía populações da região sul e norte do país. O tamanho efetivo (N_e) da população brasileira foi de 6,6 indivíduos (95% CL:5,7-7,7). Os índices de diversidade e os parâmetros populacionais analisados não mostraram evidências de que a dispersão dos indivíduos tenha ocorrido segundo um eixo- norte-sul, mas sim de maneira oportunista e errática. A população de Fernando de Noronha, que vem sendo manejada por um programa de controle populacional desde 2007, apresentou níveis de diversidade e parâmetros populacionais comparáveis às populações do continente, o que indica que a espécie não será facilmente exterminada nessa área.

Palavras-chave: AMPLIFICAÇÃO CRUZADA; BIONVASÃO; DIVERSIDADE GENÉTICA; GARÇA-VAQUEIRA; ISOLAMENTO DE MICROSSATÉLITES.

ABSTRACT

The Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) is a median sized bird, of African origin, considered as an invasive and exotic species in the American continent. In Brazil, first record was in the north, in 1964. The species have been maintaining a pattern of constant population growth, endangering the reproduction and survivorship of native species, as observed in the archipelago of Fernando de Noronha. The purposes of this work were the isolation of microsatellite *loci* for the species in question and to genetically characterize Brazilian populations, as a starting point in a study that contributes for the comprehension of the colonization process occurred in the country. Thereafter, two partially enriched genomic libraries were obtained, in which the generated fragments were posteriorly sequenced and analyzed for the presence of microsatellite sequences; being the cloning efficacy of 15.74%. Thirty-two microsatellite *loci* were selected for the analysis, of which eleven proved to be polymorphic. Content of polymorphic information for these *loci* varied between 0.079 and 0.453. Fragments of expected size were amplified in the eleven polymorphic *loci* in other six species from the same family as the Cattle Egret. Six populations from different latitudes in the country were genotyped in seven polymorphic *loci*. A low variability was found, with mean values of expected heterozygosity in the populations varying between 0.408 and 0.562. The population holding the higher diversity was the northern one, closest to the point of the first historic record of the species in the country. Low genetic structuring by AMOVA was detected, and some values of pairwise F_{st} and R_{st} proved to be significant when the pair contained populations from South and North of the country. Effective size (N_e) of the Brazilian population was 6.6 individuals (95% CL: 5.7-7.7). Diversity indices and population parameters analyzed did not show evidence that the dispersion of individuals occurred in a north-south axis, occurring more in an opportunistic and erratic manner. Fernando de Noronha's population, which have been managed by a population control program since 2007, presented diversity levels and population parameters comparable to the mainland populations, what indicates that the species will not be easily eliminated from this area.

Key-words: BIOINVASION; CATTLE EGRET; CROSSED AMPLIFICATION; GENETIC DIVERSITY; MICROSSATELLITE ISOLATION.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das amostras de <i>Bubulcus ibis</i> utilizadas no presente trabalho.....	35
Tabela 2. Locos de microssatélites heterólogos testados.....	42
Tabela 3. Número de microssatélites encontrados nessa prospecção de acordo com o motivo da unidade repetitiva.....	48
Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para os 32 locos de microssatélites em <i>Bubulcus ibis</i>	49
Tabela 5. Características dos 11 locos polimórficos encontrados para <i>Bubulcus ibis</i> , a partir de 35 indivíduos da população de Rio Claro (SP).....	53
Tabela 6. Resultados dos testes de amplificação cruzada com os locos isolados para <i>Bubulcus ibis</i>	54
Tabela 7. Alelos e frequências alélicas por loco e por população.....	56
Tabela 8. Estimativas de diversidade genética baseadas nos dados dos sete locos de microssatélites específicos.....	58
Tabela 9. Parâmetros intra-populacionais obtidos a partir dos dados dos sete locos específicos.....	60
Tabela 10. Distâncias genéticas de Nei entre as populações, estimadas usando as frequências alélicas nos sete locos de microssatélites específicos de <i>Bubulcus ibis</i>	61
Tabela 11. Valores de F_{st} (abaixo da diagonal) e R_{st} (acima da diagonal) estimados para os pares de populações.....	63
Tabela 12. Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total presente nas populações.....	64
Tabela 13. Dados do isolamento de locos de microssatélites para algumas espécies das famílias Ardeidae e Threskiornithidae, em comparação aos dados obtidos para <i>Bubulcus ibis</i>	70

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Adulto de <i>Bubulcus ibis</i> apresentando plumagem típica da época de reprodução.....	16
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Bubulcus ibis</i>	19
Figura 3. Registros de avistamento e reprodução na América do Sul.....	22
Figura 4. Pontos de coleta de amostras de <i>Bubulcus ibis</i> no Brasil.....	36
Figura 5. Ilustração de uma pena de ave, com destaque para a região do desenvolvimento.....	37
Figura 6. Gel de agarose 1% mostrando as bandas do DNA genômico, extraído de 13 amostras de sangue da população de Rio Claro (SP).....	46
Figura 7. Gel de agarose 1% mostrando as bandas do DNA genômico, extraído de 13 amostras de penas da população de Manaus (AM).....	46
Figura 8. Alinhamento das sequências correspondentes aos dois supostos alelos do loco Bi10.....	54
Figura 9. Parentesco médio observado para as populações de <i>Bubulcus ibis</i>	60
Figura 10. Dendograma UPGMA construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978) com os dados dos sete locos de microssatélites específicos de <i>Bubulcus ibis</i>	61
Figura 11. Diagrama <i>bar plot</i> fornecido pelo STRUCTURE 2.3.1.....	62
Figura 12. Distribuição da diversidade genética segundo a análise AMOVA.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Sistemática e características da espécie <i>Bubulcus ibis</i>	15
1.2. A invasão do continente americano por <i>Bubulcus ibis</i> , com ênfase no território brasileiro.....	20
1.3. Marcadores Microsatélites.....	25
1.4. A proposta do trabalho.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Área de estudo e coleta das amostras.....	35
4.2. Extração de DNA das amostras biológicas de <i>Bubulcus ibis</i>	37
4.3. Isolamento de locos de microsatélites na espécie <i>Bubulcus ibis</i>	38
4.4. Testes de amplificação para genotipagem dos locos de microsatélites.....	40
4.5. Análise do grau de polimorfismo dos locos isolados e testes de amplificação cruzada.....	41
4.6. Testes de amplificação e genotipagem dos locos heterólogos.....	41
4.7. Análise dos Dados.....	43
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Extração e quantificação do DNA.....	46
5.2. Isolamento dos locos de microsatélites para <i>Bubulcus ibis</i>	47
5.2.1. Isolamento dos locos de microsatélites e otimização das reações de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados.....	47
5.2.2. Caracterização dos locos quanto ao grau de polimorfismo e amplificação cruzada.....	52
5.3. Análises populacionais.....	55
5.3.1. Avaliação do grau de polimorfismo nos locos de microsatélites heterólogos.....	55
5.3.2. Frequências alélicas e estimativas de diversidade genética.....	55
5.3.3. Parâmetros populacionais.....	59
5.3.4. Análise de diferenciação genética entre as populações.....	61

6. DISCUSSÃO.....	65
6.1. Amostras e extração do DNA.....	65
6.2. Isolamento e caracterização dos locos de microssatélites específicos.....	67
6.2.1. Locos de microssatélites específicos desenvolvidos para <i>Bubulcus ibis</i> ...	67
6.2.2. Grau de polimorfismo dos locos de microssatélites e amplificação cruzada.....	70
6.3. Análises populacionais.....	72
6.3.1. Locos heterólogos testados para <i>Bubulcus ibis</i>	72
6.3.2. Variabilidade genética das populações estudadas.....	75
6.3.3. Parâmetros populacionais.....	77
6.3.4. Análise de diferenciação genética entre as populações.....	80
6.3.5. Inferências sobre a colonização do Brasil por <i>Bubulcus ibis</i>	82
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemática e características da espécie *Bubulcus ibis*

A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*) (LINNAEUS, 1758) (Pelecaniformes: Ardeidae), é uma ave de porte médio, cujo nome popular se deve à sua estreita associação com mamíferos de hábito pastador, principalmente bovinos (HÖFLING; CAMARGO, 2002). Essa garça é diferenciada das demais por sua baixa estatura, bico e pescoço mais curtos e por apresentar plumagem característica alaranjada durante o período de reprodução (HANCOCK; KUSHLAN, 1984).

A taxonomia da espécie está hoje bem definida, mas foi muito controversa. O gênero no qual estaria incluída foi assunto muito debatido pelo autores Bock (1956) e Payne e Risley (1976), com a inclusão alternativamente nos gêneros: *Ardea*, *Bubulcus* e *Egretta*. Trabalhos posteriores aos desses autores, como o desenvolvido por Sheldon (1987), utilizaram análise do DNA e estudos bioquímicos e indicaram que o vínculo genético maior da espécie era com outras espécies do gênero *Ardea*. Com base nesses trabalhos, durante muitos anos a espécie foi identificada como *Ardea ibis*.

Atualmente, a espécie é reconhecida pela American Ornithologists' Union (1983) como *Bubulcus ibis*, classificação primeiramente proposta por Bonaparte (1855) e corroborada por estudos filogenéticos posteriores. Foram identificadas três subespécies: (1) a subespécie africana *B. ibis ibis* (Linnaeus, 1758) oriunda da África e Madagascar, presente também no sudoeste da Europa e em todo o continente americano; (2) a subespécie asiática *B. ibis coromanda* (Boddaert 1783) presente do sul a oeste da Ásia e na Austrália, Nova Zelândia e no sul do Japão; e (3) *B. ibis seychellarum* (Salomonsen, 1934) presente apenas nas Ilhas Seychelles as quais estão isoladas no oeste do Oceano Índico. Uma mudança recente ocorreu na taxonomia da família Ardeidae, a qual pertence a espécie. Essa família era anteriormente classificada como pertencente à ordem Ciconiiformes (SIBLEY *et al.*, 1988), mas é agora

classificada como pertencente à ordem Pelecaniformes (CHESSER *et al.*, 2010). Nessa revisão, os autores incluíram as famílias Ardeidae e Threskiornithidae na ordem Pelecaniformes e mantiveram na ordem Ciconiiformes apenas a família Ciconiidae.

Quanto às características morfológicas, a espécie possui a plumagem quase totalmente branca, com manchas alaranjadas no alto da cabeça, peito e costas, as quais ficam acentuadas durante a época de reprodução (Figura 1). Essa coloração diferenciada permanece na plumagem do adulto, embora esmaecida, mesmo após o término da reprodução (HANCOCK; KUSHLAN, 1984; ANTAS, 2004). O bico amarelo e as patas, amarelo-acinzentadas tornam-se também mais alaranjados durante o período reprodutivo.



Figura 1. Adulto de *Bubulcus ibis* apresentando plumagem típica da época de reprodução. Fonte: Telfair (1994).

O adulto dessa espécie mede de 46 a 56 cm de altura e de 90 a 96 cm de envergadura. O peso varia de 270 a 510 g. Os machos geralmente são maiores do que as fêmeas e, na época reprodutiva, suas cores são mais intensas. As formas juvenis são semelhantes às dos adultos durante o descanso reprodutivo, apresentando uma plumagem com coloração cinzenta e pernas negras (HANCOCK; KUSHLAN, 1984).

B. ibis é uma espécie gregária, considerada a mais terrestre de todas as garças, pois consegue viver distante de corpos d'água, embora busquem proximidade das áreas alagadas para seu pouso e dormitório, assim como para os ciclos de nidificação. São altamente migratórias e, como não dependem particularmente do meio aquático, exploram diferentes biótopos, desde zonas relativamente secas até zonas úmidas. Normalmente estão associadas a zonas abertas, com vegetação rasteira e cursos de água. Evitam habitats costeiros e marinhos, frios e de águas profundas, zonas montanhosas e zonas extensas sem vegetação (MARFIM, 2000).

Essa ave captura seu alimento associando-se principalmente ao gado, apanhando os insetos que são espantados durante o deslocamento dos bovinos (HOFLING; CAMARGO, 2002). Estima-se que, com essa associação de protocooperação com o gado, um indivíduo pode obter até 50% a mais de alimento, utilizando-se de apenas dois terços da energia que normalmente gastaria sozinho (THOMPSON *et al.*, 1982). Pode ser observada ainda forrageando atrás de máquinas agrícolas (SICK, 1997). Segundo Telfair (1994), o forrageio ocorre quase que exclusivamente em bandos, sem territorialismo nos locais de alimentação.

Possui o hábito de subir no dorso dos bovinos, o que de acordo com Sick (1997) serve para ampliar seu campo de visão. Menezes e cols. (2004) observaram que além desse intuito, aproveitam para se alimentar de carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) ali presentes, o que também foi observado e descrito por McKilligan (2005). Apesar de ser primariamente insetívora, a dieta de *B. ibis* apresenta considerável diversidade, pois também se alimenta de invertebrados aquáticos, pequenos anfíbios, répteis e mamíferos e até de outras aves (GASSET *et al.*, 2000; HOCKEY *et al.* 2005).

A reprodução ocorre em colônias, muitas vezes junto com outras espécies de ardeídeos e ciconídeos. Uma colônia se inicia quando pequenos grupos de machos

estabelecem seus territórios, seguido de um aumento na agressividade desses machos e um comportamento de exibição para atrair os grupos de fêmeas. O período reprodutivo no Brasil varia de acordo com a latitude. Geralmente ocorre entre outubro e fevereiro nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (SICK, 1997) e entre julho e novembro nas regiões norte e nordeste (SOUZA; FREITAS, 1997; LIMA *et al.*, 1997). Os ciclos reprodutivos no nordeste, entretanto, podem se estender até março, como o ciclo da colônia encontrada em Mossoró (RN), em 2011 (LUNARDI, com. pessoal), ou até se prolongar por todo ano como afirma Nascimento (1999) para as colônias na Paraíba.

Apesar de serem consideradas socialmente monogâmicas, é possível encontrar temporariamente trios (um macho com duas fêmeas) no início da formação dos casais. O caráter monogâmico da espécie está em discussão, já que foram encontrados na subespécie asiática vários casos de cópula extra-par (CEP) (FUJIOKA; YAMAGISHI, 1981; MCKILLIGAN, 1990). Na cópula extra-par um indivíduo copula com outros indivíduos que não são os seus parceiros sociais. Dados de fertilizações extra-par (FEP) nessa espécie não estão ainda disponíveis na literatura.

O ninho consiste em uma plataforma de galhos e paus, construída em árvores e arbustos, podendo ser algumas vezes reutilizado em épocas reprodutivas posteriores. A construção é feita por ambos os progenitores, mas envolve tarefas distintas. A fêmea encarrega-se da construção propriamente dita, enquanto o macho recolhe o material necessário (BLAKER, 1969). A fêmea deposita de três a quatro ovos branco-azulados, os quais são alternadamente incubados por ambos os progenitores durante cerca de 24 dias (TELFAIR, 1993).

Macho e fêmea cuidam e alimentam os filhotes. Esses, por sua vez, se mostram muito competitivos entre si, até a fase em que atingem o desenvolvimento necessário para tornarem-se independentes (BLAKER, 1969). Isso ocorre por volta de 45 dias de

idade e, quando atingem aproximadamente 50 dias, os filhotes já são capazes de fazer voos para áreas mais distantes (SKEAD, 1966). Como a maioria dos ardeídeos, ao deixarem os ninhos os juvenis de *B. ibis* mostram uma dispersão não-direcional, o que favorece a expansão da espécie para novas áreas ainda não colonizadas (BROWDER, 1973; TELFAIR, 1994).

A espécie é cosmopolita (Figura 2) e já foi encontrada em todas as latitudes do continente americano, onde foi considerada espécie exótica invasora (HANCOCK; KUSHLAN, 1984). No Brasil, adaptou-se muito bem às condições ambientais e está presente em todas as regiões do país, associada às áreas onde mais se desenvolve a agropecuária (ANTAS, 2004). O seu grande poder de dispersão, seu comportamento alimentar oportunístico, bem como a falta de predadores naturais específicos (ALLENDORF; LUIKART, 2007) são fatores que têm favorecido seu rápido crescimento populacional em habitats brasileiros, o que poderá ser uma ameaça às espécies nativas que ocupam o mesmo nicho ecológico.

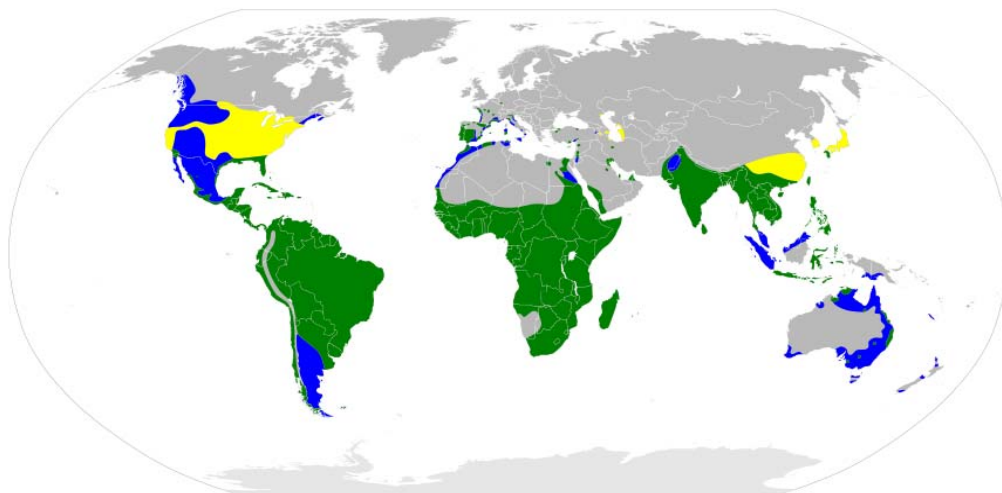


Figura 2. Distribuição geográfica de *Bubulcus ibis*. Em amarelo: áreas de ocorrência apenas na época de reprodução; em azul: áreas de ocorrência, sem registros de reprodução; e em verde: áreas de ocorrência e de reprodução. Fonte: Kushlan e Hancock (2005).

A espécie continua se expandindo e ocupando novas áreas geográficas antes não ocupadas ou apenas visitadas. Recentemente, Si Bachir e cols. (2011) documentaram a existência de colônias reprodutivas na Argélia (no norte da África), em uma região anteriormente considerada apenas como área de ocorrência. Esse trabalho demonstra que o processo de expansão da espécie ainda ocorre no continente africano.

1.2. A invasão do continente americano por *Bubulcus ibis*, com ênfase no território brasileiro

Uma invasão biológica ocorre quando um organismo se estabelece em um local para além da sua área de distribuição, colonizando e persistindo em uma área onde até então não habitava, ou seja, onde não era nativa (WILLIAMSON, 1996). Quando ocorre naturalmente (sem intervenção humana), o processo de invasão pode ser dividido em quatro fases distintas: 1) a chegada de alguns indivíduos à nova área, 2) o estabelecimento ou fixação desses indivíduos, 3) a dispersão para novas áreas e 4) o equilíbrio da espécie na comunidade invadida (WILLIAMSON, 1996; RICKLEFS *et al.*, 2005; REISE *et al.*, 2006).

As espécies que não são nativas de um determinado local são rotuladas com uma grande variedade de termos: exóticas, não-indígenas, naturalizadas, alienígenas, introduzidas e invasoras são os mais comuns (FALK-PETERSEN *et al.*, 2006; LOCKWOOD *et al.*, 2007). Essa diversidade de termos causa confusão, levando a classificação de fenômenos diferentes sob o mesmo rótulo ou à separação artificial de processos semelhantes ou idênticos (ESPINOLA; FERREIRA-JULIO-JR, 2007). De acordo com as terminologias utilizadas recentemente (RICHARDSON *et al.*, 2011) *B. ibis* se encaixa na definição de espécie exótica invasora que é definida como a espécie que se encontra fora da sua área natural de distribuição, seja por dispersão acidental ou intencional, e que afeta negativamente a biota ocupada.

As espécies invasoras constituem a segunda grande causa da perda de biodiversidade mundial, ficando atrás apenas da destruição de habitats naturais (WALKER; STEFFEN, 1997). A preocupação com as consequências ecológicas causadas pelas espécies invasoras é crescente e levou a Organização das Nações Unidas (ONU) a criar em 1997, o GISP: Global Invasive Species Programme (Programa Global de Espécies Invasoras) o qual conta com a participação de mais de 100 países, incluindo o Brasil. O GISP busca a conservação da biodiversidade, atuando na redução da propagação e da ameaça que as espécies invasoras representam ao ambiente em que se encontram.

A espécie exótica invasora estudada nesse trabalho, *B. ibis*, é uma espécie oriunda do continente africano e, em seu habitat natural, vive associada às manadas dos grandes herbívoros nas savanas (BLAKER, 1969; DEAN; MACDONALD, 1981). Os registros apontam que invadiu o continente americano no final do século XIX e, tanto no continente americano como no africano, tem se expandido a partir das regiões equatoriais para latitudes maiores (CROSBY, 1972; TELFAIR, 1983; VINCENT, 1947). O que pode ter impulsionado sua saída do continente africano é que nas áreas naturais ancestrais, as populações frequentemente produziam excedentes populacionais, o que por sua vez, resultava em dispersões regulares ao longo do tempo (SIEGFRIED, 1971), tanto no continente africano como para fora dele.

