

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

JORGE LUIS RAMIREZ MALAVER

**PROBLEMAS TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA
THRESKIORNITHIDAE: FILOGENIA MOLECULAR E O CASO
DE *Eudocimus***

São Carlos

2011

**PROBLEMAS TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA
THRESKIORNITHIDAE: FILOGENIA MOLECULAR E O CASO
DE *Eudocimus***

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

JORGE LUIS RAMIREZ MALAVER

PROBLEMAS TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA
THRESKIORNITHIDAE: FILOGENIA MOLECULAR E O CASO
DE *Eudocimus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

São Carlos

2011

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

R173pt

Ramirez Malaver, Jorge Luis.

Problemas taxonômicos da família Threskiornithidae :
filogenia molecular e o caso de *Eudocimus* / Jorge Luis
Ramirez Malaver. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
61 f.

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

1. Filogenia. 2. Plataleinae. 3. Guará. 4. Delimitação de
espécies. I. Título.

CDD: 575.0012 (20^a)

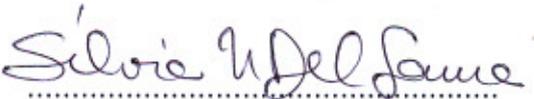
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

PROBLEMAS TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA
THRESKIORNITHIDAE: FILOGENIA MOLECULAR E O CASO
DE *Eudocimus*

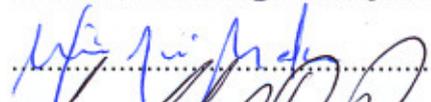
Dissertação de Mestrado de JORGE LUIS RAMIREZ MALAVER

Banca Examinadora

Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama


.....

Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki


.....

Prof. Dr. Manoel Dias


.....

Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza


.....

A Deus, meus pais
e as minhas irmãs
que sempre acreditaram em mim

“ . . .how entirely vague and arbitrary is the distinction between species and varieties.”

(Darwin 1859, p. 48)

Agradecimentos

À Professora Dra. Sílvia Nassif Del Lama pela orientação, pelo apoio, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança depositada em mim.

À Professora Dra. Cristina Yumi Miyaki por ter aceitado co-orientar este trabalho e por todas as suas sugestões.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Genética e Evolução por me ter acolhido e ter permitido que eu participasse desta maravilhosa comunidade acadêmica.

À CAPES pelo apoio mediante a bolsa de mestrado, sem a qual teria sido impossível a realização dessa dissertação de mestrado.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Genética de Aves: Andiará, Carol, Cynthia, Emeline, Manu, Regiane e Thais, obrigado pessoal por ter tolerado o meu portunhol, os meus esquecimentos (especialmente com a autoclave) e por todos os bons momentos vividos nestes dois anos.

Ao Dr. Paul Sweet e ao American Museum of Natural History pelas amostras para a realização da filogenia molecular.

Ao Dr. Muchai Muchane e Dr. Ronald Mulwa do Natural Museum of Kenya pelas amostras concedidas.

Ao Dr. Peter Frederick pelo apoio outorgado com a doação das amostras de *Eudocimus albus*.

Aos meus pais e irmãs pelo apoio incondicional nesta etapa da minha vida. Sei que foi difícil tanto para vocês como para mim. Obrigado por tudo.

RESUMO

A família Threskiornithidae inclui 13 gêneros e 32 espécies e suas relações interespecíficas, assim como as designações dos gêneros, espécies ou subespécies foram pouco estudadas. A família tem sido dividida em duas subfamílias: Plataleinae e Threskiornithinae. O caso de *Eudocimus ruber* e *Eudocimus albus* é uma das questões interessantes da taxonomia do grupo, pois têm sido consideradas como espécies, mas mostram similaridades no comportamento e há registros de hibridização na natureza. Os objetivos do presente estudo foram reconstruir as relações filogenéticas dentro da família Threskiornithidae e avaliar o nível de diferenciação genética entre *Eudocimus albus* e *E. ruber*, baseando-se nos dados de sequências de genes mitocondriais e nucleares. DNA foi extraído de amostras de sangue e de tecidos de 13 espécies de Threskiornithidae, representantes de sete gêneros da família e de dois grupos externos. Para o estudo do caso de *Eudocimus* foram analisadas amostras de 10 indivíduos de cada espécie. Foram sequenciados os genes 16S rRNA e o íntron 7 do β -fibrinogênio para todas as espécies. Nos indivíduos de *Eudocimus* foram sequenciados também os genes Citocromo B, Citocromo Oxidase I, o íntron 11 da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, o íntron 4 da Proteína Proteolipídica da Mielina e o íntron 2 da Mioglobina. Sequências para outras cinco espécies da família foram obtidas do GenBank. Árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de inferência de *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Análise Bayesiana e Estimativa Bayesiana de árvore de espécies. Redes de haplótipos e distâncias genéticas foram determinadas para as sequências de *Eudocimus*. Diversas abordagens de delimitação de espécies usando informação multilocus foram realizadas. A família Threskiornithidae com 18 espécies se apresentou como grupo monofilético fortemente sustentado em todas as análises. A classificação atual das duas subfamílias não foi corroborada: Plataleinae se apresentou como grupo monofilético, mas agrupada dentro dos Threskiornithinae, sendo este último um grupo parafilético. Os testes de monofilia rejeitaram a hipótese de Threskiornithinae ser um grupo monofilético. A família Threskiornithidae pode ser dividida em dois grupos: o primeiro agrupando somente gêneros endêmicos do continente americano (*Theristicus* e *Eudocimus*) e o outro com as demais espécies. Dentro deste último clado, observa-se em posição basal as espécies do gênero *Plegadis* e a subfamília Plataleinae agrupada com o restante das espécies. Este padrão de distribuição de espécies concorda com uma divisão inicial Gondwânica e uma posterior colonização por espécies do velho ao novo mundo. A divergência da família foi estimada em 35 – 40 milhões de anos, data anterior à separação do continente Americano da Antártica. As análises genéticas mitocondriais mostraram as espécies de *Eudocimus* como duas linhagens diferentes. Nas análises multilocus baseadas nos genes nucleares foi possível recuperar um forte sinal de especiação apesar da polifilia encontrada em três dos quatro marcadores.