Segundo Telfair (1994), a expansão da espécie no continente americano foi dinâmica, complexa e bem documentada (Figura 3). O primeiro depósito em museu foi feito na Guiana Holandesa em 1877 (WETMORE, 1963). Cerca de 50 anos após sua entrada no continente, *B. ibis* já era encontrada nos Estados Unidos, Canadá, América Central e México (CROSBY, 1972). No Brasil, o primeiro registro foi em 1964 na Ilha de Marajó, no estado do Pará (SICK, 1965), o que indica que, até o momento, podem ter

ocorrido cerca de 50 a 100 gerações no país (dependendo se houve um ou dois eventos reprodutivos por ano). Em 1973, apenas oito anos depois, foi registrada no estado do Rio Grande do Sul (BELTON, 2000). Na região nordeste, a primeira ocorrência foi registrada em 1985 e no arquipélago de Fernando de Noronha, em 1986 (TEIXEIRA *et al.*, 1987).

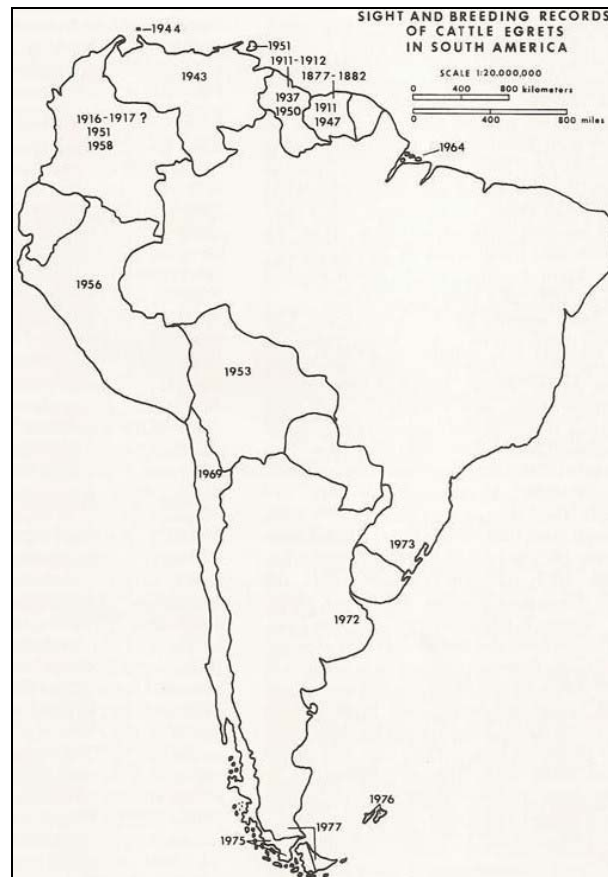


Figura 3. Registros de avistamento e reprodução na América do Sul. Fonte: adaptado do livro “The Cattle Egret: a Texas focus and world view” (Telfair, 1983).

O maior impulso para essa expansão populacional observada parece ter sido dado pelo incremento da criação de gado no continente americano (SICK, 1997). Muito provavelmente indivíduos dessa espécie chegaram à América muito antes do final do século XIX, mas podem não ter encontrado condições favoráveis para o seu estabelecimento. Apenas com o aumento da atividade agropecuária é que essas

condições tornaram-se favoráveis e o estabelecimento e expansão possível nessas novas áreas.

Baseando-se nos registros históricos da entrada no continente e nas datas de ocorrência nas várias regiões do país, a proposta de Sick (1997) é de que a colonização no Brasil tenha ocorrido inicialmente pelo norte, irradiando-se posteriormente, tanto para o nordeste quanto para o sul do país. Contudo, como proposto anteriormente por Brownder (1973), esse modelo não exclui a possibilidade da chegada de novos grupos vindos diretamente da África para o nordeste brasileiro, como sugere a ocorrência de *B. ibis* nos arquipélagos de Fernando de Noronha e de São Pedro e São Paulo (TEIXEIRA *et al.*, 1987).

É importante ressaltar que a falta de registros anteriores em outros países sul americanos pode estar ocultando detalhes da história da invasão. O fato de o primeiro espécime ter sido depositado na Guiana Inglesa, muito anterior ao registro da espécie no Brasil, pode apenas estar refletindo a atividade mais intensa de naturalistas ingleses nesse país. Além disso, considerando-se o fator geográfico, percebe-se que a menor distância entre o continente americano e o africano é aquela entre o país de Senegal e o estado do Rio Grande do Norte e, portanto, pode-se supor que essa pode ter sido a rota cumprida pelos indivíduos fundadores. Essa hipótese também não descarta que possam ter ocorrido diversos eventos de entrada ao longo do processo de invasão.

Um dos fatores determinantes para o sucesso do estabelecimento de uma espécie em novas áreas ocupadas é a sua pressão de propágulo que é dividida em dois componentes: o tamanho do propágulo (número de indivíduos que entraram em cada evento de invasão) e o número do propágulo (número de eventos de entrada que ocorreram ao longo do processo de invasão) (LOCKWOOD *et al.*, 2005). Ambos os fatores são desconhecidos no caso da invasão de *B. ibis* na América. Em aves, também

já foram encontradas relações positivas entre o sucesso no estabelecimento com o número de indivíduos nas áreas nativas e com o tamanho corporal dos indivíduos da espécie (GREEN, 1997), mas não há na literatura estudos que avaliem essas questões para essa espécie.

Além da expansão da atividade agropecuária, algumas características da espécie devem ter também favorecido a expansão de *B. ibis* e seu sucesso no estabelecimento durante o último século: o comportamento alimentar oportunístico, a biologia reprodutiva (tendo até dois ciclos reprodutivos ao ano), a alta capacidade de dispersão e a plasticidade para se adaptar às mudanças ambientais provocadas pelas atividades humanas, em especial, às ligadas ao desmatamento para introdução do gado (GASSET *et al.*, 2000). *B. ibis* faz, portanto, parte de uma minoria de espécies de aves que tem se beneficiado do avanço e ocupação de áreas por humanos e suas atividades (POMEROY, 1975).

Bennetts e cols. (2000) demonstraram que o sucesso reprodutivo de outras espécies de garças está declinando no sul da França desde a chegada de *B. ibis*. A espécie é conhecida por sua agressividade dentro de colônias reprodutivas, tanto na disputa por material para os ninhos quanto por locais de nidificação, obrigando outras espécies a se deslocarem para sítios de menor qualidade em termos de recursos (BURGER, 1978; VOISIN, 1991). Podem afetar também negativamente a fauna nativa por predação, parasitismo e difusão de doenças (PIMENTEL *et al.*, 2005; FICETOLA *et al.*, 2008).

No Brasil, grandes discussões têm sido levantadas a respeito dos benefícios e prejuízos causados por *B. ibis*. Apesar de que alguns autores relatam benefícios econômicos porque essas aves colaboram no controle da população de ectoparasitas bovinos (MENEZES *et al.*, 2004) apesar desse não ser seu principal item alimentar, e

ainda por controlarem prováveis competidores primários com o gado pelas pastagens (JENNI, 1969), a alta taxa de crescimento populacional de *B. ibis* geralmente tem causado prejuízos aos ecossistemas onde a espécie está presente.

A questão torna-se ainda mais grave quando se trata de espécies nativas em risco de extinção ou cuja reprodução ocorre apenas em ilhas oceânicas da costa brasileira. Em Fernando de Noronha, por exemplo, *B. ibis* vêm predando várias espécies nativas de aves (*Anous minutus*, *Anous stolidus*, *Gygis Alba*, *Sterna fuscata* e *Zenaida auriculata*) (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2009) e também uma espécie de lagarto (*Euprepis atlanticus*) que é endêmico da ilha (SILVA-JR, 2004). Além disso, também compete com populações de atobá-de-pés-vermelhos (*Sula sula*) que, no Brasil, só se reproduzem em Fernando de Noronha (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2009).

Um programa de controle populacional da espécie foi iniciado em 2007 em Fernando de Noronha. O protocolo prevê a captura e posterior sacrifício dos animais, visando reduzir a população em 90% e diminuir os danos às espécies endêmicas que nidificam nas ilhas, bem como os danos causados à aviação por colisão com aeronaves, o que tem acontecido com certa frequência (SILVA, 2008). O maior conhecimento acerca do processo de invasão e da colonização da espécie ao longo do país pode auxiliar na elaboração de estratégias de manejo.

1.3. Marcadores Microsatélites

Marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer característica determinada geneticamente que apresente variabilidade, segundo herança mendeliana, em nível adequado para se estudar um problema biológico (AVISE, 1994). A aplicação de marcadores moleculares revolucionou a avaliação da variabilidade genética existente nas populações e, dentre os utilizados, tem-se dado grande destaque para aqueles

altamente polimórficos, como os microssatélites, também denominados Short Tandem Repeats (STRs) ou Simple Sequence Repeats (SSRs).

Os marcadores microssatélites são pequenos fragmentos repetitivos presentes no genoma que exibem repetições justapostas, em série, de dois a seis pares de bases. Essas regiões geralmente estão localizadas nas regiões não-codificantes do DNA e se distribuem de maneira uniforme e aleatória por todo o DNA nuclear (TAUTZ; RENZ, 1984; KASHI; SOLLER, 1999). A herança desses caracteres obedece a padrões mendelianos (JARNE; LAGODA, 1996), sendo encontrados no genoma de todos os organismos eucariotos estudados (BACHTROG *et al.*, 2000) e, em menor frequência, em procariotos e eubactérias (TAUTZ *et al.*, 1989). Já foram associados a diversos mecanismos celulares, como por exemplo, a organização da cromatina, regulação da atividade gênica e de processos metabólicos, tais como transcrição, tradução, replicação e recombinação, associados com a pressão de seleção positiva nos processos meióticos (LI *et al.*, 2002) e com a especificidade da síntese de determinados aminoácidos (MORGANTE *et al.*, 2002).

Os microssatélites são classificados, segundo a sua composição de bases, em simples ou perfeitos (como por exemplo: CACACACACACA), compostos (como: CACACAGAGAGACACACA) e interrompidos (como: CACACATCACACA). Os de composição simples são os mais fáceis de serem utilizados como marcadores, pois as diferenças de única base nos interrompidos são difíceis de serem identificadas. Os motivos repetidos mais comuns são os di (repetição de duas bases), tri (repetição de três bases) e tetranucleotídeos (repetição de quatro bases) (JARNE; LAGODA, 1996).

Esses marcadores têm sido muito utilizados em análises populacionais devido ao seu alto grau de polimorfismo, abundância no genoma eucariótico, por seu padrão de herança mendeliana codominante na genotipagem, natureza multialélica, neutralidade

em relação aos efeitos fenotípicos (ELLEGREN, 2004) e por serem facilmente identificados (GOLDSTEIN; SCHÖTTERER, 1999). Essas características, associadas ao crescente avanço das análises estatísticas, fazem dos microssatélites uma ferramenta ideal para estudos de genética populacional. Além disso, a análise baseada nos dados de microssatélites é capaz de revelar a estruturação populacional também em microescala, o que não pode ser feito com os demais marcadores (WIRTH; BERNATCHEZ, 2001).

A alta taxa de mutação é outra característica favorável à utilização desses marcadores, pois o grau de variação de um loco de microssatélite é dependente dessa taxa que varia entre 10^{-6} a 10^{-2} eventos por loco, por geração (LI *et al.*, 2002). Essa característica resulta em uma grande quantidade de alelos independentes, fornecendo um poder estatístico alto na detecção de estruturação genética das populações (KALINOWSKI, 2002).

De modo geral a taxa de mutação está positivamente relacionada com o número de motivos de repetição, de modo que os alelos com número maior de motivos de repetição estão sujeitos às mutações com mais frequência (PÉREZ *et al.*, 2005). Por outro lado, microssatélites que contém motivos interrompidos parecem ter taxas de mutação inferiores às dos microssatélites perfeitos (PETES *et al.*, 1997). Acredita-se também que o número de unidades repetitivas sofra alguma forma de restrição e a principal evidência é a ausência de microssatélites muito longos (alelos com mais de 60 repetições são raramente observados) (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997).

Por todos os motivos explicitados acima, os marcadores microssatélites têm se tornando uma poderosa ferramenta para a construção de mapas genéticos (LEE *et al.*, 2005), para a análise da estrutura de populações (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2006), nos estudos sobre relações filogenéticas (RICO *et al.*, 1996) e em análises de parentesco (SPRECHER *et al.*, 1996). Tem sido também muito empregados nos testes de alocação

(“assignment tests”) os quais permitem calcular a probabilidade de um indivíduo pertencer a uma população específica (AVISE, 2000).

O mecanismo que explica a origem dos alelos nos locos dos microssatélites é o do deslizamento (“slippage”) da DNA polimerase durante a síntese do DNA (ELLEGREN, 2000). Esse ocorre quando as duas fitas ocasionalmente se separam e voltam a se realinhar em posição incorreta, resultando em alças não pareadas. Muitas destas alças são corrigidas pelo mecanismo de reparo da célula e uma pequena fração que não sofre esse reparo ganha ou perde uma ou mais unidades repetitivas, dando origem a novos alelos (KRUGLYAK *et al.*, 2000).

O modelo que explica a maior parte das mutações que ocorrem nos marcadores microssatélites é o do “Stepwise Mutation Model” (SMM) (OHTA; KIMURA, 1973). Esse modelo assume que uma mudança no estado alélico ocorre pela perda ou ganho de uma unidade de repetição, porém é importante ressaltar que mutações com perdas de um número maior de unidades também ocorrem, só que em menor frequência (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997). É nesse modelo de mutação que está baseado o índice de diferenciação R_{st} (SLATKIN, 1995).

Outros dois modelos também propõem explicações para os eventos de mutação nos microssatélites. O “Infinite Allele Model” (IAM) (KIMURA; CROW, 1964) supõe uma situação extrema na qual o número possível de estados alélicos em um determinado loco pode ser extremamente grande e que cada novo alelo mutante é um novo estado alélico, não existente anteriormente na população. O “Two-Phase Mutation Model” (TPM) (DI RIENZO *et al.*, 1994) propõe que a instabilidade dos alelos é devida principalmente ao aumento ou diminuição de uma unidade repetitiva, com probabilidade igual a p , mas que mutações envolvendo mais de uma unidade repetitiva também podem acontecer, com probabilidade igual a $1-p$.

Uma dificuldade que precede a aplicação dos microssatélites em estudos genéticos é a necessidade de prospecção desses locos para cada espécie que se pretende estudar (ZANE *et al.*, 2000). Em aves, particularmente, esse processo é mais difícil, pois esses organismos apresentam uma baixa frequência de microssatélites no genoma quando comparados com outros vertebrados (PRIMMER *et al.*, 1997). Mas uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores são desenhados para novos locos isolados em uma espécie, podem ser usados no estudo de populações de espécies filogeneticamente relacionadas (PRIMMER *et al.*, 2005), já que as regiões flanqueadoras dos motivos de repetição apresentam-se altamente conservadas em espécies relacionadas (BROHEDE; ELLEGREN, 1999).

Os microssatélites também apresentam algumas limitações. Como mutações podem ocorrer nas regiões flanqueadoras das unidades repetitivas, essas mudanças podem implicar no não-anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, levando a ocorrência de alelos nulos ou silenciosos, isto é, alelos que não são amplificados na reação de PCR (JARNE; LAGODA, 1996). Consequentemente, indivíduos heterozigotos podem ser erroneamente identificados como homozigotos. Essa limitação pode levar a diminuição na proporção de indivíduos heterozigotos que resulta na diminuição do valor da heterozigosidade observada em relação à esperada, segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (BRUFORD; WAYNE, 1993).

A ocorrência de homoplasia, ou seja, a existência de alelos idênticos resultantes de processos mutacionais convergentes e sem ancestralidade comum, é outra limitação desses marcadores. Nesse caso, dois ou mais alelos podem ser identificados como um único alelo, pois possuem o mesmo peso molecular, mas são resultantes de mutações diferentes (que geraram alelos com o mesmo tamanho). A homoplasia, portanto, reduz o número de alelos observados na população, a proporção de indivíduos heterozigotos e a

diversidade genética (JARNE; LAGODA, 1996). Essa limitação é esperada segundo todos os modelos mutacionais, exceto pelo modelo de alelos infinitos (IAM), sendo normalmente mais elevada em estudos com locos heterólogos, menos importante em estudos de populações da mesma espécie e muito rara em estudos intrapopulacionais.

O fenômeno de “dropout”, onde nos indivíduos heterozigotos ocorre uma amplificação alelo-preferencial que favorece o alelo de menor tamanho, é uma outra limitação pois leva à uma identificação errada do genótipo que passa a ser lido como homozigoto (TABERLET; LUIKART, 1999). A presença de alelos nulos, homoplasia e de alelos “droupout” podem conduzir a uma subestimativa da divergência real entre as populações estudadas (JARNE; LAGODA, 1996), mas na maioria dos estudos de genética populacional, esses fatores não se constituem em problemas significativos, pois o nível alto de polimorfismo desses marcadores compensa suas limitações (ESTOUP *et al.*, 2002).

1.4. A proposta do trabalho

O grau e a distribuição da variabilidade genética existente nas populações de uma espécie podem ser avaliados a partir das diferenças individuais detectadas nos genótipos dos indivíduos integrantes dessas populações (FRANKHAM *et al.*, 2002). As populações geralmente apresentam algum grau de estruturação genética, o qual é fortemente influenciado pelo sistema de acasalamento, tamanho da população, gargalos populacionais, intensidade de fluxo gênico e estrutura etária dos indivíduos (TEMPLETON, 2006). Os principais modelos que explicam a estruturação populacional são: o de ilhas, o de continente-ilha, o de isolamento pela distância, o de “stepping-stone” ou passo-a-passo e o de metapopulações (FUTUYMA, 1998; FRANKHAM *et al.*, 2002).

Os microssatélites são os marcadores adequados para os estudos de variabilidade genética e estruturação populacional principalmente pelo seu alto grau de polimorfismo e pelo seu padrão de herança codominante. Porém como já foi dito, a dificuldade que precede o uso desses marcadores nos estudos genéticos é a necessidade da prospecção dos locos para a espécie a ser estudada. Como para *B. ibis* não foram descritos ainda locos de microssatélites, essa se constituirá a primeira proposta desse trabalho: o isolamento de pelo menos seis locos polimórficos que permitam a análise populacional posterior.

A colonização do Brasil por *B. ibis* foi recente, mas diversas populações podem ser encontradas ao longo de uma área muito ampla do nosso país, o que a tornam mais sujeitas a sofrerem processos que mudem sua constituição genética. Como a travessia de aves entre continentes não é um fato comum, supõe-se que foram poucos os indivíduos colonizadores provenientes da África, representando apenas uma pequena parcela da diversidade existente na espécie naquele continente. Assim sendo, hipotetiza-se que a diversidade genética das populações brasileiras será baixa e decorrente desse gargalo populacional.

Considerando-se a falta de dados históricos que colaborem para a compreensão do processo de invasão, faz-se necessário a caracterização genética das populações brasileiras desde as regiões mais próximas à suposta entrada, localizada na Guiana Inglesa até o extremo sul do país, no estado do Rio Grande do Sul. Se a colonização ocorreu segundo um modelo linear de expansão no sentido norte-sul, será esperado um nível mais alto de diversidade genética, com maior ocorrência de alelos privados e maior tamanho efetivo nas populações posicionadas nas latitudes menores do que nas posicionadas em maiores latitudes, no sul do país. Caso um gradiente claro de diversidade não seja detectado e seja detectada ausência de estruturação entre as

populações do país, poder-se-á supor que o fluxo gênico é alto e que ocorre uma dispersão errática entre os grupos de indivíduos que ocupam novas áreas.

Com a determinação do perfil da distribuição da diversidade genética, pode-se inferir qual das hipóteses levantadas se confirma. No entanto, prevê-se que a baixa diversidade dessas populações introduzidas pode dificultar o estudo comparativo entre as populações. Essa é a segunda proposta do trabalho: caracterizar e determinar a estrutura genética das populações brasileiras de *B. ibis*, visando contribuir para esclarecer as questões relacionadas ao seu histórico de invasão, bem como auxiliar na compreensão do processo fundador ocorrido no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Isolar locos de microssatélites polimórficos e caracterizar geneticamente as populações brasileiras de *Bubulcus ibis*. Esse trabalho contribui para a compreensão do processo recente de colonização do Brasil por essa espécie exótica invasora.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar locos de microssatélites polimórficos específicos para *B. ibis*;
- Identificar locos de microssatélites heterólogos polimórficos em *B. ibis*;
- Estimar os níveis de diversidade genética a partir dos genótipos obtidos nos locos de microssatélites;
- Determinar parâmetros populacionais como tamanho efetivo e parentesco médio, e verificar se as populações apresentam sinais de gargalo populacional;
- Verificar se há estruturação populacional ou se ocorre fluxo gênico entre as populações estudadas;

3. JUSTIFICATIVA

A presença de uma espécie exótica invasora pode trazer riscos à biodiversidade nativa, mas por outro lado fornece importante material para estudo e pode ajudar a compreender questões fundamentais da genética de populações. Em especial, esse tipo de estudo pode ajudar a compreender como espécies ameaçadas de extinção podem ser restauradas, e compreender o quão crucial é a quantidade de variação genética presente nas populações introduzidas para o seu estabelecimento, adaptação e dispersão (HUEY *et al.*, 2000). Como os períodos iniciais de invasão sempre envolvem um número limitado de fundadores, apenas uma parcela da diversidade genética da população de origem está ali representada. Logo, ao se entender a estrutura populacional da espécie invasora pode se gerar informações valiosas sobre a melhor forma de manejo dessas populações, fatores fundamentais para o controle atual da invasão e para a prevenção de futuras invasões, bem como para garantir o equilíbrio entre a espécie invasora e as espécies nativas (WALKER *et al.*, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e coleta das amostras

As coletas de sangue e penas das aves foram realizadas em colônias reprodutivas e em pousos pela equipe do Laboratório de Genética de Aves (LGA), nos municípios de Barra do Ribeira (RS), Manaus (AM), Rio Claro (SP) e Eldorado do Sul (RS), e por colaboradores no município de Garanhuns (PE) e no arquipélago de Fernando de Noronha (PE) (Tabela 1). A amostragem foi delineada de modo a incluir uma amostra representativa de uma latitude maior ao sul, e de outras, mais ao norte do país, incluindo regiões intermediárias e uma população de ilha (Figura 4).

Tabela 1. Descrição das amostras de *Bubulcus ibis* utilizadas no presente trabalho.

Local da Coleta	Idade	Característica	Data da Coleta	Material Coletado	N° de Amostras
1 - Barra do Ribeiro (RS)	filhote	colônia	jan/07	sangue	16
2 - Manaus (AM)	adulto	pouso	jul/09	pena	13
3 - Rio Claro (SP)	filhote	colônia	nov/09	sangue	35
4 - Eldorado do Sul (RS)	filhote	colônia	jan/10	sangue	25
5 - Garanhuns (PE)	filhote	colônia	ago/10	sangue	23
6 - Fernando de Noronha (PE)	adulto	pouso e outros*	out/10	sangue	35

*a captura dos adultos também foi feita em locais de forrageamento



Figura 4. Pontos de coleta de amostras de *Bubulcus ibis* no Brasil. 1) Barra do Ribeiro (RS); 2) Manaus (AM); 3) Rio Claro (SP); 4) Eldorado do Sul (RS); 5) Garanhuns (PE) e 6) Fernando de Noronha (PE).

As amostras de penas de muda reprodutiva são de indivíduos adultos, e foram coletadas no solo embaixo dos ninhos e em pousos; essa estratégia não-invasiva foi usada por ser muito difícil a captura desses adultos. A técnica foi testada anteriormente com sucesso em outras espécies de Ciconiiformes (MIÑO, 2006; MIÑO; DEL LAMA, 2009). Após a coleta, as penas foram armazenadas em embalagens de papel à temperatura ambiente no campo. No laboratório, foram armazenadas em refrigerador a -20°C até o momento da extração de DNA.

Amostras de sangue foram obtidas a partir da captura dos ninhegos nos ninhos, antes da revoada, com exceção da população de Fernando de Noronha, onde foram capturados indivíduos adultos que foram, em seguida, sacrificados. Alíquotas de 0,1 ml de sangue foram retiradas da veia braquial com auxílio de seringas descartáveis (1,0 ml) enxaguadas com EDTA 0,3%. As amostras foram, em seguida, transferidas para microtubos de 1,5 ml nos quais se adicionou etanol absoluto. No laboratório, o material

foi estocado em freezer a -20°C , sendo cada colônia reprodutiva ou pouso considerada uma unidade populacional.

4.2. Extração de DNA das amostras biológicas de *Bubulcus ibis*

A extração do DNA das penas foi feita seguindo o protocolo descrito por Miño e Del Lama (2009), utilizando-se apenas a porção correspondente à região de desenvolvimento, caracterizada pela marca do coágulo de sangue (Figura 5). Uma mistura contendo essa porção da pena cortada em pequenos pedaços, 400 μl de tampão de lise e 30 μl de proteinase K (10mg/ml) foi incubada em banho-maria à 37°C por 24h. Após esse período, foram adicionados 20 μl de proteinase K (10mg/ml) e a mistura foi agitada vagarosamente por 1h, sendo a seguir novamente incubada à 37°C . O passo de adição de proteinase K e agitação foi repetido por sete dias consecutivos.

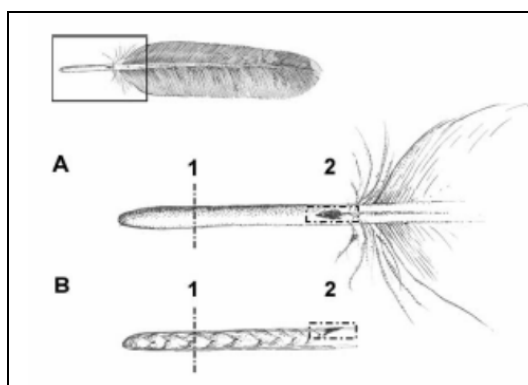


Figura 5. Ilustração de uma pena de ave, com destaque para a região do desenvolvimento. A) vista posterior da base da pena; B) corte longitudinal do *calamus*; 1) parte basal; 2) coágulo de sangue no úmbilico superior. Fonte: Hórvath e cols. (2005).

Para a extração do DNA de sangue, cerca de 30 μl do sangue total foi misturado com 220 μl de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 e KCl 50 mM) e 0,15 μl de proteinase K (10mg/ml), em microtubos de 1,5 ml, sendo esta mistura homogeneizada. Após a homogeneização, a mistura foi incubada em banho-maria por aproximadamente

12 horas à 55°C. Após a incubação com proteinase, tanto para amostras de sangue quanto para de penas seguiu-se o protocolo descrito por Sambrook e cols. (1989).

Ao final da extração o DNA precipitado foi ressuspendido em 100µl de água destilada e autoclavada. A quantificação das amostras de DNA foi realizada em gel de agarose 1% por comparação com marcador de massa de concentração conhecida (*MassRulerTM DNA Ladder, Low Range* – Fermentas) e também no espectrofotômetro (*NanoVue* – GE Healthcare). Após serem quantificadas, as amostras foram diluídas com água destilada e autoclavada para uma concentração final de DNA de 40ng/µl. O DNA foi estocado em freezer a -20°C, e uma alíquota mantida em refrigerador a 4°C, para o uso nas reações de PCR.

4.3. Isolamento de locos de microssatélites na espécie *Bubulcus ibis*

O isolamento das seqüências de microssatélites se iniciou com a construção de bibliotecas genômicas parciais enriquecidas, proposta por Hamilton e cols. (1999). O protocolo iniciou-se com a clivagem de aproximadamente 4µg de DNA de um único indivíduo com as enzimas de restrição *Rsa* I e *BstU* I (New England Biolabs Inc.), seguindo-se as recomendações do fabricante.

O produto da clivagem foi aplicado em gel de agarose 0,8% e após separação dos fragmentos por eletroforese foi cortada a região do gel correspondente aos fragmentos de DNA entre 300 e 1000pb. O DNA foi eluído do gel com o kit *Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System* (Promega) e ligado à oligonucleotídeos dupla-fita comercialmente fosfatados (“linkers”), com o objetivo de se criar sítios de ligação para as reações de PCR subsequentes. Para verificar a eficiência dessa ligação, uma PCR foi realizada utilizando-se os fragmentos ligados aos “linkers”.

Para o enriquecimento na primeira biblioteca, os fragmentos foram hibridizados com um conjunto de oito sondas biotiniladas de seqüências repetitivas para

microsatélites tetranucleotídeos: (AAAC)₆ - (AAAG)₆ - (AATC)₆ - (AATG)₆ - (ACCT)₆ - (ACAG)₆ - (ACTC)₆ - (ACTG)₆. Na segunda biblioteca, além dessas oito sondas tetranucleotídicas, foram também utilizadas outras três sondas: (AGC)₁₀ - (CA)₁₅ - (TC)₁₅, descritas no isolamento de microsatélites para a espécie *Ardea herodias* (MCGUIRE; NOOR, 2002), filogeneticamente próxima à *B. ibis*.

Os fragmentos que se hibridizaram com as sondas foram capturados utilizando-se partículas magnéticas ligadas à Streptavidina (“Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particles” - Promega), e o DNA enriquecido com as sondas foi amplificado por PCR. O produto foi clonado utilizando-se o kit “pGEM-T Vector Systems” (Promega), sendo as bactérias competentes preparadas com CaCl₂ e transformadas pela inoculação do vetor. As colônias foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina na concentração 100µg/ml de meio. Cerca de 15 min antes da transferência das bactérias, 40µl de X-Gal 2% e 100µl de IPTG 2,3% foram espalhados sobre o meio para seleção de recombinantes por coloração branca-azul.

As colônias recombinantes, identificadas pela coloração branca, foram novamente plaqueadas em “MegaTiter plate” de 96 orifícios contendo 1ml de meio LB líquido com ampicilina, e incubadas durante a noite (±22h) a 37°C, com agitação. Foram feitas mini-preps com as colônias e essas foram utilizadas como molde para amplificação por PCR, visando a identificação do tamanho dos insertos clonados. A reação de seqüenciamento foi realizada com o kit “DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing” (GE Healthcare), utilizando-se o seqüenciador Megabace Flexyble 1000 (Ge HealthCare).

Os eletroferogramas gerados foram visualizados com o programa Chromas 2.33 (©2003-2008 Technelysium Pty Ltd) e as seqüências correspondentes ao vetor de clonagem foram excluídas. As seqüências editadas foram convertidas em formato

“fasta” e posteriormente analisadas com o programa CID (FREITAS, *et al.*, 2008). Foram selecionadas sequências de microssatélites compostas de um a seis pares de bases, repetidas no mínimo quatro vezes.

Foi utilizado o programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc., Hastings, NY) para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores das regiões flanqueadoras dos microssatélites. Foi utilizada a metodologia de genotipagem proposta por Schuelke (2000) e para sua execução foi adicionada uma cauda M13(-21) (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) à extremidade 5’ de todas as sequências dos iniciadores “forward”.

4.4. Testes de amplificação para genotipagem dos locos de microssatélites

As condições de PCR foram testadas para cada par de oligonucleotídeos iniciadores utilizando-se o DNA de quatro indivíduos de populações distintas e variando-se: as temperaturas de anelamento ($\pm 2^{\circ}\text{C}$ a partir da temperatura média sugerida pelo Gene Runner 3.05), a concentração de cloreto de magnésio (1,0, 1,5, 2,0 e 2,5mM) e a concentração de DNA (40, 60 e 80ng). Os demais reagentes foram mantidos em concentrações iguais em todos os testes: tampão 1X (10mM Tris pH 8,4 e 50mM KCl), 0,25mM dNTPs, 2 pmol do iniciador “forward”, 8 pmol do iniciador “reverse”, 8 pmol de fluorescência M13 e 0,5 U de Taq DNA polimerase.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Hamburg) e em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied biosystems). Os produtos foram visualizados em géis de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados pelo sistema Kodak Digital Science 1D. A análise dos genótipos para cada indivíduo foi realizada por eletroforese capilar, utilizando-se o sistema MegaBACE™1000 (Amersham Biosciences). Os eletroferogramas foram analisados pelo software GeneticProfiler usando MegaBACE™

ET Size Standard (Amersham Biosciences), usando-se ROX (GE Healthcare) como marcador de padrão interno de peso molecular.

4.5. Análise do grau de polimorfismo dos locos isolados e testes de amplificação cruzada

Depois de selecionadas a temperatura ótima de anelamento e a melhor condição para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, 20 indivíduos da população de Rio Claro foram genotipados para todos os locos que apresentaram amplificação, com intuito de averiguar o grau de polimorfismo dos locos isolados. Para os locos que se mostraram polimórficos, foram genotipados mais 15 indivíduos dessa população (N=35). A caracterização dos locos polimórficos foi feita utilizando-se esse conjunto de 35 indivíduos de uma mesma população porque os trabalhos de isolamento de locos de microssatélites publicados recentemente têm seguido esse padrão.

Nos locos que se mostraram polimórficos foram feitos testes de amplificação cruzada com seis espécies da família Ardeidae: *Ardea cocoi* (N=1), *Ardea alba* (N=2), *Egretta caerulea* (N=2), *Egretta thula* (N=2), *Nycticorax nycticorax* (N=2) e *Nyctanassa violacea* (N=2). As temperaturas de anelamento e as condições de PCR nesses testes foram as mesmas utilizadas para *B. ibis*.

4.6. Testes de amplificação e genotipagem dos locos heterólogos

Além dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados no presente trabalho, foram testados oito locos de microssatélites descritos para a espécie *Ardea herodias* (MCGUIRE; NOOR, 2002) e um loco descrito para *Egretta eulophotes* (HUANG *et al.*, 2010) (Tabela 2). Essas duas espécies, assim como *B. ibis*, são de garças pertencentes família Ardeidae.

Tabela 2. Locos de microssatélites heterólogos testados. Tm = temperatura de “melting” para cada loco; Na = número de alelos na espécie de origem.

Loco	Motivo de Repetição	Espécie para o qual foi isolado	Oligonucleotídeos iniciadores (5'- 3')	Tamanho esperado do fragmento (pb)	Tm (°C)	Na
Ah211	(CA) ₁₃	<i>Ardea herodias</i>	F - GCTCATCAGGAGTTGAATCTGGC R - TCTGTCATTAGCAATGGACC	152	59,2	10
Ah217	(CA) ₁₀	<i>Ardea herodias</i>	F - GCTCAGGCTCTGCTTTGTCTAC R - CACAGATTCAAACAAGCACCATGC	178	59	4
Ah320	(AC) ₁₃	<i>Ardea herodias</i>	F - TTAGGAGCAAGATTTTAAAGAAGGTGC R - AAGTGCTGGGTCATACTGGAATAG	188	57,7	5
Ah343	(AC) ₁₇	<i>Ardea herodias</i>	F - CATTGCTTAACCTTCTGAAGAAAC R - CTTGACCCAGCATTGTGAATAAACTG	228	58,6	9
Ah414	(AC) ₂₂	<i>Ardea herodias</i>	F - CATTCCAGCTGCTCTTCATTCTTG R - GGCAAAAGCAACTAGGGGC	240	57,5	12
Ah522	(TCTTC) ₂₅	<i>Ardea herodias</i>	F - TTGTGGGACTAAACAGTGAAGCAG R - CAAAGCTGATTTAAAGATGTTCCATCCC	260	58,5	18
Ah526	(TC) ₂₇	<i>Ardea herodias</i>	F - GAATGGGGAAGAGAAGTGAAGAGC R - CACTGCTCAGGGACTGGC	256	58,5	18
Ah536	(AC) ₁₄	<i>Ardea herodias</i>	F - CCCTGGTTTAGATCACATGATGGAG R - CTGGGCAACCTGTTCCATCT	130	58,4	7
Ah630	(TC) ₁₂	<i>Ardea herodias</i>	F - TCCTCCTTACAATGCTACTTGC R - CGGCAGGCAGTATTATTCAGTGG	122	59,6	4
Ae47	(GGAT) ₁₃	<i>Egretta eulophotes</i>	F - GATCAGGTCAGGCTGCAA R - GCAACCTCTAAGCAAGCAC	208	54	9

Como para os locos específicos, os testes para verificar quais locos heterólogos eram polimórficos para *B. ibis* foi feito com os mesmos 20 indivíduos da população de Rio Claro (SP). Para os locos de *A. herodias*, as condições foram as mesmas descritas por Miño (2010), utilizando temperaturas mais baixas que as indicadas para a espécie *A. herodias*, já que a diminuição da temperatura de anelamento na reação de PCR aumenta significativamente a chance de sucesso da amplificação cruzada (PRIMMER *et al.*, 2005). Para o loco de *E. eulophotes*, foram as condições foram as mesmas descritas pelo autor no trabalho de isolamento, utilizando a mesma temperatura de anelamento. As reações para esses locos foram realizadas nos mesmos termocicladores e seguindo o protocolo de genotipagem idêntico ao utilizado para os locos específicos.

4.7. Análise dos Dados

A análise foi iniciada averiguando-se a ocorrência de alelos nulos, de amplificação alelo-diferencial (“allele dropout”) e de picos não específicos nos eletroferogramas pelo programa Micro-Checker (OSTERHOUT *et al.*, 2004). Além disso, para assegurar que cada uma das penas utilizadas nesse trabalho pertenciam a indivíduos distintos, as 13 amostras de Manaus foram analisadas pelo programa GIMLET 1.3.3 (VALIÈRE, 2002), que checando a combinação de genótipos obtidos sugere se existe a possibilidade de duas ou mais penas pertencerem a um mesmo indivíduo.

No programa GenAlEx 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi testada a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg mediante o teste exato (HALDANE, 1954; WEIR, 1990; GUO; THOMPSON, 1992), verificando se os valores observados das frequências genóticas estão de acordo com o esperado por esse modelo. Foram ainda calculados por esse programa as frequências alélicas por loco e por população, as heterozigosidades esperadas (H_e) e observadas (H_o). Também nesse programa foi realizado o teste de alocação de indivíduos (“assignment test”) e o cálculo do parentesco médio.

O desequilíbrio de ligação entre os locos analisados foi testado pelo Genepop versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Nesse programa também foi calculado o número de migrantes por geração (N_m) segundo Slatkin (1985) e corrigido por Barton e Slatkin (1986). No programa CERVUS 3.0.3 (MARSHALL *et al.*, 1998; KALINOWSKI *et al.*, 2007) foi calculado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC – “Polymorphic Information Content”) (BOTSTEIN *et al.*, 1980), que é um indicador da qualidade dos marcadores em estudos genéticos, tais como estudos de segregação, identificação de populações e controle de paternidade. A riqueza alélica (R_a) e a estimativa de diferenciação populacional F_{st} (e seu respectivo p) foram estimados pelo

programa FSTAT (GOUDET, 2002). A avaliação do grau de diferenciação genética específica para microssatélites (R_{st}) e seu valor de p foram estimados no programa RSTCALC 2.2 (GOODMAN, 1997), assim como o N_m baseado nos valores de R_{st} .

No programa FSTAT também foi feito o teste de Mantel (MANTEL, 1967) para averiguar se o modelo de isolamento por distância explicava dos dados de diferenciação encontrados pelo F_{st} e R_{st} . Foram construídas matrizes utilizando-se os valores de F_{st} e R_{st} par-a-par, e estas foram comparadas com uma matriz de distância geográfica através do teste de Mantel (simuladas com 2000 permutações). A matriz de distância geográfica foi feita com os dados de distâncias (km em linha reta) entre as coordenadas dos pontos onde foram coletadas as amostras de cada população, utilizando-se a ferramenta “régua” do programa GOOGLE EARTH 4.3.7.3 beta 2008.

O número efetivo populacional (N_e) para cada população foi calculado a partir da geração zero pelo método de desequilíbrio de ligação (HILL, 1981) segundo o programa NeEstimator 1.3 (PEEL *et al.*, 2004). A ocorrência de gargalo populacional foi investigada pelo programa Bottleneck 1.2.0.2 (CORNUET; LUIKART, 1996) através do teste de Wilcoxon (LUIKART *et al.*, 1997), assumindo-se como modelo mutacional o TPM (70% de mutações de passo simples e 30% de mutações de múltiplos passos), pois esse parece ser o mais conservativo (LUIKART; CORNUET, 1998).

A existência de estrutura populacional baseada no genótipo dos indivíduos foi examinada usando-se o procedimento Bayesiano baseado no modelo implementado no programa STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Foram utilizados como parâmetros o modelo de mistura (*admixture model*), que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais oriundos de mais de uma população, e frequência alélicas correlacionadas, sendo realizadas 20 corridas (réplicas) independentes para cada valor de K , com valores de corte (*burnin*) de 10.000 permutações e 100.000 simulações em

cadeias de Monte Carlo (MCMC). Não foram dadas informações prévias sobre os locais de origem de cada indivíduo, sendo o número real de populações determinado pelo valor de K que maximiza o modelo de probabilidades estimadas log-likelihood (FALUSH *et al.*, 2003).

Pelo programa Popgene (YEH *et al.*, 1997) foi calculada a distância genética de Nei (NEI, 1978) entre populações e no programa TFGA – Tools for Population Genetics Analysis (MILLER, 1997) foram feitos os dendogramas segundo o método UPGMA a partir das distâncias genéticas. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) e os valores e significâncias do coeficiente de endogamia (F_{is}), partindo-se da hipótese nula de união aleatória dos gametas, foram calculados com o programa Arlequin (SCHENEIDER *et al.*, 2000).

5. RESULTADOS

5.1. Extração e quantificação do DNA

Foi possível obter boa quantidade de DNA a partir de todas as amostras de sangue. Na Figura 6 é mostrado o DNA genômico extraído de 13 amostras de sangue distintas da população de Rio Claro (SP), após a eletroforese em gel de agarose. Observa-se, porém, que o mesmo não ocorreu com as amostras de penas da população de Manaus (AM), que renderam uma quantidade de DNA inferior (Figura 7).

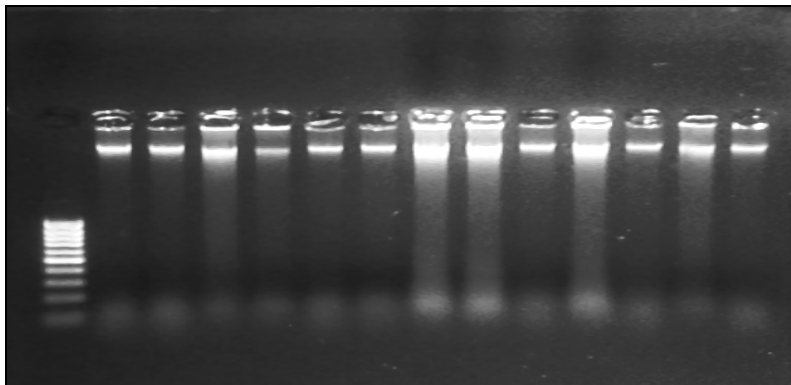


Figura 6. Gel de agarose 1% mostrando as bandas do DNA genômico, extraído de 13 amostras de sangue da população de Rio Claro (SP). O padrão do marcador de massa MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas) está exposto no primeiro poço à esquerda.