Palavras-Chave: Filogenia molecular; Threskiornithidae. Plataleinae. Guará. *Eudocimus*. Delimitação de espécies.

ABSTRACT

The family Threskiornithidae includes 13 genera and 32 species, but the relationships among genera, species or subspecies have been little studied. This family is traditionally divided into two subfamilies: Plataleinae and Threskiornithinae. One of the more interesting taxonomical questions within this group is the case of the species *Eudocimus ruber* and *Eudocimus albus*. They are usually considered as separate species, but they show similar behavior and there are also records of hybridization in nature. This study aims to reconstruct the phylogenetic relationships within the family Threskiornithidae as well as assess the level of genetic differentiation between *Eudocimus albus* and *E. ruber*, using mitochondrial and nuclear gene sequences. DNA was extracted from blood and tissue samples from 13 species of Threskiornithidae (seven genera) and two outgroups. For the *Eudocimus* study were extracted 10 individuals of each species. We sequenced the 16S rRNA and the intron 7 of β -Fibrinogen for all species. For *Eudocimus* Cytochrome B, Cytochrome Oxidase I, intron 11 of Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase, intron 4 of the Myelin Proteolipid Protein and intron 2 of Myoglobin were also sequenced. Sequences for other five species of the family were obtained from GenBank. Phylogenetic trees were constructed using Neighbor-Joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Bayesian inference and Bayesian inference of species tree. Networks and genetic distances were determined for *Eudocimus*' haplotypes. Several approaches for species delimitation using multilocus data were applied. All analyses strongly supported the family Threskiornithidae (18 species) as a monophyletic group. However, the current classification of two subfamilies was not supported by our data: Plataleinae formed a monophyletic group, but nested within Threskiornithinae (a paraphyletic group). Tests of monophyly rejected the hypothesis of monophyly of Threskiornithinae. The family Threskiornithidae also showed a division into two groups: one with only genera endemic to the American continent (*Theristicus* and *Eudocimus*) and another with the remaining species. Within the latter clade, species of genus *Plegadis* are observed in a basal position, while subfamily Plataleinae was grouped with the remaining species. This pattern of species distribution suggests an initial Gondwana division and subsequent colonization by species from the Old to the New World. The divergence within the family was estimated at 35-40 million years, which is before the separation between America and Antarctica. Mitochondrial genetic analysis showed *Eudocimus* species as two different lineages. Multilocus analysis based on nuclear genes revealed a strong signal of speciation despite the polyphyly found in three of the four markers.