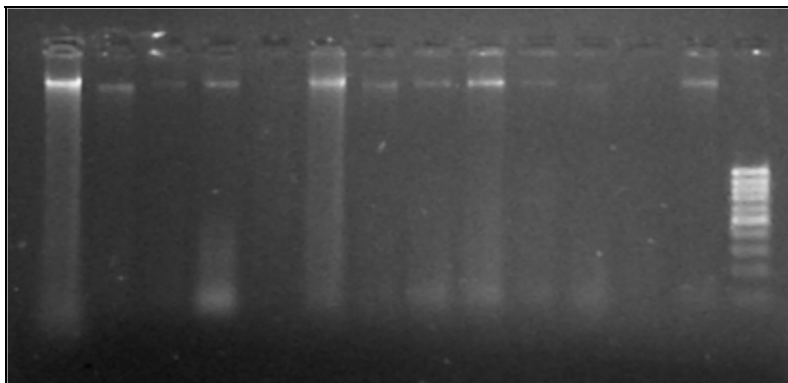


Figura 7. Gel de agarose 1% mostrando as bandas do DNA genômico, extraído de 13 amostras de penas da população de Manaus (AM). O padrão do marcador de massa MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas) está exposto no primeiro poço à direita.

As amostras de DNA extraídas foram ressuspensas em um volume de 100µl de água destilada. Os dados da quantificação em espectrofotômetro mostraram que não foi possível obter DNA em quantidade superior a 40ng/µl (concentração comumente usada nas reações de PCR) para nenhuma das amostras de penas de Manaus, as quais variaram de um a 14 ng/µl, com média de 4,84ng/µl na população. Já o DNA obtido das amostras sangue, apresentaram concentrações superiores à 40 ng/µl, um teor suficiente para as reações de PCR. As médias de concentração de DNA obtidas para as demais populações foram: 104,56 ng/µl para Barra do Ribeiro (RS), 251,52 ng/µl para Eldorado do Sul (RS), 180,86 ng/µl para Rio Claro (SP), 197 ng/µl para Garanhuns (PE) e 116,05 ng/µl para Fernando de Noronha (PE).

5.2. Isolamento dos locos de microssatélites para *Bubulcus ibis*

5.2.1. Isolamento dos locos de microssatélites e otimização das reações de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados

Foi escolhido o protocolo de isolamento de microssatélites proposto por Hamilton e cols. (1999), pois de acordo com uma revisão realizada por Zane e cols. (2000), essa é a estratégia mais vantajosa devido a sua alta eficiência e rapidez. Para a construção da primeira biblioteca genômica, foi utilizado o DNA do indivíduo RS86, oriundo da população de Barra do Ribeira (RS) e para a construção da segunda biblioteca, foi usado o DNA do indivíduo PE13, oriundo da população de Garanhuns (PE), sendo ambos escolhidos aleatoriamente. Foram sequenciados 144 clones recombinantes positivos da primeira biblioteca e 288 clones recombinantes positivos da segunda biblioteca, totalizando 432 clones sequenciados.

A análise das sequências mostrou que na primeira biblioteca 29 dos clones sequenciados continham 39 sequências de microssatélites. Foram identificados 11 microssatélites mononucleotídeos, 21 dinucleotídeos, dois trinucleotídeos, quatro

tetranucleotídeos e um hexanucleotídeo, sendo dois microssatélites interrompidos e cinco compostos. Na segunda biblioteca, 39 clones apresentaram 47 sequências de microssatélites, sendo seis mononucleotídeos, 35 dinucleotídeos, quatro trinucleotídeos e dois tetranucleotídeos. Desse último conjunto, um era interrompido e um composto.

A grande maioria dos locos de microssatélites obtidos nessa prospecção foi de dinucleotídeos (56 locos, 65,11% do total) e nenhum com motivo pentanucleotídeo foi encontrado (Tabela 3). Seis locos de trinucleotídeos foram encontrados e apesar do motivo de repetição ACG ser descrito como o tipo mais abundante de microssatélite em aves (LONGMIRE *et al.*, 1999), nenhum loco apresentou esse motivo nessa prospecção. A eficiência da clonagem, expressa como a porcentagem de clones positivos com sequências de microssatélites, em relação ao total de recombinantes analisados, foi de 15,74%.

Tabela 3. Número de microssatélites encontrados nessa prospecção de acordo com o motivo da unidade repetitiva.

Motivo da unidade repetitiva	Primeira biblioteca	Segunda biblioteca	Total
Mononucleotídeo	11	6	17
Dinucleotídeo	21	35	56
Trinucleotídeo	2	4	6
Tetranucleotídeo	4	2	6
Pentanucleotídeo	0	0	0
Hexanucleotídeo	1	0	1
Total	39	47	86

As sequências que continham microssatélites foram, em seguida, analisadas para se decidir para quais locos seriam desenhados oligonucleotídeos iniciadores. Como os locos de microssatélites que contém variação em única base não são úteis para a técnica de detecção da variação genética pelo tamanho do fragmento, os 17 locos encontrados

esse tipo de variação não foram considerados. Os 69 locos resultantes foram analisados e para 32 deles foi possível o desenho de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueavam a região com as unidades repetitivas (Tabela 4). Foram desconsiderados aqueles que não possuíam região flanqueadora adequada e também os que continham dinucleotídeos simples repetidos apenas quatro vezes, resultando microssatélites de apenas 8pb. Como esses locos com números pequenos de repetições têm pouca chance de apresentar variação, apenas um deles foi escolhido aleatoriamente para ser testado (loco Bi11).

Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para os 32 locos de microssatélites em *Bubulcus ibis*. *microssatélite interrompido por 18 pares de bases. Tm = temperatura de “melting” aproximada a partir dos valores dados pelo programa Gene Runner 3.05.

Loco	Motivo de Repetição	Oligonucleotídeos iniciadores (5'- 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Tm (°C)
Bi01	(GT) ₁₁	F - GAG CCC AGT GAA TTG TTT AG R - GAG AGT GGC AGG TGT ATA GG	244	57
Bi02	(TC) ₅	F - GGA GTC TTG AAA GGT CTT CC R - TGA TGG AAG TAC TGA ACC CT	205	58
Bi03*	(GTCT) ₅₍₁₈₎ (GTCT) ₅	F - CTG CTG TCT GTC CTG GGC R - CCT CGG GAC AGA CAG ACA G	119	61
Bi04	(TTTTTC) ₁₆	F - GCC GGT TTT GCT CTT TTT R - ATA GGG GAA ATA GAA GGG ATA A	224	61
Bi05	(TTTG) ₄	F - ACA GAT ACT ACC AAA CCC CA R - TGC AAA CCT ACA CTG AAA GA	271	57
Bi06	(AGC) ₄	F - AAG ACC TTC TCT TCC CAC TC R - ATG GTT CAG ATC CTG AGA TG	178	57
Bi07	(TA) ₅	F - GCA TGC TGT AGT ACT TTG AGT T R - GGA ATA GTG GGA CCA ACA G	185	58
Bi08	(TTGG) ₄	F - AGT CAG CTC TTG CCT CTC TC R - AAC TCA AAG TAC TAC AGC ATG C	98	58
Bi09	(CT) ₄ (TTC) ₂ (TC) ₄	F - CGA AGA GCG GAG GAA ATC R - CTC TCC GGG CTC ATC ACA	266	61
Bi10	(AC) ₅ AA(AC) ₄	F - GAT TCA GGG TGC CAA CTT R - CGG ATG CTA ATC AAA TAC CT	164	58
Bi11	(GT) ₄	F - TGC TGT TTA GAG GGA CCT AA R - GTT ACG GTT CCA GAA TAC CC	261	59

Bi12	(CA) ₄ (TC) ₂	F - CAG CTG AGC AAA CAC CTT G R - TCG CAG TTT GCA TAT ACT CTG	219	60
Bi13	(AC) ₄ (CT) ₂ (GT) ₂	F - CTA ATT CCC GTA TTC CCT TT R - CAC AGG CAG ATG AGC AGT G	175	60
Bi14	(CA) ₂ (TC) ₄	F - CCT AGA TTC TAA CCA TTG CC R - GAA CTG AGG CTG TCT GGA C	204	57
Bi15	(TTCC) ₂ (AG) ₄	F - GGG CTT GTA TGA TGA ACT TT R - TTT CTC CAC TCT AGT TGC TGT	184	56
Bi16	(GT) ₃₂	F - CAT GTC TGA GAG GGG GAT R - ATA CTC AAG CTA TGC ATC CA	251	57
Bi17	(TG) ₂₁	F - AGG CAG GGG TGT GTG TCA R - CAC GCA CCG CAC ACA CC	127	62
Bi18	(TA) ₈ (CA) ₆	F - CAT GAC CAT GTT CCT TCG R - TAG AGC ATT AGC TAA CGT AAG	190	57
Bi19	(CAG) ₇	F - ACA GGT GGT GAC AGC TTA TC R - CAA TGC TAA AGT GTC AGG ACT	257	58
Bi20	(TGC) ₅	F - TGG ATT AGG TCC TGT TAT TC R - ACA GTA AGT TCG GCT TCT G	230	56
Bi21	(GTCC) ₆	F - CCA AAC TGA CCA AAG AGC T R - ATA CAA AAC AAA TGA TGC ACA	188	58
Bi22	(AC) ₅ T(AC) ₈	F - AGC CAT TCC AGA GCC TAG R - GAA GTC TGA CCG GGA ATG	236	58
Bi23	(TA) ₅ (TG) ₇	F - CCA TGG CTT ACC AGT CCT R - GCA TCC GAT ACA GTA GTA TGG	198	59
Bi24	(GT) ₁₀	F - CAG AAT CTC TTC CTA CTG GG R - GGC TTT AGA TCA GAA GAG TTC	194	57
Bi25	(GT) ₉	F - AGG TAA GGA GCT GCA GCA R - CAG GTG CAA TGT GAT TTG A	156	59
Bi26	(AG) ₉	F - GCT TCA GAC CAC CCG TG R - CAC CGG TTA GCA AGG AAT	270	59
Bi27	(AC) ₈	F - ACC ACT AAG GCA CTT CAC TC R - TGT GAA GGC CGT AGC TAG	168	58
Bi28	(TG) ₈	F - TCT TAA CAG ATG TTC CAA GTG R - AAC ACC GTT CTG TGC TTC	194	56
Bi29	(CA) ₈	F - CTG ACA ACA CCG TTC TGT G R - TAA CAG ATG TTC CAA GTG ACA	196	57
Bi30	(GT) ₇	F - ACC TTA GCA AAC CCC CTC R - GAG CGG GAT GAG CAT CA	208	60
Bi31	(AC) ₇	F - TCT CTT TGG GGA AGT TAC C R - GTT AAA CAA ACT TGG AGG GT	154	58
Bi32	(CA) ₃₀	F - TAA AAT TGT TCT TGG CGA T R - ACG GGG GTG TGT GTG TG	152	58

Testes de PCR foram realizados em todos os 32 locos para se verificar se ocorria amplificação do fragmento de tamanho esperado. Em 23 locos (Bi01, Bi02, Bi05, Bi06, Bi07, Bi08, Bi10, Bi11, Bi12, Bi13, Bi15, Bi18, Bi19, Bi20, Bi21, Bi22, Bi23, Bi25, Bi26, Bi28, Bi29, Bi30 e Bi31) foi amplificado um único fragmento com o tamanho esperado. A reação de PCR nesses locos foi padronizada para um volume final de 10µl utilizando-se: tampão 1X (10mM Tris pH 8,4 e 50mM KCl), 0,25mM dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 2 pmol do iniciador “forward”, 8 pmol do iniciador “reverse”, 8 pmol de M13 marcado com fluorescência FAM, TET ou HEX, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Biotools) e 60ng do DNA molde.

O programa consistiu em um ciclo de desnaturação à 94°C por 5 min, 20 ciclos a 94°C por 30s, temperatura de anelamento (Tabela 4) por 45s e 72°C por 45s, sendo a temperatura de anelamento diminuída 0,1°C a cada ciclo (“touchdown”), 15 ciclos a 94°C por 30s, temperatura de anelamento 2°C abaixo da inicial por 45s e 72°C por 45s, doze ciclos a 94°C por 30s, 53°C por 45s (anelamento da cauda M13) e 72°C por 45s, e por fim, um passo de extensão final a 72°C por 20 min.

Quanto aos demais locos, sete deles (Bi03, Bi04, Bi09, Bi14, Bi16, Bi17 e Bi24) não apresentaram amplificação em nenhuma das condições testadas. Nos locos Bi09, Bi14, Bi16, Bi17 e Bi24 a amplificação foi obtida apenas quando a reação de PCR era feita sem incluir M13 marcado com fluorescência e, mesmo assim, foram vistas bandas muito fracas no gel de agarose, o que indicava baixo rendimento da reação. Nos locos Bi03 e Bi04 não se obteve amplificação em nenhuma condição, nem mesmo na ausência do M13.

Por fim, os locos Bi27 e Bi32 apresentaram amplificação de várias bandas de tamanhos muito semelhantes, de forma que não foi possível avaliar se os picos lidos na genotipagem eram realmente alelos ou picos resultantes de bandas inespecíficas. As

bandas inespecíficas apareciam mesmo com o aumento da temperatura de anelamento em até 3,0–3,5°C e não se observou amplificação ao aumentar a temperatura em 4°C ou mais. Dessa forma, esses dois locos, juntamente com os sete locos que não amplificavam quando se incluía o M13, não foram considerados para a caracterização do grau de polimorfismo.

5.2.2. Caracterização dos locos isolados e amplificação cruzada

Dos 23 locos que amplificaram com sucesso, 12 se mostraram monomórficos: Bi02 (alelo 218), Bi05 (292), Bi06 (196), Bi07 (206), Bi10 (181), Bi11 (281), Bi12 (236), Bi19 (250), Bi21 (215), Bi23 (281), Bi25 (172) e Bi31 (173). Onze locos se mostraram polimórficos: Bi01 com quatro alelos (263, 265, 267 e 269), Bi08 com dois alelos (111 e 119), Bi13 com dois alelos (191 e 193), Bi15 com dois alelos (199 e 201), Bi18 com quatro alelos (208, 210, 212 e 214), Bi20 com três alelos (250, 253 e 256), Bi22 com dois alelos (248 e 254), Bi26 com três alelos (287, 289 e 291), Bi28 com dois alelos (211 e 213), Bi29 com dois alelos (211 e 213) e Bi30 com dois alelos (226 e 228).

O número de alelos por loco variou de dois a quatro. No total, foram encontrados 28 alelos nos 11 locos polimórficos, média de aproximadamente 2,54 alelos/loco. A heterozigosidade esperada para cada loco variou de 0,083 nos locos Bi13 e Bi30 a 0,561 no loco Bi01, com média de 0,351. A heterozigosidade observada para cada loco variou de 0,086 nos locos Bi13 e Bi30 a 0,657 no loco Bi01, com média de 0,337. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,079 para os locos Bi13 e Bi30 a 0,453 para o loco Bi01 (Tabela 5).

Tabela 5. Características dos 11 locos polimórficos encontrados para *Bubulcus ibis*, a partir de 35 indivíduos da população de Rio Claro (SP). He = heterozigosidade esperada; Ho = heterozigosidade observada; PIC = conteúdo de informação polimórfica.

Loco	Motivo de Repetição	Número de alelos (faixa de tamanho)	He	Ho	PIC
Bi01	(GT) ₁₁	4 (263-269)	0,561	0,657	0,453
Bi08	(TTGG) ₄	2 (111-119)	0,358	0,286	0,290
Bi13	(AC) ₄ (CT) ₂ (GT) ₂	2 (191-193)	0,083	0,086	0,079
Bi15	(TTCC) ₂ (AG) ₄	2 (199-201)	0,504	0,343	0,373
Bi18	(TA) ₈ (CA) ₆	4 (208-214)	0,475	0,429	0,427
Bi20	(TGC) ₅	3 (250-256)	0,531	0,588	0,425
Bi22	(AC) ₅ T(AC) ₈	2 (248-254)	0,401	0,371	0,317
Bi26	(AG) ₉	3 (287-291)	0,438	0,371	0,391
Bi28	(TG) ₈	2 (211-213)	0,269	0,314	0,230
Bi29	(CA) ₈	2 (211-213)	0,159	0,171	0,144
Bi30	(GT) ₇	2 (226-228)	0,083	0,086	0,079

O polimorfismo no loco Bi10 apresentou um padrão inesperado, com um alelo mais comum 181 e outro alelo 157 apenas em poucos indivíduos (sendo dois homozigotos e quatro heterozigotos em 35 indivíduos). Como esses alelos tinham tamanhos muito diferentes entre si, foi realizado o seqüenciamento de dois indivíduos homozigotos para cada alelo. Os resultados demonstraram que o fragmento de 157pb, considerado como alelo 157, era na realidade resultante de uma deleção de 23pb do fragmento correspondente ao alelo 181 que ocorria logo após o término da seqüência de microssatélite (Figura 8). Como esse polimorfismo observado não era referente ao microssatélite em si, o loco Bi10 foi considerado monomórfico, estando o alelo 181 fixado na população.

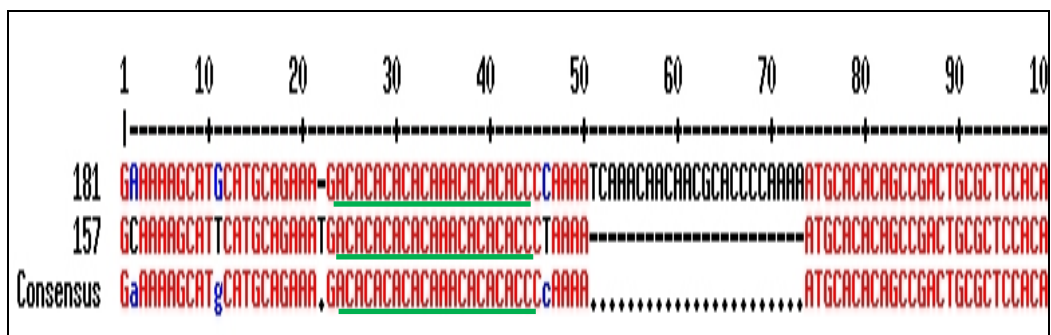


Figura 8. Alinhamento das sequências correspondentes aos dois supostos alelos do loco Bi10. 181 = indivíduo considerado homozigoto para o alelo 181; 157 = um indivíduo considerado homozigoto para o alelo 157; a parte sublinhada em verde corresponde à sequência do microssatélite.

A amplificação cruzada dos 11 locos polimórficos isolados para *B. ibis* foi testada com um painel de seis espécies da família Ardeidae. Foi observada uma alta taxa de amplificação cruzada, de 81,81% para *E. caerulea* a 100% para *A. alba* e *E. thula*, nos quais sete locos (Bi01, Bi13, Bi15, Bi18, Bi20, Bi26 e Bi28) puderam ser amplificados com sucesso em todas as espécies testadas (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados dos testes de amplificação cruzada com os locos isolados para *Bubulcus ibis*. + amplificação; - ausência de amplificação.

Loco	<i>A. cocoi</i>	<i>A. alba</i>	<i>E. caerulea</i>	<i>E. thula</i>	<i>N. nycticorax</i>	<i>N. violacea</i>
Bi01	+	+	+	+	+	+
Bi08	-	+	+	+	+	+
Bi13	+	+	+	+	+	+
Bi15	+	+	+	+	+	+
Bi18	+	+	+	+	+	+
Bi20	+	+	+	+	+	+
Bi22	+	+	-	+	+	+
Bi26	+	+	+	+	+	+
Bi28	+	+	+	+	+	+
Bi29	+	+	-	+	+	+
Bi30	+	+	+	+	-	-
Taxa de amplificação cruzada (%)	90,90	100	81,81	100	90,90	90,90

5.3. Análises populacionais

5.3.1. Avaliação do grau de polimorfismo nos locos de microssatélites heterólogos

Foi obtida a amplificação de fragmentos de tamanhos esperados nos locos Ah217, Ah320, Ah414 e Ah536, enquanto que nos locos Ah522 e Ah526 não se obteve produto de amplificação. Testes com esses locos foram feitos diminuindo a temperatura de anelamento em até 4°C e também incluindo agentes otimizadores como betaína, DMSO (dimetilsulfóxido) e BSA (albumina do soro bovino), mas ainda assim não foi obtida amplificação. Foram descartados os locos Ah211, Ah343 e Ah630 que apresentaram fragmentos amplificados apenas para algumas amostras e o loco Ae47 que apresentou várias bandas inespecíficas próximas à banda de tamanho esperado, impossibilitando a identificação dos alelos na genotipagem.

Dos quatro locos que amplificaram com sucesso, Ah414 foi monomórfico e Ah320 apresentou apenas dois alelos, dos quais um deles estava em uma frequência muito baixa para ser utilizado nas análises populacionais (apenas três heterozigotos em 35 indivíduos). Dos nove locos testados, portanto, apenas dois foram selecionados para as análises: os locos Ah217 e Ah536, ambos apresentando cinco alelos distintos na população de Rio Claro (SP).

5.3.2. Frequências alélicas e estimativas de diversidade genética

As frequências alélicas usadas nas análises comparativas populacionais foram baseadas nos sete locos de microssatélites específicos, selecionados dentre os 11 locos polimórficos isolados: Bi01, Bi08, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22 e Bi26. Os locos específicos Bi13, Bi28, Bi29 e Bi30 não foram incluídos, pois apresentaram um nível de variação muito baixo para a população de Rio Claro (SP).

Nas amostras de penas de Manaus (AM) não foi obtida amplificação para nenhum dos dois locos heterólogos polimórficos mesmo após a diluição do DNA em 20

vezes ou ao incluir BSA (albumina do soro bovino), conhecida por garantir a amplificação mesmo na presença de contaminantes. Como essa população é de grande importância dentro da temática desse trabalho, optou-se por não utilizar os dados oriundos dos locos heterólogos nas análises populacionais, porém as frequências alélicas e as estimativas de diversidade genética calculadas para as cinco populações (exceção de Manaus) incluindo os dois locos heterólogos são mostradas nos Apêndices I e II. Na Tabela 7, são mostradas as frequências alélicas nas seis populações, obtidas a partir dos sete locos específicos.

Tabela 7. Alelos e frequências alélicas por loco e por população.

Loco	Alelos	Populações					
		Barra do Ribeiro	Eldorado do Sul	Rio Claro	Garanhuns	Fernando de Noronha	Manaus
Bi01	263	0,063	0,080	0,043	0,087	0,043	0,250
	265	0,594	0,480	0,457	0,543	0,429	0,292
	267	0,344	0,420	0,486	0,348	0,471	0,292
	269	0	0,020	0,014	0,022	0,057	0,167
Bi08	111	0,188	0,260	0,229	0,174	0,191	0,200
	115	0	0	0	0	0	0,200
	119	0,813	0,740	0,771	0,826	0,809	0,600
Bi15	195	0	0	0	0	0	0,038
	197	0	0	0	0	0	0,038
	199	0,438	0,640	0,543	0,587	0,329	0,308
	201	0,563	0,360	0,457	0,413	0,671	0,615
Bi18	204	0	0,020	0	0	0	0
	208	0,063	0,020	0,014	0,022	0,014	0,115
	210	0,813	0,860	0,700	0,826	0,757	0,692
	212	0,094	0,080	0,129	0,109	0,114	0,077
	214	0,031	0,020	0,157	0,043	0,114	0,115
Bi20	250	0,375	0,480	0,382	0,435	0,386	0,346
	253	0,625	0,500	0,574	0,522	0,543	0,385
	256	0	0,020	0,044	0,043	0,071	0,269
Bi22	248	0,219	0,520	0,271	0,478	0,500	0,286
	254	0,781	0,480	0,729	0,522	0,500	0,714
Bi26	287	0,188	0,260	0,157	0,065	0,114	0,154
	289	0,813	0,580	0,729	0,739	0,871	0,769
	291	0	0,160	0,114	0,196	0,014	0,077

Na população de Rio Claro, selecionada para a caracterização inicial dos locos específicos, o número de alelos por loco variou de dois a quatro, mas ao se incluir na análise as demais populações, um novo alelo (115) foi encontrado para o loco Bi08 na população de Manaus, totalizando três alelos para esse loco, dois novos alelos (195 e 197) foram encontrados para o loco Bi15 também na população de Manaus, totalizando quatro alelos e um novo alelo (204) foi encontrado para o loco Bi18, presente apenas na população de Eldorado de Sul, o que totaliza cinco alelos para esse loco. Dessa forma, o número de alelos por locos passou a ser de dois a cinco, considerando-se todas as populações analisadas.

A análise pelo Micro-Checker não detectou a ocorrência de “dropout” ou de alelos nulos em nenhum dos locos específicos estudados. Os testes exatos de desequilíbrio de ligação resultaram em valores não-significativos ($p > 0,05$), indicando que não há associação preferencial de alelos entre os locos. Também não foram encontrados valores estatisticamente significativos de p ($p < 0,05$) para nenhum dos locos quanto aos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os valores médios de riqueza alélica variaram de 1,659 em Barra do Ribeira a 2,777 em Manaus. A estimativa de Fis variou de -0,067 em Fernando de Noronha a 0,194 em Barra do Ribeiro, sendo o p significativo ($p < 0,05$) apenas para a população de Barra do Ribeiro ($p = 0,021$). A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,408 para Barra do Ribeiro a 0,562 para Manaus, a heterozigosidade observada (H_o) de 0,330 para Barra do Ribeiro à 0,480 para Eldorado do Sul (Tabela 8). Os valores de H_e das populações de Barra do Ribeiro e Manaus diferiram significativamente ($p = 0,046$) segundo o Teste G feito no programa Bioestat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

Tabela 8. Estimativas de diversidade genética baseadas nos dados dos sete locos de microssatélites específicos. Ho = heterozigozidade observada; He = heterozigozidade esperada; Ra = riqueza alélica; Fis = coeficiente de endogamia; P_{EHW} = valor de *p* obtido no teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

População	Loco	Ho	He	Ra	Fis	P _{EHW}
Barra do Ribeiro	Bi01	0,500	0,542	2,691	0,080	0,959
	Bi08	0,250	0,315	1,980	0,211	0,473
	Bi15	0,250	0,508	2,000	0,516	0,050
	Bi18	0,375	0,337	2,965	-0,118	0,991
	Bi20	0,250	0,484	2,000	0,492	0,062
	Bi22	0,313	0,353	1,991	0,118	0,732
	Bi26	0,375	0,315	1,980	-0,200	0,356
	Média	0,330	0,408	1,659	0,194	-
Eldorado do Sul	Bi01	0,680	0,598	3,024	-0,140	0,379
	Bi08	0,280	0,393	1,993	0,291	0,173
	Bi15	0,480	0,470	1,999	-0,021	0,835
	Bi18	0,240	0,258	2,584	0,071	0,287
	Bi20	0,640	0,530	2,280	-0,213	0,456
	Bi22	0,640	0,509	2,000	-0,263	0,158
	Bi26	0,400	0,582	2,937	0,317	0,129
	Média	0,480	0,477	2,117	-0,006	-
Rio Claro	Bi01	0,657	0,561	2,694	-0,174	0,761
	Bi08	0,286	0,358	1,983	0,204	0,261
	Bi15	0,343	0,504	2,000	0,322	0,067
	Bi18	0,429	0,475	3,015	0,100	0,707
	Bi20	0,588	0,531	2,505	-0,110	0,864
	Bi22	0,371	0,401	1,993	0,075	0,719
	Bi26	0,371	0,438	2,781	0,153	0,066
	Média	0,435	0,467	2,139	0,069	-
Garanhuns	Bi01	0,565	0,588	3,083	0,040	0,373
	Bi08	0,261	0,294	1,960	0,114	0,659
	Bi15	0,391	0,496	2,000	0,214	0,355
	Bi18	0,261	0,310	2,678	0,162	0,833
	Bi20	0,565	0,549	2,521	-0,031	0,987
	Bi22	0,609	0,510	2,000	-0,198	0,292
	Bi26	0,435	0,420	2,648	-0,035	0,796
	Média	0,441	0,452	1,842	0,026	-
Fernando de Noronha	Bi01	0,714	0,598	3,093	-0,199	0,771
	Bi08	0,265	0,314	1,965	0,159	0,401
	Bi15	0,429	0,448	1,998	0,043	0,865
	Bi18	0,371	0,406	2,899	0,087	0,866
	Bi20	0,629	0,559	2,684	-0,126	0,793
	Bi22	0,657	0,507	2,000	-0,301	0,063
	Bi26	0,200	0,231	2,050	0,135	0,819

	Média	0,466	0,438	2,099	-0,067	-
Manaus	Bi01	0,583	0,772	3,978	0,252	0,056
	Bi08	0,400	0,589	2,994	0,333	0,427
	Bi15	0,462	0,545	3,077	0,158	0,935
	Bi18	0,462	0,508	3,628	0,094	0,395
	Bi20	0,692	0,686	2,999	-0,009	0,895
	Bi22	0,286	0,440	2,000	0,368	0,427
	Bi26	0,462	0,394	2,764	-0,180	0,760
	Média	0,478	0,562	2,777	0,157	-

5.3.3. Parâmetros populacionais

Os genótipos individuais obtidos pela análise dos microssatélites foram utilizados para estimativas do tamanho efetivo populacional (N_e), utilizando-se o método baseado no desequilíbrio de ligação gamética. Os resultados mostraram um menor N_e na população de Manaus (6,2), seguido de Barra do Ribeiro (8,0). Os maiores N_e foram vistos nas populações de Fernando de Noronha (64,7) e de Rio Claro (onde o N_e foi estimado como sendo infinito) (Tabela 9). A estimativa realizada unindo as seis populações brasileiras ($N=147$) resultou em um N_e igual à 6,6 (95% CL: 5,7-7,7).

O parentesco médio dentro de cada população (99 permutações, com intervalo de confiança de 95%) variou de -0,277 em Manaus à 0,112 em Fernando de Noronha (Tabela 9; Figura 9). Esses valores não diferiram significativamente de zero segundo teste t de Student feito pelo Bioestat 5.0. Os valores de parentesco médios obtidos estão na faixa (de 0 à 0,25), considerada como de indivíduos não-relacionados (BLOUIN *et al.*, 1996).

Tabela 9. Parâmetros intra-populacionais obtidos a partir dos dados dos sete locos específicos. Ne = tamanho efetivo populacional, (95%IC) = (95% de intervalo de confiança); N = tamanho amostral; r = coeficiente de parentesco médio.

População	Ne (95% IC)	N	r
Barra do Ribeiro	8,0 (4,5–16,9)	16	0,080
Eldorado do Sul	26,2 (13,1–97)	25	-0,001
Rio Claro	∞ (69,8–∞)	35	-0,032
Garanhuns	15,4 (8,7–34,2)	23	0,063
Fernando de Noronha	64,7 (24,3 –∞)	35	0,112
Manaus	6,2 (3,9–11,4)	13	-0,277

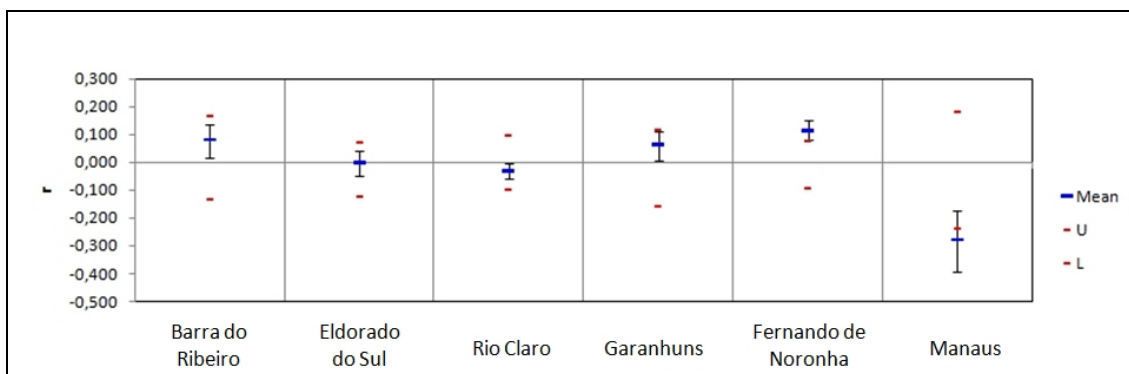


Figura 9. Parentesco médio observado para as populações de *B. ibis*. Mean = valor do parentesco médio; U = limite de confiança superior e L = limite de confiança inferior.

Um teste para averiguar a ocorrência de gargalo genético foi feito com todas as populações. Valores de p significativos foram obtidos na população de Rio Claro, tanto assumindo o modelo TPM ($p=0,039$) quanto o modelo de IAM ($p = 0,007$), mas não considerando o modelo SMM ($p = 0,468$) (LUIKART *et al.*, 1998). Esse resultado será discutido considerando-se os parâmetros populacionais obtidos.

5.3.4. Análise de diferenciação genética entre as populações

As distâncias genéticas de Nei, estimadas a partir das frequências alélicas dos sete locos de microssatélites específicos, variaram de 0,0046 à 0,1039, sendo a menor distância observada entre Eldorado do Sul e Garanhuns e a maior entre Barra do Ribeiro e Manaus (Tabela 10). Na Figura 10, o dendrograma feito a partir do método UPGMA ilustra essas relações genéticas. Os valores baixos de “bootstrap” demonstram que não há suporte para as separações dos ramos.

Tabela 10. Distâncias genéticas de Nei entre as populações, estimadas usando as frequências alélicas nos sete locos de microssatélites específicos de *Bubulcus ibis*.

	Barra do Ribeiro	Eldorado do Sul	Rio Claro	Garanhuns	Fernando de Noronha	Manaus
Barra do Ribeiro	-					
Eldorado do Sul	0,0412	-				
Rio Claro	0,0062	0,0260	-			
Garanhuns	0,0221	0,0046	0,0153	-		
Fernando de Noronha	0,0241	0,0420	0,0254	0,0228	-	
Manaus	0,1039	0,0720	0,0988	0,0615	0,0335	-

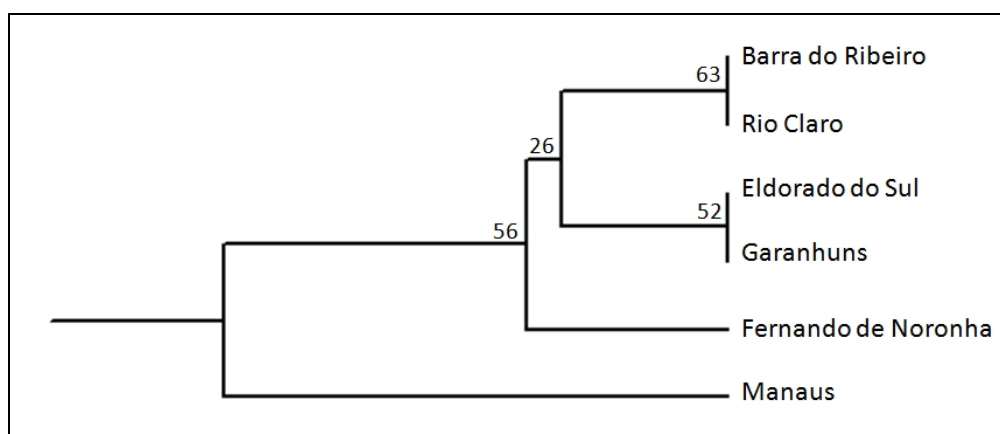


Figura 10. Dendrograma UPGMA construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978) com os dados dos sete locos de microssatélites específicos de *B. ibis*. Os números indicam o nível de suporte (“bootstrap”) para cada ramo.

A análise do número de possíveis populações (K) foi realizada utilizando-se a abordagem bayesiana do programa STRUCTURE 2.3.1, sendo inicialmente supostos valores de k entre um e seis (número mínimo e máximo de populações possíveis). Os resultados dessa análise demonstraram a existência de um único cluster (estimativa de $k = 1$ pelo log-likelihood) (Figura 11). Esse resultado significa que a probabilidade dos indivíduos pertencerem a qualquer uma dessas seis populações é a mesma, ou seja, não há subdivisão entre as populações estudadas e todos os indivíduos pertencem à uma única unidade populacional.

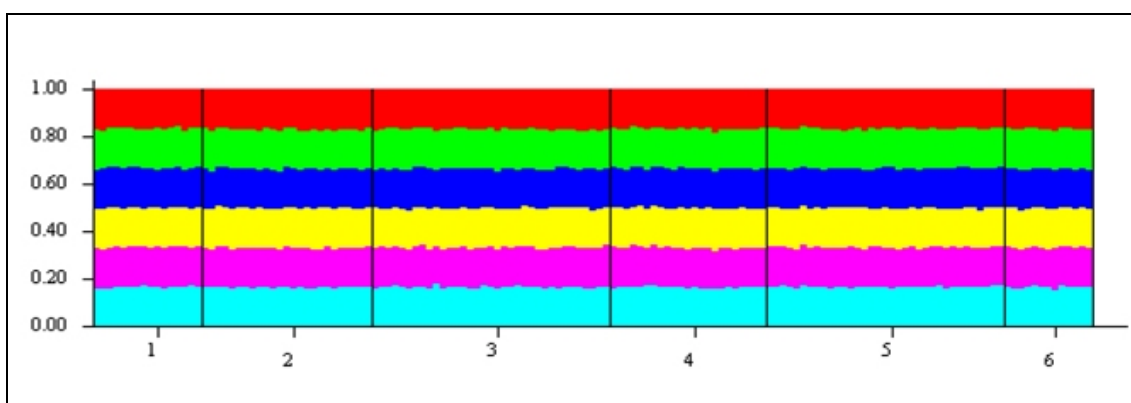


Figura 11. Diagrama “bar plot” fornecido pelo STRUCTURE 2.3.1. As barras verticais representam, para cada indivíduo, as probabilidades de pertencimento aos grupos inferidos. 1) Barra do Ribeiro, 2) Eldorado do Sul, 3) Rio Claro, 4) Garanhuns, 5) Fernando de Noronha e 6) Manaus.

A análise de variância molecular (AMOVA), realizando-se 1000 permutações, mostrou que a distribuição da maior parte da variação genética presente pode ser explicada pela diferença entre os indivíduos dentro das populações: 94,11%, sendo apenas 2,44% da variação existente explicada pelas diferenças entre elas (Tabela 11; Figura 12).

Tabela 11. Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total presente nas populações; SS = soma dos quadrados; Est. var. = estimativa da variância; % = porcentagem da variância total.

Fonte	SS	Est. Var.	%
Entre populações	17,770	0,04037	2,44%
Entre indivíduos dentro das populações	232,843	0,05697	3,45%
Entre os indivíduos	226,000	1,55591	94,11%
Total	476,613	1,65325	100%

Fst = 0,0244
p do Fst = 0,0039

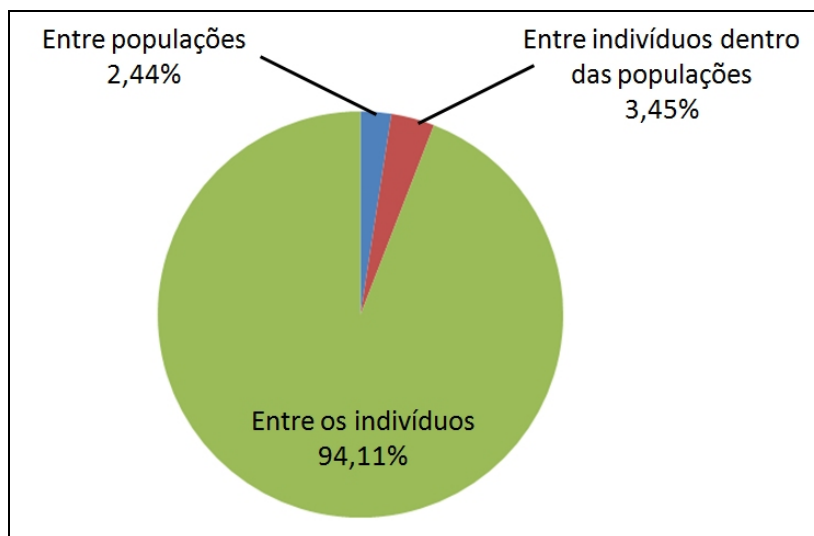


Figura 12. Distribuição da diversidade genética segundo a análise AMOVA.

O Fst par-a-par das populações mostrou valores de *p* significativos entre Barra do Ribeiro e Manaus, Eldorado do Sul e Manaus, Rio Claro e Manaus e entre Eldorado do Sul e Fernando de Noronha (Tabela 12). O índice Rst par-a-par foi calculado realizando-se 1000 permutações a partir de cinco locos, pois os locos Bi15 e Bi18 foram excluídos por serem constituídos de microssatélites compostos. Valores de *p*

significativos foram observados entre Barra do Ribeiro e Fernando de Noronha, Barra do Ribeiro e Manaus, e entre Rio Claro e Manaus (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de F_{st} (abaixo da diagonal) e R_{st} (acima da diagonal) estimados para os pares de populações. *estão em negrito os pares cujo p foi significativo ($p < 0,05$).

	Barra do Ribeiro	Eldorado do Sul	Rio Claro	Garanhuns	Fernando de Noronha	Manaus
Barra do Ribeiro	-	0,0498	-0,0119	0,0359	0,0460*	0,1422*
Eldorado do Sul	0,0363	-	0,0289	-0,0052	-0,0057	0,0117
Rio Claro	-0,0048	0,0194	-	0,0226	0,0260	0,1036*
Garanhuns	0,0136	-0,0052	0,0078	-	-0,0073	0,0362
Fernando de Noronha	0,0204	0,0407*	0,0232	0,0197	-	0,0203
Manaus	0,0863*	0,0504*	0,0757*	0,0458	0,0286	-

O cálculo da intensidade do fluxo gênico, baseada no índice F_{st} e corrigido para o tamanho amostral, mostrou que o número de migrantes por geração (N_m) foi de 1,11. Na análise baseada no R_{st} , o número de migrantes foi de 6,62. Ambos os resultados indicam a existência de fluxo gênico entre as populações.

Os resultados obtidos pelo teste de Mantel demonstraram não haver correlação significativa entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as localidades amostradas, considerando os valores de F_{st} ($r = 9,19$; $p = 0,27$) ou os valores de R_{st} ($r = 2,96$; $p = 0,58$). O teste de alocação mostrou que 104 indivíduos (71%) foram alocados em outras populações que não as de origem, enquanto que 43 indivíduos (29%) foram alocados na sua própria população de origem. A maior porcentagem de alocação correta foi observada em Barra do Ribeiro, onde 50% dos indivíduos foram alocados na sua população de origem, seguida da população de Manaus (38,5%), Garanhuns (34,8%), Fernando de Noronha (34,3%), Eldorado do Sul (20%) e por fim Rio Claro (11,4%).

6. DISCUSSÃO

6.1 Amostras e extração do DNA

Foram extraídas 147 amostras de *B. ibis*, sendo 13 de penas e 134 de sangue. Todas as amostras de DNA extraídas de sangue apresentaram quantidades suficientes de DNA para as reações de PCR realizadas, enquanto que as amostras de penas renderam uma baixa concentração de DNA (1 a 14 ng/μl), muito inferior às obtidas com sangue. Esse resultado era esperado pois as penas possuem menor quantidade de DNA disponível para extração, o que resulta em uma menor quantidade final extraída, como previsto por Taberlet e cols. (1996) para extrações de amostras não invasivas.

No entanto, a amostragem não-invasiva é a melhor alternativa para a obtenção de amostras no estudo de populações onde nem sempre é possível a captura dos indivíduos (ROON *et al.*, 2005). Em aves, esse tipo de amostragem restringe-se à coleta de penas de muda reprodutiva, que podem ser encontradas caídas ao solo de áreas de pouso, alimentação e colônias. As penas por estarem expostas ficam vulneráveis aos processos naturais de degradação, o que também pode ter contribuído para a baixa quantidade de DNA obtido nas amostras desse trabalho (TABERLET *et al.*, 1996).

Foi observado que a quantidade de DNA das amostras de penas variou positivamente com o tamanho da pena e do coágulo de sangue existente na região do umbílico superior. Assim, penas com coágulos maiores resultaram na obtenção de maior quantidade de DNA, resultado concordante com os de Segelbacher (2002) e de Hórvath e cols. (2005). Também foi observado que o DNA das amostras de penas apresentaram algum inibidor que interferia na amplificação dos locos de microssatélites. A amplificação só foi obtida para os locos específicos após a diluição do DNA dez vezes a partir da concentração inicial, de forma que a concentração utilizada nas reações de PCR para essas amostras foi de 0,1 à 1,4ng/μl. Para os locos heterólogos, nem mesmo após a diluição foi obtida amplificação.

Apesar de resultarem em baixa quantidade de DNA, trabalhos recentes têm mostrado que o DNA oriundo de penas pode ser utilizado com sucesso em análises genéticas (CHAN *et al.*, 2008; MIÑO; DEL LAMA, 2009; YANNIC *et al.*, 2011). No entanto, ao se trabalhar com marcadores microssatélites é preciso atentar-se para o fato de que a baixa quantidade e qualidade do DNA extraído das penas pode resultar em falhas na amplificação e, conseqüentemente, em erros na genotipagem (POMPANON *et al.*, 2005; HÓRVATH *et al.*, 2005). Outra complicação advém do fato que moléculas de contaminantes têm maior probabilidade de serem amplificadas quanto menor for o número de moléculas de DNA molde (TABERLET *et al.*, 1996).

Dessa forma, para garantir a confiabilidade dos resultados, todos os genótipos duvidosos foram repetidos para confirmação dos dados. Além desse controle, as 13 penas de Manaus foram analisadas pelo programa GIMLET 1.3.3, para checar a combinação de genótipos nos sete locos espécie-específicos para cada pena. Os resultados mostraram que não havia nenhuma combinação idêntica de genótipos, o que assegurou que cada pena pertencia a um indivíduo distinto.

Durante o tempo de execução desse trabalho, recebemos informações desconhecidas a respeito de formação de colônias reprodutivas nos estados da região norte do país, inviabilizando a coleta de amostras de sangue dos ninhegos. Dessa forma, mesmo com suas limitações, a amostragem das penas de muda de indivíduos de uma população de Manaus (AM) foi a forma encontrada para se incluir uma amostra da região norte do país nas análises. Essa é uma região de grande importância dentro da proposta desse trabalho, já que é a mais próxima dos primeiros registros dessa ave na América do Sul.

6.2. Isolamento e caracterização dos locos de microssatélites específicos

6.2.1. Locos de microssatélites específicos desenvolvidos para *Bubulcus ibis*

Para a prospecção de locos de microssatélites específicos de *B. ibis* foi sequenciado um total de 432 clones recombinantes positivos, dos quais 68 continham sequências de microssatélites, o que representa uma eficiência de clonagem de 15,74%. Inicialmente foram consideradas todas as sequências de microssatélites que possuíam no mínimo quatro repetições. No entanto, verificou-se que, na literatura, a maioria dos trabalhos publicados tem considerado apenas sequências que possuem no mínimo cinco repetições.

Se forem consideradas nesse trabalho apenas as sequências com cinco ou mais repetições, o número de clones contendo microssatélites cai para 56 e a eficiência da clonagem cai para 12,96%. Ainda assim, esse valor é superior aos descritos na literatura para outras aves, em trabalhos utilizando o mesmo método de isolamento, como 3,30% para *Eudocimus ruber* (SANTOS *et al.*, 2006), 5,16% em biblioteca conjunta para *Sterna hirundinacea* e *Rynchops niger* (FARIA *et al.*, 2007) e 9,97% para *Larus novaehollandiae scopulinus* (GIVEN *et al.*, 2002). O resultado dessa prospecção, porém, foi inferior aos encontrados para *Nipponia nippon*, 20% de eficiência de clonagem (JI *et al.*, 2004) e para *Egretta eulophotes* que foi de 37,57% (HUANG *et al.*, 2010).

Comparações entre os valores de eficiência de clonagem devem ser feitas com cautela porque as diferenças podem estar associadas às diferentes técnicas de isolamento utilizadas. Given e cols. (2002), por exemplo, utilizaram tanto a técnica de isolamento padrão (DAWSON *et al.*, 1997) quanto a técnica de enriquecimento (HAMILTON *et al.*, 1999), e obtiveram maior eficiência de clonagem com a segunda. Pela técnica padrão Given e cols. (2002) escanearam cerca de 150 mil clones e conseguiram 300 clones positivos (eficiência de apenas 0,2%). Pela técnica de

enriquecimento, Szczys e cols. (2005) escanearam aproximadamente 250 milhões de pares de bases do genoma da espécie *Sterna dougalli* e conseguiram apenas 166 clones positivos. Além da influencia da técnica utilizada no isolamento, é importante ressaltar que as aves, quando comparadas aos outros taxa como peixes e mamíferos, apresentam eficiência de clonagem sempre menores (ZANE *et al.*, 2002).

A baixa eficiência das prospecções em aves tem sido atribuída ao número baixo de microssatélites presentes nesse grupo (PRIMMER *et al.*, 1997; NEFF; GROSS, 2001). Primmer e cols. (1997) levantaram duas hipóteses para explicar essa baixa frequência de locos de microssatélites no genoma das aves. A primeira hipótese supõe que ela é resultante de uma redução no tamanho do genoma, imposta pela evolução do vôo, o que acabaria resultando em uma menor proporção de DNA não-codificante, responsável pela maioria dos microssatélites. Dados anteriores de Van Den Bussche e cols. (1995) dão suporte a essa hipótese, pois mostraram que os morcegos tinham genomas menores e menor número de locos de microssatélites, comparados aos demais mamíferos. A segunda hipótese de Primmer e cols. (1997) supõe que essa baixa frequência é porque o genoma das aves é pobre de precursores evolutivos dos microssatélites: retrotransposons SINEs (*Short Interspersed Elements*) e LINEs (*Long Interspersed Elements*) e também caudas poli-A.

Neff e Gross (2001) testaram essas duas hipóteses e, ao analisar vários taxa de vertebrados, concluíram que não existe relação entre a quantidade de microssatélites e o tamanho do genoma. Em seu estudo, comprovaram que é improvável que esse fator explique a deficiência de locos de microssatélites em aves, ou seja, rejeitaram a primeira hipótese de que a baixa frequência de microssatélites seja devido às limitações impostas pelo vôo. Esses autores porém obtiveram uma relação positiva entre a frequência dos precursores no genoma e frequência de microssatélites, indicando que, provavelmente,

essa seria a causa do genoma das aves ser tão pobre nesse tipo de marcador, quando comparada ao dos outros vertebrados.

No presente trabalho, foi possível desenhar oligonucleotídeos iniciadores para 32 locos de microssatélites para *B. ibis*. Desse total, foi obtida amplificação em 23 deles, resultando em obtenção de um fragmento único e de tamanho esperado. Para os oito locos que não apresentaram amplificação com o protocolo padrão, foram feitos testes sem a adição do M13 marcado com fluorescência, tendo sido obtida a amplificação do fragmento de tamanho esperado em seis desses locos. Esse tipo de falha em protocolos onde são adicionadas as caudas M13 com fluorescências não é incomum e pode ser contornada pela marcação direta dos oligonucleotídeos iniciadores (ARRUDA *et al.*, 2010). Assim sendo, esses seis locos ainda são potencialmente polimórficos, devendo ser alvo de estudos futuros.

No caso dos outros dois locos, onde foram amplificadas várias bandas inespecíficas, pode-se sugerir para o loco Bi27 o desenho e síntese de novos pares de oligonucleotídeos iniciadores. Já para o loco Bi32 essa alternativa não é possível, pois devido à aleatoriedade da inserção dos clones nos vetores de clonagem, havia apenas 6pb após o final da sequência do microssatélite, o que impossibilitava a construção do oligonucleotídeo iniciador “reverse”. Para desenhar um oligonucleotídeo nessa região, optou-se por incluir cinco repetições do microssatélite. Como resultado, o anelamento nesse loco se mostrou pouco específico, resultando na amplificação de várias bandas inespecíficas e impossibilitando seu uso nas análises. O resultado final da prospecção dos microssatélites foi a obtenção de 23 locos distintos para *B. ibis*, os quais poderiam ser monomórficos ou polimórficos para essa espécie.

6.2.2. Grau de polimorfismo dos locos de microssatélites e amplificação cruzada

Dos 23 locos selecionados para a análise do grau de polimorfismo, 11 mostraram-se polimórficos, o que correspondeu a 47,8% do total. A heterozigidade esperada por loco (H_e) variou de 0,083 a 0,561, a heterozigidade observada por loco (H_o) variou de 0,086 a 0,657 e o número de alelos (N_a) variou de dois a quatro. Comparando-se os dados obtidos no isolamento de locos de microssatélites específicos para *B. ibis* com os reportados na literatura nas prospecções em outras aves, observa-se que a porcentagem de locos polimórficos encontrado para *B. ibis* está próxima da que tem sido encontrada para outras aves da Ordem Pelecaniformes (Tabela 13).

Tabela 13. Dados do isolamento de locos de microssatélites para algumas espécies das famílias Ardeidae e Threskiornithidae, em comparação aos dados obtidos para *Bubulcus ibis*. LS = locos selecionados; LP = locos polimórficos; PLA (%) = porcentagem de locos polimórficos dentre os selecionados; H_e = variação da heterozigidade esperada; N_a = número de alelos.

Espécie	LS	LP	PLA (%)	H_e	N_a	Referência
<i>Nipponia nippon</i>	19	8	42,1	0,01-0,50	2 à 3	Ji e cols. (2004)
<i>Platalea minor</i>	64	23	35,9	0,27-0,95	2 à 19	Yeung e cols. (2009)
<i>Ardea herodias</i>	28	15	53,5	0,10-0,92	2 à 18	McGuire e Noor (2002)
<i>Eudocimus ruber</i>	17	10	58,8	0,06-0,92	3 à 17	Santos e cols. (2006)
<i>Egretta rufescens</i>	78	12	15,4	0,03-0,88	2 à 10	Hill e Green (2011)
<i>Egretta eulophotes</i>	27	18	66,6	0,18-0,82	2 à 9	Huang e cols. (2010)
<i>Bubulcus ibis</i>	23	11	47,8	0,08-0,56	2 à 4	esse trabalho

Na maioria dos trabalhos citados, entretanto, encontrou-se uma variabilidade maior dentro dos locos, tanto nos valores de heterozigidade quanto no número de alelos, chegando-se a reportar 18 alelos em um único loco em *A. herodias* (MCGUIRE; NOOR, 2002) e 19 alelos em *P. minor* (YEUNG *et al.*, 2009). A exceção é o caso da prospecção em *N. nippon* (JI *et al.*, 2004), onde a variabilidade dentro dos locos

também foi baixa. Segundo os autores, os baixos valores de H_e , bem como o número baixo de alelos (2-3) observados nos locos refletem o efeito do gargalo populacional por que passou essa espécie ameaçada de extinção.

No caso de *B. ibis*, a baixa variabilidade encontrada nos locos deve ser explicada pelo gargalo populacional que precedeu a formação da população brasileira. Não é provável que um grande número de indivíduos, vindos da África, tenha atravessado o oceano Atlântico e iniciado a colonização do continente americano. Logo, com “pool” genético limitado, seria esperado encontrar baixa variabilidade nas populações brasileiras nos locos estudados. A confirmação dessa hipótese será obtida em trabalhos futuros, utilizando-se esses locos polimórficos e amostras das populações oriundas do continente africano.

Uma análise prévia foi feita nesse sentido, a partir da genotipagem de 20 indivíduos de uma população de Gana, na África, utilizando-se os locos Bi15, Bi18 e Bi26. Foram encontrados dois novos alelos para o loco Bi15, um novo alelo para o loco Bi18 e dois novos alelos para o loco Bi26, todos ausentes nas populações brasileiras. Esses resultados corroboram a hipótese de que a baixa variabilidade encontrada seja devida ao efeito fundador e indica que uma maior variabilidade nos locos poderá ser encontrada nas populações africanas.

A amplificação cruzada dos onze locos polimórficos foi testada em seis espécies pertencentes à família Ardeidae. Em todas elas, foi obtida uma alta taxa de amplificação cruzada: *Ardea cocoi* (taxa de amplificação cruzada = 90,90%), *Ardea alba* (100%), *Egretta caerulea* (81,81%), *Egretta thula* (100%), *Nycticorax nycticorax* (90,90%) e *Nyctanassa violácea* (90,90%). Foram selecionadas espécies da mesma família de *B. ibis*, pois de acordo com Barbará e cols. (2007), nas aves é muito baixa a taxa de

sucesso da amplificação cruzada em espécies de aves pertencentes à famílias diferentes (apenas 10% de sucesso, comparando-se à mamíferos 40% e peixes 25%).

Outros autores também mostraram que a probabilidade de amplificação cruzada decresce muito com o aumento da distância filogenética, sendo a distância evolutiva entre a espécie-fonte (aquela na qual foi isolado o loco de microsatélite) com a espécie-alvo (aquela na qual serão testados os locos) considerada como o fator mais importante afetando o sucesso da amplificação cruzada e o nível de polimorfismo encontrado entre as espécies (PRIMMER *et al.*, 1996; HUGHES *et al.*, 1998; DALLIMER, 1999; DAWSON *et al.*, 2000; GALBUSERA *et al.*, 2000).

Dado que o genoma das aves contém menor quantidade de microsatélites quando comparado com qualquer outro grupo de vertebrados, os benefícios práticos da amplificação cruzada nesse grupo são ainda maiores (PRIMMER *et al.*, 2005). Além disso, como o desenvolvimento de novos locos de microsatélites é relativamente caro e demorado, é sempre válido que locos isolados para uma determinada espécie sejam testados em espécies filogeneticamente próximas. A aplicabilidade dos locos isolados nesse trabalho às outras espécies de ardeídeos é especialmente importante para aquelas nas quais ainda não foram isolados locos específicos, como é o caso de *A. cocoi*, *E.caerulea* e *N. violacea*.

6.3. Análises populacionais

6.3.1. Locos heterólogos testados para *Bubulcus ibis*

Os dois locos heterólogos selecionados acabaram não sendo utilizados nas análises populacionais comparativas para que fosse possível incluir a população de Manaus. No entanto, algumas análises também foram feitas incluindo os dados desses locos. A primeira delas foi a avaliação de possíveis erros de genotipagem. Um erro de genotipagem ocorre quando o genótipo observado em um indivíduo não corresponde ao

seu verdadeiro genótipo (BONIN *et al.*, 2004). Esses erros podem ocorrer devido aos erros associados à sequência de DNA, aos erros devidos à baixa qualidade ou quantidade de DNA, aos artefatos bioquímicos e também devido aos fatores humanos (POMPANON *et al.*, 2005).

Um erro que ocorre com grande frequência na genotipagem está ligado à sequência do DNA. Esse erro é resultante da ocorrência de uma mutação na região flanqueadora ao loco do microssatélite, e resulta na ocorrência de alelos nulos (CALLEN *et al.*, 1993). Em locos onde são observados alelos nulos, a heterozigosidade é subestimada, já que indivíduos heterozigotos são erroneamente identificados como homozigotos (JARNE; LAGODA, 1996).

Foi visto que três populações de *B. ibis* apresentaram alelos nulos no loco heterólogo Ah217: Eldorado do Sul, Rio Claro e Fernando de Noronha. Nessas populações, o número de indivíduos homozigotos observado foi significativamente maior do que o esperado, o que sugere que alguns alelos não estão sendo amplificados nesses indivíduos heterozigotos. Como se trata de um loco heterólogo, desenvolvido para a espécie *A. herodias*, é muito provável que na espécie *B. ibis* tenha ocorrido alguma mutação na região flanqueadora, o que explicaria a ocorrência dos alelos nulos.

Devido à deficiência de heterozigotos, para o loco Ah217 foi observado um desvio significativo no equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações de Eldorado do Sul ($p=0,005$) e Barra do Ribeiro ($p=0,011$). Os valores de significância dos desvios nesse mesmo loco para Rio Claro e Fernando de Noronha, apesar de não serem significativos, ficaram bem próximos do limiar: $p=0,057$ e $p=0,055$, respectivamente.

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg são geralmente provocados por três fatores: 1) pela ocorrência de endogamia, 2) pelo efeito de Wahlund ou 3) pela presença de alelos nulos (HARTL; CLARK, 1989). Avaliando-se os dados dos sete

locos específicos mais os dois heterólogos (Apêndice II), não pode estar ocorrendo endogamia nessas populações. Apesar de ter sido observado um valor de Fis significativo nas populações de Barra do Ribeiro e de Rio Claro, se a ocorrência de endogamia fosse o fator responsável pelos desvios seria esperado que mais locos também se desviassem no sentido de maior número de homozigotos do que o esperado pelo equilíbrio (TEMPLETON, 2006), o que não foi observado. Além do mais, quando se excluía o loco Ah217 da análise, o valor de Fis não se mostrava mais significativo para a população de Rio Claro. O efeito de Wahlund, que causa excesso de homozigotos devido à amostragem inadequada de populações subestruturadas, também parece improvável, pois não há nenhum indício de que ocorram subdivisão e hierarquia dentro das populações de *B. ibis*.

De modo que o fator mais provável para explicar os desvios observados nas populações de Eldorado do Sul, Rio Claro e Fernando de Noronha é a presença de alelos nulos no loco Ah217, segundo análise pelo Micro-Checker. Apesar de não ter sido detectada a presença de alelos nulos na população de Barra do Ribeiro, foi observado um excesso de homozigotos nesse loco, o que também poderia ser causado pela presença de alelos nulos.

Como um loco com possíveis alelos nulos deve ser descartado, já que pode enviesar as análises populacionais, ainda que os dois locos heterólogos (Ah217 e Ah536) tivessem apresentado amplificação nas amostras de penas da população de Manaus, apenas um deles (Ah536), teria sido utilizado nesse estudo. Dessa forma, concluiu-se que a tentativa de utilização dos locos heterólogos, desenvolvidos para *A. herodias* e *E. eulophotes*, não foi produtiva para *B. Ibis* pois apenas um loco, dentre nove testados, poderia ser utilizado.

6.3.2. Variabilidade genética das populações estudadas

A variabilidade genética das populações exóticas é geralmente reduzida, em comparação às populações originais, devido ao gargalo populacional por que passam durante o processo de estabelecimento em novas áreas (COX, 2004; CONNER; HARTL, 2004). Quando a espécie é bem sucedida na colonização de um novo ambiente, ocorre uma rápida expansão demográfica que comumente resulta em uma estrutura genética homogênea, porém o nível de diversidade genética tende a diminuir gradualmente em direção às faixas de distribuição de colonização mais recente (BEEBEE; ROWE, 2004).

Os poucos estudos que tem tentado reconstruir histórias de invasão e colonização mostram que quanto mais recentes os eventos de colonização, menor é a diversidade genética das populações (ESTOUP *et al.*, 2004; HERBORG *et al.*, 2007). Essa tendência é devida à ocorrência de uma série de efeitos fundadores consecutivos, que é reforçado quando as populações em uma nova área são fundadas por poucos indivíduos vindos de outra área onde já estavam bem estabelecidos (BEEBEE; ROWE, 2004).

Analisando as seis populações de *B. ibis* quanto aos níveis de variabilidade genética, obteve-se que os valores médios de heterozigosidade esperada variaram de 0,408 para Barra do Ribeiro a 0,562 para Manaus (média entre as populações: 0,467). Comparando com estudos de diversidade genética feitos para outras espécies, a média da heterozigosidade esperada obtida para as populações de *B. ibis* analisadas foi inferior a encontrada para *Jabiru mycteria* por Lopes (2006), que utilizou 10 locos heterólogos e encontrou a média de 0,592, e também inferior a encontrada para *Platalea ajaja* por Miño e Del Lama (2007), que utilizando quatro locos específicos e um heterólogo encontraram a média de 0,650.

O caso da colonização de *B. ibis* no Brasil é recente e podemos supor de 50 a 100 gerações desde o primeiro registro na ilha de Marajó (dependendo se ocorreram um ou dois ciclos de reprodução ao ano). Segundo a hipótese de que a entrada da espécie se deu pela região norte, seria esperado que as populações dessa região, mais próximas da entrada, apresentassem uma maior variabilidade genética do que as demais, pois as posicionadas em latitudes maiores seriam derivadas das populações equatoriais. Os resultados indicaram que o maior valor de H_e foi observado em Manaus e o menor em Barra do Ribeiro, o que confirmaria essa hipótese. No entanto, apesar da diferença entre os valores de H_e para Manaus e Barra do Ribeiro ter sido significativa, a outra população da região sul, Eldorado do Sul, apresentou o segundo maior valor de H_e , bem como Rio Claro, na região central da amostragem, apresentou maior H_e que as populações de Garanhuns e Fernando de Noronha, localizadas em latitudes menores.

Segundo a hipótese de colonização segundo um eixo norte-sul, seria esperado que a variabilidade diminuísse segundo um gradiente, devido aos sucessivos efeitos fundadores, de forma que as populações do sul apresentariam menor variabilidade genética. Como esse não foi o padrão observado, os resultados demonstram que o processo de colonização não ocorreu em uma onda única, segundo a direção norte-sul, mas sim sugerem que tenha ocorrido de forma errática.

Além do maior valor de H_e , a população de Manaus apresentou três alelos privados em 13 indivíduos (0,23), mesmo tendo o menor número amostral dentre as populações estudadas, o que estaria de acordo com a hipótese do início da colonização pela região norte e maior diversidade nas populações dessa região. A população de Eldorado do Sul (RS) também apresentou um alelo privado em 25 indivíduos (0,04), apontando para um provável estabelecimento mais antigo nessa região.

Como é esperado que populações fundadas mais recentemente tenham menor diversidade genética (ESTOUP *et al.*, 2004; HERBORG *et al.*, 2007), os alelos privados encontrados podem ser resultado de uma colonização anterior nessas regiões onde estão presentes, em comparação às regiões onde não foram observados, como nas populações do nordeste e na do sudeste. De acordo com os registros de ocorrência da espécie, a colonização da região sul (primeira ocorrência em 1973) ocorreu anteriormente à colonização da região nordeste (primeira ocorrência em 1985), e a distribuição de alelos privados mostrou-se de acordo com esses registros.

O Fis mostrou-se significativo para a população de Barra do Ribeiro. Esse resultado pode estar indicando que essa população apresenta certo nível de endogamia. Esses indivíduos foram encontrados associados a uma colônia reprodutiva de *A. alba*, o que pode explicar a baixa variabilidade, o nível de endogamia e também a ausência do alelo privado encontrado em Eldorado do Sul. Como as estimativas de Fis não foram significativas para as demais populações, infere-se que para essas, as frequências genotípicas estão de acordo com o esperado para uma população com acasalamento ao acaso (HARTL; CLARK, 1989).

6.3.3. Parâmetros populacionais

O tamanho efetivo populacional (N_e) é o número de indivíduos que participam na produção da próxima geração. É um parâmetro que pode ser estimado por diferentes medidas de mudança genética, como a perda de heterozigosidade ou mudanças nas frequências alélicas através do tempo (CROW; DENNISTON, 1988) ou ainda no desequilíbrio de ligação (HILL, 1981). O N_e é influenciado por diversos fatores como razão sexual, oscilações no tamanho populacional, sistema de acasalamento e variação de fertilidade dos gametas (AVISE, 2004). É um parâmetro especialmente importante em espécies exóticas, pois mesmo que a população fundadora seja razoavelmente

grande (mais de 100 indivíduos, por exemplo), a variação genética inicial, além de ser reduzida pelo efeito fundador, também pode ser perdida devido a um baixo N_e (FRANKHAM *et al.*, 2004).

Além de possibilitar inferências sobre a viabilidade de uma população, o N_e também incorpora um fator histórico. Uma população com um número grande de indivíduos originados há poucas gerações de um número pequeno de ancestrais, terá um N_e menor do que populações que permaneceram demograficamente estáveis há mais tempo (SOLÉ-CAVA, 2001), ou seja, quanto menor o N_e , menor será o número de gerações desde o estabelecimento dos fundadores. Assim sendo, de acordo com a hipótese de entrada da espécie pela região norte, um maior número efetivo populacional (N_e) seria esperado na população de Manaus, em comparação com as demais populações estudadas, provenientes das regiões nordeste, sudeste e sul do país.

No entanto, como nos cálculos de N_e para as populações de *B. ibis* os intervalos de confiança foram grandes, não foi possível fazer muitas inferências sobre os valores obtidos para as populações estudadas. Os maiores valores foram observados em Rio Claro (estimado como sendo infinito) e Fernando de Noronha e os menores em Manaus e Barra do Ribeiro. Um valor baixo de N_e e intervalo de confiança bem estreito foram obtidos quando se juntou todas as populações estudadas ($N_e = 6,6$; IC = 5,7-7,7). Esse resultado confirma que as populações brasileiras são recentes e oriundas de um pequeno número de indivíduos fundadores, o que também é sugerido pela baixa variabilidade encontrada nessas populações. Inferências mais seguras poderão ser feitas após comparações com o N_e das populações africanas.

O coeficiente de parentesco médio (r) é definido como a probabilidade de que, em um determinado loco, os alelos de dois indivíduos sejam idênticos por descendência (WRIGHT, 1922). Dentre as populações estudadas, esse coeficiente foi menor em

Manaus e maior em Fernando de Noronha, sendo que os valores obtidos para todas as populações não diferiram significativamente de zero e foram abaixo de 0,25, o que indica que essas populações são formadas majoritariamente por indivíduos não-relacionados (BLOUIN *et al.* 1996). Valores negativos de r foram observados para Eldorado do Sul, Rio Claro e Manaus, o que significa que esses indivíduos apresentam um menor número de alelos idênticos por descendência do que o esperado pelo acaso (KONOVALOV; HEG, 2008).

O conjunto de dados aponta para uma detecção de gargalo em Rio Claro pelo programa Bottleneck, o que não se confirma pelos outros parâmetros genéticos nessa população. Populações que passaram por um gargalo genético recente tendem a perder alelos raros e, conseqüentemente, aumentar a frequência dos alelos comuns, o que resulta em um excesso de heterozigotos (CORNUET; LUIKART, 1996). A distribuição das frequências alélicas para essa população, porém, formou uma curva em “L” característica de populações onde não ocorreu gargalo populacional, com a maioria dos alelos apresentando-se em baixa frequência e poucos alelos apresentando-se em alta frequência (LUIKART, *et al.*, 1998).

Nessa mesma população não foram observados outros indícios, como menores valores de heterozigosidades médias ou maior valor de parentesco médio (em comparação com os valores obtidos para as outras populações), ou ainda ou um valor negativo de F_{is} , que confirmem que a redução demográfica tenha de fato ocorrido. Além do mais, o N_e infinito estimado para Rio Claro também vai contra a hipótese de que tenha ocorrido um gargalo populacional recente, já que uma redução do tamanho da população traduziria-se na redução do tamanho efetivo (BRISKIE; MACKINTOSH, 2004).

6.3.4. Análise de diferenciação genética entre as populações

A distância genética entre as populações estudadas variou de 0,0046 a 0,1039. A maior distância foi observada entre Barra do Ribeiro (RS) e Manaus (AM), o que seria esperado pela hipótese de colonização seguindo o eixo norte-sul. No entanto, a menor distância foi observada entre uma população do sul (Eldorado do Sul) com uma do nordeste (Garanhuns) e não com a outra população do sul (Barra do Ribeiro), mais próxima geograficamente. Além do mais, foi visto que a população de Barra do Ribeiro possui distância genética maior com a população de Eldorado do Sul do que com as populações de Rio Claro e de Fernando de Noronha, localizadas em latitudes menores e mais distantes geograficamente. Dessa forma, segundo o padrão observado das distâncias as populações não parecem ter sido fundadas por indivíduos que estavam mais próximos.

A análise de estruturação populacional pelo STRUCTURE indicou que não houve subdivisão entre as populações estudadas, ou seja, de acordo com esse resultado todos os indivíduos pertenceriam na verdade a uma única unidade populacional. No entanto, valores significativos de F_{st} e R_{st} par-a-par foram encontrados. O F_{st} par-a-par foi significativo entre Barra do Ribeiro e Manaus, Eldorado do Sul e Manaus, Rio Claro e Manaus e entre Eldorado do Sul e Fernando de Noronha. O R_{st} par-a-par foi significativo entre Barra do Ribeiro e Fernando de Noronha, Barra do Ribeiro e Manaus, e entre Rio Claro e Manaus. Esses resultados demonstram que a população norte de Manaus realmente detém genes que diferem das populações posicionadas no sudeste e sul.

Se reunidas as populações de Barra do Ribeiro e Eldorado do Sul, denominadas agora como “população de latitude sul”, Rio Claro como “população de latitude central” e Garanhuns, Fernando de Noronha e Manaus como “população de latitude norte”, verifica-se que o F_{st} par-a-par e o R_{st} par-a-par foram significativos ($p=0,017$ e

$p=0,025$, respectivamente) entre a latitude sul e a latitude norte, o que demonstra que as maiores diferenças estão entre os extremos da distribuição da espécie no país.

Foi detectado fluxo gênico entre as populações de *B. ibis* estudadas, tanto na análise a partir do F_{st} (1,11 migrantes/geração) quanto a partir do R_{st} (6,62 migrantes/geração). No entanto, nesse caso é mais confiável para a estimativa indireta de fluxo gênico o método a partir do F_{st} , pois esse mostra melhor desempenho quando são baixos o número de locos analisados e o número de alelos por loco (GAGIOTTI *et al.*, 1999). De qualquer forma, o fluxo gênico detectado entre as populações analisadas é maior que um indivíduo por geração, o que já garante a homogeneização entre as populações.

Os testes de isolamento por distância indicaram que não há correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as populações analisadas. Esse resultado confirma que o fluxo gênico entre as populações não está sendo limitado pela distância entre elas (HUTCHISON; TEMPLETON, 1999) e sugere que a dispersão da espécie no Brasil tem sido determinada por outros fatores.

No teste de alocação, a maioria dos indivíduos (71%) não foi alocada em sua população de origem. Esse resultado é esperado quando há fluxo gênico ocorrendo entre as populações analisadas, mas essa conclusão pode estar sendo enviesada pelo passado comum muito recente entre elas, o que levaria a esse mesmo resultado nos testes de alocação (PAETKAU *et al.*, 2004). O resultado da AMOVA foi significativo e mostrou que apenas 2,44% da variação existente foi explicada pela diferença entre as populações. Ambos os resultados, do teste de alocação e da análise AMOVA, corroboram a baixa estruturação populacional encontrada entre as populações brasileiras

6.3.5. Inferências sobre a colonização do Brasil por *Bubulcus ibis*

Poucos estudos têm investigado os processos de invasão biológica em aves e analisado geneticamente as populações invasoras. Tais estudos são particularmente desafiadores devido à complexidade dos processos de invasão, e eles são mais difíceis quando se tratam de invasões recentes (BLACKBURN *et al.* 2009). Como já foi dito, os detalhes acerca do processo de invasão da espécie *B. ibis* são desconhecidos. Contudo, como a migração entre continentes não é comum, e como foi observada nesse estudo uma baixa variabilidade genética e um pequeno N_e na população brasileira, supõe-se que não foram muitos os indivíduos que vieram do continente africano (pequeno tamanho do propágulo) e também que essa migração não tenha ocorrido muitas vezes (pequeno número de propágulos). Dessa forma, fazem-se necessárias análises comparativas entre as populações brasileiras estudadas e populações de diferentes latitudes do continente africano, pois só assim serão possíveis maiores inferências acerca do efeito fundador ocorrido no Brasil.

A baixa variabilidade genética encontrada nas populações brasileiras parece não ter influenciado negativamente o sucesso no estabelecimento e a capacidade de dispersão de *B. ibis*, já que atualmente a espécie se encontra amplamente distribuída por todo o país. Porém, faltam estudos na literatura que determinem qual o papel da variação genética na determinação do tamanho da área geográfica ocupada e da taxa de expansão das populações exóticas (BLACKBURN, *et al.*, 2009). Esses tipos de dados são importantes, pois também podem subsidiar planos de manejo de espécies ameaçadas de extinção, que possuem um número pequeno de indivíduos.

Todos os dados obtidos no presente trabalho sugerem que há uma diferença significativa entre as diversidades genéticas nas latitudes extremas do país, com uma maior variabilidade na população da região norte, o que corrobora a hipótese de que a entrada da espécie no país teria ocorrido por essa região. No entanto, uma vez dentro do

país, a dispersão da espécie não seguiu o padrão “stepping-stone”, já que não foi encontrado nenhum sinal de que a dispersão tenha ocorrido no eixo norte-sul. Os resultados na realidade sugerem que o padrão de dispersão da espécie foi determinado por outro fator que não a proximidade entre as populações, e provavelmente deve ter acompanhado o surgimento de situações vantajosas para a espécie, como por exemplo, o implemento da atividade pecuária. Por fim, o fluxo gênico existente entre elas têm garantido que não se diferenciem substancialmente, fazendo com que se constituam como uma única unidade populacional.

A população de Fernando de Noronha, em especial, mostrou um nível de diversidade alto, um valor de parentesco médio que não diferiu significativamente de zero, encontrando-se na faixa considerada como de indivíduos não-relacionados. Essa população não mostrou sinais de endogamia, além de um N_e grande, mesmo após a implementação de um programa de controle que sacrifica, todos os anos desde 2007, cerca de 90% dos indivíduos presentes no arquipélago. Nossos resultados sugerem que o manejo realizado ainda não conseguiu diminuir a variabilidade do pool gênico dessa população, provavelmente porque como o arquipélago está localizado a apenas 356 km da costa nordestina, muitos indivíduos continuam chegando nas ilhas, o que indica que a invasão da espécie no arquipélago não será tão facilmente controlada.

7. CONCLUSÕES

- O isolamento de locos de microssatélites específicos para *Bubulcus ibis* resultou na obtenção de 11 locos polimórficos, dos quais sete apresentaram nível de variação suficiente para as análises nas populações brasileiras. Os quatro locos pouco variáveis poderão mostrar maior variação em populações africanas e serão testados nessas populações em trabalhos futuros.
- Os locos heterólogos, específicos para *Ardea alba* e *Egretta eulophotes*, não puderam ser utilizados nas análises populacionais em *Bubulcus ibis*. Apenas dois locos heterólogos, dentre os nove testados, mostraram um nível de polimorfismo suficiente para as análises, sendo que um deles apresentou alelos nulos para três das populações estudadas. Além do mais, não foi obtida amplificação nesses dois locos para uma das populações cujo DNA foi extraído de penas.
- A maior variabilidade genética foi observada na população da região norte, o que corrobora a hipótese de que a entrada da espécie no país se deu a partir dessa região. Não foi constatada uma diminuição da diversidade genética entre as populações, conforme o aumento da latitude.
- O pequeno tamanho efetivo populacional encontrado para o total de indivíduos amostrados sugere que foram poucos indivíduos fundadores que deram origem às populações brasileiras. Uma das populações, a de Rio Claro, apresentou um resultado positivo no teste de ocorrência de gargalo populacional, no entanto, nenhuma das análises genéticas confirmou que de fato tenha ocorrido uma redução demográfica nessa população.

- Uma baixa estruturação populacional foi detectada, e as maiores diferenças foram observadas entre os extremos da distribuição da espécie no país. Fluxo gênico foi detectado entre as populações e parece garantir que elas não se diferenciem substancialmente.
- A colonização do Brasil não ocorreu em uma onda única, segundo a direção norte-sul do país. O padrão de dispersão da espécie é errático e parece ter sido determinado por outro fator que não a proximidade entre as populações.
- O programa de controle implementado no arquipélago de Fernando de Noronha não conseguiu diminuir a variabilidade do pool gênico dessa população, o que demonstra que a invasão pela espécie no arquipélago não será tão facilmente controlada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKEY, J. M. et al. The effect that genotyping errors have on the robustness of common linkage-disequilibrium measures. **The American Journal of Human Genetics**. v.68, p.1447–1456. 2001.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. Units of Conservation. In: **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing. 2007. 642p.
- AMERICAN ORNITHOLOGISTS' UNION 1983. **Checklist of North American Birds**. 7th Edition. American.
- ANTAS, P. T. Z. **Pantanal - Guia de Aves**. Rio de Janeiro: SESC, Departamento Nacional. 2004. 246 p.
- ARRUDA, M. et al. An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. **Molecular Biology Reports**. v.37, p.2031-2036. 2010.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Chapman & Hall, New York. 1994. 511 p.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge. 2000. 447 p.
- AYRES, M. et al. BIOESTAT – **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Ong Mamiraua. Belém, PA. Mamiraua. Belém, PA. 2007. 324p.
- BACHTROG, D. et al. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology Evolution**. v.17, p.1277-1285. 2000.
- BARBARÁ, T. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, p.3759-3767. 2007.
- BARBOSA-FILHO, R.C. et al. A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis* Linnaeus, 1758) e o atobá-de-pé-vermelho (*Sula sula* Linnaeus, 1766) no Arquipélago de Fernando de Noronha: uma abordagem ecológica comparativa. **Ornithologia**. v3(2), p.101-114. 2009.
- BARTON, N. H.; SLATKIN, M. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. **Heredity**. v.56, p.409-415. 1986.
- BEEBEE, T.; ROWE, G. **An Introduction to Molecular Ecology**. Oxford University Press. 2004. 346p.
- BELTON, W. **Aves do Rio Grande do Sul: distribuição e biologia**. Unisinos, São Leopoldo. 2000.584p.

- BENNETS, R.E. et al. The influence of environmental and density-dependent factors on reproductive parameters of Little Egrets in the Camargue, south France. **Auk**, Lawrence. v.117, p.634-639. 2000.
- BLACKBURN, T.M.; LOCKWOOD, J.L.; CASSEY, P. **Avian Invaders: The Ecology and Evolution of Exotic Birds**. Oxford University Press. 2009. 421p.
- BLAKER, D. Behaviour of the cattle egret *Ardeola ibis*. **Ostrich**. v.40, p.75–129. 1969.
- BLOUIN, M. et al. Use of microsatellites loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology**. v.5, p.393-401. 1996.
- BOCK, W. J. A generic review of the family *Ardeidae* (Aves). American Museum Novitates. v.1779, p.1-49. 1956.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**. v.32, p.314-331. 1980.
- BONAPARTE, C.L. **Annales Des Sciences Naturelles comprenant la zoologie**. v.4(1), p.141-143. 1855.
- BONIN, A. et al. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. **Molecular Ecology**. v.13, p.3261–3273. 2004.
- BRISKIE, J.V.; MACKINTOSH, M. Hatching failure increases with severity of population bottlenecks in birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101, p.558-561. 2004.
- BROHEDE, J.; ELLEGREN, H. Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceeding Biology Sciences*. v.266, p.825-833. 1999.
- BROWDER, J.A. Long distance movements of Cattle Egrets. **Bird Banding**, Boston, v.44(3), p.158-170. 1973.
- BRUFORD, M.W.; WAYNE, R.K. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinion in Genetics & Development**. v.3, p.939-943. 1993.
- BURGER, J. Competition between Cattle Egrets and native north american herons, egrets, and ibises. **Condor**, California. v.80, p.15-23. 1978.
- CALLEN, D. F. et al. Incidence and origin of ‘null’ alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**. v.52, p.922–927 1993.
- CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA T.; GALETTI-Jr, P.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatu*. **Molecular Ecology Notes**. v.6, p.818–819. 2006.

- CHAN, C. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the kakerori (*Pomarea dimidiata*) using feathers as source of DNA. **Conservation Genetics**. v.9(4), p.1067-1070. 2008.
- CHESSER, R.T et al. Fifty-first supplement to the American Ornithologists' Union Check-list of North American Birds. **Auk**. v.127, p.726–744. 2010.
- CONNER, J.K.; HARTL, D.L. **A primer of ecological genetics**. Sinauer Associates, Inc. 2004. 304p.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**. v.144(4), p.2001-2014. 1996.
- COX, G.W. **Alien Species and Evolution: The Evolutionary Ecology of Exotic Plants, Animals, Microbes, and Interacting Native Species**. Island Press, Washington. 2004. 377p.
- CROSBY, G.T. Spread of the Cattle Egret in the western hemisphere. **Bird-Banding**, Boston, v.43(3), p.205-212. 1972.
- CROW, J.F.; DENNISTON, C. Inbreeding and variance effective population numbers. **Evolution**. v.42, p.482-495. 1988.
- DALLIMER, M. Cross-species amplification success of avian microsatellites in the redbilled quelea *Quelea quelea*. **Molecular Ecology**. v.8, p.695-698. 1999.
- DAWSON, R. J. et al. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. **Heredity**. v.79, p.506-514. 1997.
- DAWSON, D. A. et al. Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. **Molecular Ecology**. v.9, p.1941-1944. 2000.
- DEAN, W.J.R.; MACDONALD, I.A.W. A review of African birds feeding in association with mammals. **Ostrich**. v.52, p.135–155. 1981.
- DI RIENZO, A. et al. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.91, p.3166-3170. 1994.
- ELLEGREN, H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. **Nature Genetics**. v.24, p.400-402. 2000.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**. v.5, p.435–445. 2004.
- ESPINOLA, L. A.; FERRERIA JULIO JUNIOR. H. Especies invasoras: conceptos, modelos y atributos. **INCI**. v.32(9), p.580-585. 2007.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**. v.11, p.1591-1604. 2002.

ESTOUP, A. et al. Genetic analysis of complex demographic scenarios: spatially expanding populations of the cane toad, *Bufo marinus*. **Evolution**. v.58, p.2021–2036. 2004.

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

FALK-PETERSEN, J.; BOHN, T.; SANDLUND, O.T. On the numerous concepts in invasion biology. **Biological invasions**. v.8, p.1409-1424. 2006.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**. v.164, p.1567-1587. 2003.

FARIA, P.J. et al. Challenges and prospects of population genetic studies in terns (Caradriiformes, Aves). **Genetics and Molecular Biology**. v.30(3), p.681-689. 2007.

FICETOLA, G.F.; BONIN, A.; MIAUD, C. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. **Molecular Ecology** v.17, p.773-782. 2008.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617p.

FREITAS, P.D.; MARTINS, D.S.; GALETTI JR, P.M. CID (Clipping vectors, Identifying SSR, Design of primers): a rapid and efficient bioinformatics tool for the detection of simple sequence repeats (SSRs) from genomic libraries. **Molecular Ecology Resources** v.8, p.107-108. 2008.

FREITAS, M.A.; FRANÇA, D.P.F. Reprodução de garça-vaqueira *Bubulcus ibis* (Ciconiiformes: Ardeidae) no município de Quijingue, na Bahia, e considerações sobre aspectos reprodutivos no semi-árido baiano. **Atualidades Ornitológicas On-line** n° 151. 2009.

FUJIOKA, M.; YAMAGISHI, S. Extramarital and pair copulations in the Cattle Egret. **Auk**. v.98, p.134-144. 1981.

FUTUYMA, D. **Evolutionary Biology**. Third edition. Sunderland, MA, Sinauer Associates. 1998. 875p.

GAGIOTTI, O. E. et al. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular Ecology**. v.8, p.1513-1520. 1999.

GALBUSERA, P.; VAN DONGEN, S.; MATTHYSEN, E. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. **Conservation Genetics**. v1, p.163-168. 2000.

GASSET.W. et al. Food habits of Cattle Egrets on St. Croix, U.S. Virgin Islands. **Wilson Bulletin**, Ohio. v.112(2), p.268-271. 2000.

GIVEN, A.D.; MILLS, A.; BAKER, A.J. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. **Molecular Ecology Notes**. v.2, p.416-418. 2002.

GOLDSTEIN, D.B; POLLOCK, D.D. Lauching microsatellites: a review of mutation processes an methods of phylogenetic inference. **Journal oh Heredity**. v.88, p.335-342. 1997.

GOLDSTEIN, D.B.; SCHÖTTERER, J.M. **Microsatellites, evolution and application**. Oxford: Oxford University Press. 1999.352p.

GOODMAN, S. J. RST CALC: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. **Molecular Ecology**. v.6, p.881-885. 1997.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 21 de março de 2011.

GREEN, R.E. The Influence of Numbers Released on the Outcome of Attempts to Introduce Exotic Bird Species to New Zealand. **Journal of Animal Ecology**. V.66(1), p.25-35.1997.

GUO, S.W.; THOMPSON. E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**. v.48, p.361-372. 1992.

HALDANE, J.B.S. An exact test for randomness of mating. **Journal of Genetics**. v.52, p.631-635. 1954.

HAMILTON, M.B. et al. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**. v.27, p.500-507. 1999.

HANCOCK, J.; KUSHLAN, J.A. **The herons handbook**. Harper and Row, New York. 1984. 288p.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Principles of population genetics. Second edition. Sinauer Ass. Inc. Sunderland, Massachusetts. 1989. 542p.

HERBORG, L.M. et al. Predicting invasion risk usingmeasures of introduction effort and environmental niche model. **Ecological Applications**. v.17, p.663-674. 2007.

- HILL, W.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetic Research**. v.38, p.209-216. 1981.
- HILL, A.M.S.; GREEN, M.C. Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. **Conservation Genetics Resources**. v.3(1), p.13-15. 2011
- HOCKEY, P.A.R.; DEAN, W.R.J.; RYAN, P.G. **Roberts' Birds of Southern Africa**, seventh edition. Trustees of the John Voelcker Bird Book Fund, Cape Town. 2005. 1296p.
- HÖFLING, E.; CAMARGO, H.F.A. **Aves no Campus**. 3° ed. São Paulo. Ed. da Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. 2002.168pp.
- HORVÁTH, M.; KOVÁCS, A.; DEMETER, I. The biology of the Imperial Eagle in the Carpathian Basin. In: KOVÁCS, A. et al. ed. **Imperial Eagle Management Guidelines**. Budapest: MME/BirdLife Hungary. 2005. 156p.
- HUANG, X. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). **Conservation Genetics**. v.11, p.1211-1214. 2010.
- HUEY, R.B. et al. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. **Science**. v.287, p.308-309. 2000.
- HUGHES, C. R.; KAVLIE, R.; JOHNSON, K. Characterization of polymorphic trinucleotide microsatellite loci in the great-tailed grackle, *Quiscalus mexicanus*. **Molecular Ecology**. v.7, p.783-784. 1998.
- HUTCHISON, D.W.; TEMPLETON, A.R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evolution**. v.53, p.1898-1914. 1999.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in ecology and evolution**. v.11, p.424-429. 1996.
- JENNIL, D.A. A study of the ecology of four species of herons during the breeding season at Lake Alice Alachua County, Florida. *Ecological Monographs*. Durhan, v.39(3), p.245-270. 1969.
- JI, Y.J. et al. Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes, Threskiornithidae). **Molecular Ecology Notes**. v.4, p.615-617. 2004.
- KALINOWSKI, S.T. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. **Molecular Ecology**. v.11, p.1263-1273. 2002.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**. v.16, p.1099-1106. 2007.

KASHI,Y.; SOLLER, M. Function roles of microsatellites and minisatellites. In: **Microsatellite: evolution and applications**. GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. Oxford University Press, Oxford, U.K. 1999. 368p.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**. v.49, p.725-738. 1964.

KONOVALOV, D.A.; HEG, D. A maximum-likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. **Molecular Ecology Resources**. v.8, p.256-263. 2008.

KRUGLYAK, S. et al. Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. **Molecular Biology and Evolution**. v.17, p.1210–1219. 2000.

KUSHLAN, J. A.; HANCOCK, J. A. **The Herons**. Oxford University Press, Oxford. 2005. 351p.

LEE, B.Y. et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*). **Genetics**. v.170, p.237–244. 2005.

LI, Y.C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**. v.11, p.2453-2465. 2002.

LIMA, P.C. et al. Reprodução de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) e *Nycticorax nycticorax* (Linnaeus, 1758) numa região de caatinga e registro de alguns endemismos. VI Congresso Brasileiro de Ornitologia, Belo Horizonte, p53. 1997.

LOCKWOOD, J. L.; CASSEY, P.; BLACKBURN, T. The role of propagule pressure in explaining species invasions. **Trends in Ecology and Evolution**. v.20(5), p.223-228. 2005.

LOCKWOOD, J. L.; HOOPEs, M. F.; MARCHETTI, M. P. **Invasion ecology**. Blackwell Publishing Ltd, Malden, UK. 2007. 312p.

LONGMIRE, J.L.; HAHN, C.C.; ROACH, J.L. Low abundance of microsatellite repeats in the genome of the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). **Journal of Heredity**. v.90, p.574–579. 1999.

LUIKART, G. **Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks and monitoring genetic change**. Ph. D. Thesis. University of Montana, Missoula, USA. 1997.

LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**. v.12(1), p.228-237. 1998.

LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**. v.89, p.238-247. 1998.

- MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**. v.27, p.209-220. 1967.
- MARFIM, A. "*Bubulcus ibis*" (On-line), Animal Diversity Web. 2000. Disponível em <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Bubulcus_ibis.html> Acesso em: 17 de março de 2011.
- MARSHALL, T.C. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**. v.7, p.639-655. 1998.
- MCGUIRE, H.L.; NOOR, M.A.F. Microsatellite loci for great White herons and great blue herons (Aves, *Ardeidae*, *Ardea herodias*). **Molecular Ecology Notes**. v.2, p.170-172. 2002.
- MCKILLIGAN, N.G. Promiscuity in the Cattle Egret (*Bubulcus ibis*). **Auk**. v.107, p.334-341. 1990.
- MCKILLIGAN, N.G. **Herons, Egrets and Bitterns: Their Biology and Conservation in Australia**, CSIRO Publishing. 2005. 144p.
- MENEZES, I.R. et al. Comportamento Alimentar da Garça Vaqueira, *Bubulcus ibis* (Linnaeus 1758) (Aves:Ardeidae): um estudo preliminar. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.4(1), p.154-159. 2004.
- MILLER, M. P. Tools for population genetics analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Disponível em: <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm> Acesso em: 29 de junho de 2011.
- MIÑO, C.I. **Estrutura genética e relações de parentesco em populações naturais de colhereiro (Aves: Threskiornithidae)**. Dissertação de mestrado (Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, Brasil. 2006. 97p.
- MIÑO, C.I., DEL LAMA, S.N. Molted Feathers as a Source of DNA for Genetic Studies in Waterbird Populations. **Waterbirds**. v.32(2), p.322-329. 2009.
- MIÑO, C. I. **Genética de Populações e Relações de Parentesco em Ciconiiformes (Aves)**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos, Brasil. 2010. 157p.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**. v.30, p.194-200. 2002.
- NASCIMENTO, J.L.X. Registros de ninhais de garças (Ciconiiformes, *Ardeidae*) na Paraíba, Brasil. **Airo**. v.10(1), p.39-42. 1999.
- NEFF, B.D.; GROSS, M.R. Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. **Evolution**. v.55, p.1717-1733. 2001.

- NEI, M. Estimation average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. v.89, p.583-590. 1978.
- OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a infinite population. **Genetic Research**. v.22, p.201-204. 1973.
- OSTERHOUT, V. C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v.4(3), p.535-538. 2004.
- PAETKAU, D. et al. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. **Molecular Ecology**. v.13, p.55-65. 2004.
- PAYNE, R. B.; RISLEY, C.J. Systematics and evolutionary relationships among the herons (*Ardeidae*). **Miscellaneous Publications Museum of Zoology University of Michigan, Ann Arbor**. v.150, p.1-115. 1976.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. v.6, p.288-295. 2006.
- PEEL D.; OVENDEN J. R.; PEEL S. L. Neestimator: software for estimating effective population size. Brisbane, Australia: Queensland Government; Department of Primary Industries and Fisheries, Version 12. 2004.
- PÉREZ, F. et al. Development of EST_SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus byrdi*. **Marine biotechnology**. v.7, p.554-569. 2005.
- PETES, T.D.; GREEWELL, P.W.; DOMINSKA, M. Stabilization of microsatellite sequences by variant repeats in the yeast *Saccharomices cerevisiae*. **Genetics**. v.146, p.491-498. 1997.
- PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**. v.52, p.273-288. 2005.
- POMEROY, D.E. Birds as scavengers of refuse in Uganda. **Ibis**, London. v.117(1), p.68-81. 1975.
- POMPANON, F. et al. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews Genetics**. v.6, p.847-859. 2005.
- PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**. v.5, p.365-378. 1996.
- PRIMMER, C.R. et al. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**. v7, p.471-482. 1997.

- PRIMMER, C.R. et al. Factors affecting avian cross species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**. v.36, p.348-360. 2005.
- PRITCHARD, J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. v.155(2), p.945-959. 2000.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**. v.86, p.248-249. 1995.
- REISE, K.; OLENIN, S.; THIELTGES, D.W. Are aliens threatening aquatic coastal ecosystems? **Helgoland Marine Research**. v.60, p.77-83. 2006.
- RICHARDSON, D.M.; PYSEK, P.; CARLTON, J.T. A compendium of essential concepts and terminology in invasion ecology. **Fifty Years of Invasion Ecology: The Legacy of Charles Elton, first edition**, Blackwell Publishing Ltd. p.409-420. 2011
- RICKFLES, R.E. Taxon cycles: insights from invasive species. In: SAX, D.F.; STACHOWICZ, J.J.; GAINES, S.D. **Species invasions. Insights into ecology, evolution, and biogeography**, Sinauer Associates, Sunderland, MA. p.165-199. 2005.
- RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. **Proceedings of the Royal Society B**. v.263, p.549-557. 1996.
- ROON, D.A. et al. Evaluating mixed samples as a source of error in non-invasive genetics studies using microsatellites. **Molecular Ecology**. v14, p.195-201. 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITISH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1989.
- SANTOS, M.S. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*-Threskiornithidae-Aves). **Molecular Ecology Notes**. v.6, p.307-309. 2006.
- SCHENEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. ARLEQUIN version 2000: A software for population genetics analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**. v.18, p.233-234. 2000.
- SEGELBACHER, G. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. **Molecular Ecology Resources**. v.2(3), p.367-369. 2002.
- SHELDON, F. H. Phylogeny of herons estimated from DNA-DNA hybridization data. **Auk**. v.104(1), p.97-108. 1987.
- SIBLEY, C.G., AHLQUIST, J.E., MONROE, B.L. A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. **Auk**. v.105(3), p.409-423. 1988.

SI BACHIR et al. The recent expansion of avian invasive species (the Cattle egret *Ardea ibis*) in Algeria. **Journal of Arid Environments**. 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140196311001236>> Acesso em: 05 de julho de 2011.

SICK, H. *Bubulcus ibis* (L.) na Ilha de Marajó, Pará: Garça ainda não registrada no Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. v.37, p.567-570. 1965.

SICK, H. 1997. **Ornitologia Brasileira**. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 912p.

SIEGFRIED, W.R. Population dynamics of the Cattle Egret. **Zoologica Africana**. v.6, p.289-292. 1971.

SILVA, R.S. **As aves de Fernando de Noronha**. Vinhedo (SP), Avis Brasilis, 2008. 240 p.

SILVA-JR, J.M.; PÉRES-JR, A.K.; SAZIMA, I. *Euprepis atlanticus* (Noronha Skink) Predation. **Herpetological Review**. v.36(1), p.62-63. 2004.

SKEAD, D.M. Birds frequenting the intertidal zone of the Cape Peninsula. **Ostrich**. v.37, p.10-16. 1966.

SLATKIN, M. Gene Flow in natural populations. **Annual Revision Ecology Systematic**. v.16, p.393-430. 1985.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**. v.139, p.457-462. 1995.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy - the principles and practice of numerical classification**. W. H. Freeman: San Francisco. 1973.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

SOUZA, D.G.S.; FREITAS, M.A. Reprodução da garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*) no semi-árido da Bahia. VI Congresso Brasileiro de Ornitologia, Belo Horizonte, p88. 1997.

SPRECHER, C.J. et al. A general approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. **Biotechniques**. v.20, p.266-276. 1996.

SZCZYS, P.; HUGHES, C.R.; KESSELI, R.V. Novel microsatellite markers used to determine the population genetic structure of the endangered Roseate Tern, *Sterna dougallii*, in North-west Atlantic and Western Australia. **Conservation Genetics**. v.6, p.461- 466. 2005.

TABERLET, P. et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**. v.24, p.3189-3194. 1996.

TABERLET, P.; LUIKART, G. Non-invasive genetic sampling and individual identification. **Biological Journal of the Linnean Society**. v.68, p.41-55. 1999.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**. v.10, p.4127-4138. 1984.

TAUTZ, D. et al. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. **Nucleic Acids Research**. v.17, p.6463-6471.1989.

TEIXEIRA, D.M.; NACINOVIC, J.B.; PONTUAL, F.B. Notes on some birds of northeast Brazil (2). **Bulletin of the British Ornithologists' Club**, London. v.107(4), p.151-157. 1987.

TELFAIR, R.C. **Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) population trends and dynamics in Texas (1954-1990)**. Nongame and Urban Programs, Fish & Wildl. Div., Texas Parks & Wildl. Dept., Austin. 1993.

TELFAIR, R.C. "Cattle Egret (*Bubulcus ibis*)." **The Birds of North America**, n.113, POOLE, A.; GILL, F. eds. The Academy of Natural Sciences, The American Ornithologists' Union, Philadelphia, Washington, D. C. 1994. 877p.

TEMPLETON, A.R. **Population genetics and microevolutionary theory**. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA. 2006. 705p.

THOMPSON, O.N.; LANYON, S.M.; THOMPSON, K.M. The influence of foraging benefits on association of cattle egrets with Cattle. **Oecologia**. v.52(2),p.167-170. 1982.

VALIÈRE, N. GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes**. v.2, p.377-379. 2002.

VAN DEN BUSSCHE, R. A.; LONGMIRE, J.L.; BAKER, R.J. How bats achieve a small C-value: frequency of repetitive DNA in *Macrotus*. **Mammalia Genome**. v.6, p.521-525. 1995.

VINCENT, J. Habits of *Bubulcus ibis*, the Cattle Egret, in Natal. **Ibis**. v.89(4), p.489-491. 1947.

VOISIN, C. **The herons of Europe**. Poyser, London. 1991. 364p.

WALKER, B.; STEFFEN, W. An overview of the implications of global change for natural and managed terrestrial ecosystem. **Conservation Ecology**. 1997. Disponível em: <http://www.consecol.org/vol1/iss2/aart2> Acesso em: 25 de março 2011.

WALKER, T.I.; TAYLOR, B.L.; HUDSON, R.J. **Southern shark catch and effort 1970-2002 report to Australian Fisheries Management Authority, June 2003**. Marine and Freshwater Resources Institute, Queenscliff, Victoria, Australia. 2003. 41p.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1990. 377pp.

WETMORE, A. An early record of the Cattle Egret in Colômbia. **Auk**, Lawrence. v.80 (3), p.547. 1963.

WILLIAMSON, M. **Biological invasions**. Chapman & Hall. London. 1996. 360p.

WIRTH, T.; BERNATCHEZ, L. Genetic evidence against panmixia in the European eel. **Nature**. v.409, p.1037-1040. 2001.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**. v.56, p.330-338. 1922.

YANNIC et al. Description of microsatellite markers and genotyping performances using feathers and buccal swabs for the Ivory gull (*Pagophila eburnea*). **Molecular Ecology Resources**. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com>> Acesso em: 22-06-11.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J. POPGENE (version 1.32): Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: University of Alberta. 1997.

YEUNG, C. K. L. et al. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. **Conservation Genetics**. v.10, p.1081–1084. 2009.

ZANE, L. et al. Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. **Marine Biology**. v.136, p.191–199. 2000.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**. v.11, p.1–16. 2002.

APÊNDICE I

Alelos e frequências alélicas por loco e por população, obtidos a partir dos dois locos heterólogos.

	Frequências alélicas			
	Loco Ah217		Loco Ah536	
	alelo	frequência	alelo	frequência
Barra do Ribeiro	172	0,344	100	0,125
	174	0,063	102	0,344
	182	0,031	104	0,125
	184	0,406	106	0,406
	186	0,156	110	0
Eldorado do Sul	172	0,413	100	0,125
	174	0,152	102	0,250
	182	0,065	104	0,417
	184	0,196	106	0,208
	186	0,174	110	0
Rio Claro	172	0,468	100	0,057
	174	0,129	102	0,257
	182	0,145	104	0,400
	184	0,129	106	0,257
	186	0,129	110	0,029
Garanhuns	172	0,435	100	0,022
	174	0,109	102	0,391
	182	0	104	0,348
	184	0,370	106	0,239
	186	0,087	110	0
Fernando de Noronha	172	0,182	100	0,132
	174	0,076	102	0,250
	182	0,485	104	0,191
	184	0,076	106	0,382
	186	0,182	110	0,044

APÊNDICE II

Estimativas de diversidade genética baseadas nos dados dos nove locos de microssatélites, sete específicos e dois heterólogos. Ho = heterozigoidade observada; He = heterozigoidade esperada; Ra = riqueza alélica; Fis = coeficiente de endogamia; P_{EHW} = valor de p obtido no teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = valores significativos ($p < 0,05$).

População	Loco	Ho	He	Ra	Fis	P _{EHW}
Barra do Ribeira	Bi01	0,500	0,542	3,627	0,080	0,959
	Bi08	0,250	0,315	2,000	0,211	0,473
	Bi15	0,250	0,508	2,000	0,516	0,050
	Bi18	0,375	0,337	3,907	-0,118	0,991
	Bi20	0,250	0,484	2,640	0,492	0,062
	Bi22	0,313	0,353	2,000	0,118	0,732
	Bi26	0,375	0,315	3,000	-0,200	0,356
	Ah217	0,688	0,710	4,976	0,032	0,011*
	Ah536	0,688	0,708	3,999	0,029	0,242
	Média	0,41	0,474	2,129	0,140*	-
Eldorado do Sul	Bi01	0,680	0,598	3,303	-0,140	0,379
	Bi08	0,280	0,393	2,000	0,291	0,173
	Bi15	0,480	0,470	2,000	-0,021	0,835
	Bi18	0,240	0,258	3,454	0,071	0,287
	Bi20	0,640	0,530	2,858	-0,213	0,456
	Bi22	0,640	0,509	2,000	-0,263	0,158
	Bi26	0,400	0,582	2,994	0,317	0,129
	Ah217	0,522	0,750	4,994	0,309	0,005*
	Ah536	0,750	0,720	4,628	-0,043	0,655
	Média	0,515	0,534	2,471	0,038	-
Rio Claro	Bi01	0,657	0,561	3,690	0,174	0,761
	Bi08	0,286	0,358	2,000	0,204	0,261
	Bi15	0,343	0,504	2,000	0,322	0,067
	Bi18	0,429	0,475	3,606	0,100	0,707
	Bi20	0,588	0,531	2,912	-0,110	0,864
	Bi22	0,371	0,401	2,000	0,075	0,719
	Bi26	0,371	0,438	2,976	0,153	0,066
	Ah217	0,484	0,722	3,992	0,333	0,057
	Ah536	0,686	0,714	3,696	0,040	0,194
	Média	0,468	0,523	2,320	0,105*	-
Garanhuns	Bi01	0,565	0,588	3,765	0,040	0,373
	Bi08	0,261	0,294	2,000	0,114	0,659
	Bi15	0,391	0,496	2,000	0,214	0,355
	Bi18	0,261	0,310	3,447	0,162	0,833
	Bi20	0,565	0,549	2,959	-0,031	0,987
	Bi22	0,609	0,510	2,000	-0,198	0,292

	Bi26	0,435	0,420	2,452	-0,035	0,796
	Ah217	0,783	0,670	4,938	-0,173	0,789
	Ah536	0,696	0,683	4,856	-0,019	0,933
	Média	0,507	0,502	2,491	-0,01	-
Fernando de Noronha	Bi01	0,714	0,598	3,471	-0,199	0,771
	Bi08	0,265	0,314	2,000	0,159	0,401
	Bi15	0,429	0,448	2,000	0,043	0,865
	Bi18	0,371	0,406	3,590	0,087	0,866
	Bi20	0,629	0,559	2,763	-0,126	0,793
	Bi22	0,657	0,507	2,000	-0,301	0,063
	Bi26	0,200	0,231	2,966	0,135	0,819
	Ah217	0,485	0,698	4,974	0,309	0,055
	Ah536	0,765	0,746	4,440	-0,025	0,552
	Média	0,502	0,501	2,468	-0,002	-