Keywords: Molecular phylogeny. Threskiornithidae. Plataleinae. Scarlet Ibis. *Eudocimus*. Species delimitation.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Descrição das amostras e das seqüências analisadas para a realização da filogenia molecular.....	17
TABELA 2.	Distâncias genéticas entres as distintas espécies usando o gene 16S rRNA.....	33
TABELA 3.	Distâncias genéticas entre as distintas espécies usando o gene FIB-7.....	34
TABELA 4.	Descrição das amostras e das seqüências analisadas para a delimitação de espécies no gênero Eudocimus.....	36
TABELA 5.	Haplótipos recuperados a partir das seqüências analisadas para a delimitação de espécies no gênero Eudocimus.....	37
TABELA 6.	Valores de verossimilhança (lnL) encontrados na delimitação de linhagens usando-se a metodologia desenvolvida por Knowles & Carstens (2007).....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Distribuição geográfica de <i>Eudocimus albus</i> (A) e <i>Eudocimus ruber</i> (B).....	7
FIGURA 2.	Árvore filogenética baseada em 589 pb do gene 16S rRNA obtida por inferência bayesiana.....	29
FIGURA 3.	Árvore filogenética baseada em 968 pb do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio obtida por inferência bayesiana.....	30
FIGURA 4.	Árvore de espécies baseada em 589 pb do 16S rRNA e 968 pb do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio obtido no programa *BEAST.....	31
FIGURA 5.	Cronograma baseado em 968 pb do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio obtida pelo programa BEAST assumindo relógio molecular relaxado.....	32
FIGURA 6.	Redes de haplótipos obtidas com dados dos marcadores mitocondriais.....	38
FIGURA 7.	Redes de haplótipos obtidas baseadas nos dados dos marcadores nucleares.....	39
FIGURA 8.	Filogenias de Threskiornithidae: a) Sibley & Ahlquist (1990); b) Fleischer & McIntosh (2001); c) Ferreira (2007); d) Chesser et al. (2010b).....	44

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	<i>Estudos filogenéticos e conservação da biodiversidade</i>	1
1.2.	<i>Sistemática em aves</i>	3
1.2.1.	<i>A família Threskiornithidae na ordem dos Pelecaniformes</i>	4
1.2.2.	<i>A família Threskiornithidae</i>	5
1.3.	<i>Eudocimus ruber e Eudocimus albus são ou não espécies distintas?</i>	6
1.4.	<i>Distribuição de Eudocimus ruber</i>	9
1.5.	<i>Distribuição de Eudocimus albus</i>	11
2.	JUSTIFICATIVA	13
3.	OBJETIVO	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1.	<i>Material</i>	16
4.2.	<i>Extração de DNA</i>	18
4.3.	<i>Amplificação dos fragmentos</i>	18
4.4.	<i>Sequenciamento</i>	21
4.5.	<i>Análise dos dados</i>	22
4.5.1.	<i>Análises na família Threskiornithidae</i>	22
4.5.2.	<i>O caso Eudocimus</i>	24
5.	RESULTADOS	26
5.1.	<i>Filogenia interespecífica</i>	26
5.2.	<i>O caso Eudocimus</i>	35
6.	DISCUSSÃO.....	42
6.1.	<i>Filogenia interespecífica</i>	42
6.2.	<i>Controvérsias nas designações de gêneros</i>	46
6.3.	<i>O Caso Eudocimus</i>	48
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Estudos filogenéticos e conservação da biodiversidade*

A importância da conservação da biodiversidade foi uma das principais conclusões da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, ocorrida no Rio de Janeiro e assinada por 168 países, incluindo o Brasil (CONVENTION OF BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992). As ações conservacionistas podem ser planejadas em níveis diversos: a partir dos genes, espécies ou ecossistemas. A conservação da biodiversidade referente às espécies só será mais adequadamente planejada, quando as relações taxonômicas ficarem esclarecidas dentro de um grupo (NOSS, 1990).

Os métodos moleculares disponíveis para a reconstrução das relações filogenéticas apresentam vantagens e limitações. Metodologias que usam as seqüências macromoleculares como as do DNA têm sido geralmente as mais selecionadas, pois permitem inferências quantitativas a respeito das relações filogenéticas. A análise de seqüências de DNA aplicada aos estudos evolutivos tem ajudado a descrever a diversidade da vida e tem permitido analisar as relações evolutivas detalhadas dentro de grupos diversos de organismos (STOECKLE, 2003).

O DNA mitocondrial (DNAmít) possui características únicas que o tornam muito apropriado para os estudos evolutivos: possui uma freqüência alta de mutações (5 a 10 vezes maior que o DNA nuclear), não sofre recombinação e tem transmissão unidirecional pela via materna ao longo das gerações. Estas características do DNAmít permitem sua utilização em comparações entre estruturas genéticas dentro de uma mesma espécie e entre espécies relacionadas (BROWN, et al., 1979; AVISE, 2004). Diversos genes mitocondriais têm sido utilizados em estudos filogenéticos nas aves. Podemos citar entre eles o gene do Citocromo B (CytB), utilizado por Slikas, (1997)

para reconstruir a filogenia da família Ciconiidae. Fain e Houde (2007) usaram este mesmo marcador junto com outros marcadores mitocondriais (incluindo o gene 16S rRNA), no estudo da filogenia dos Gruiformes. Van Tuinen et al. (2001) usou o gene 16S rRNA entre outros marcadores para estudar a evolução das aves aquáticas. Hebert et al. (2004), Yoo et al. (2006) e Kerr et al. (2009) avaliaram a funcionalidade do gene da subunidade I da Citocromo C Oxidase I (COI) como *barcode* do DNA em diversas ordens de aves, validando a efetividade desta abordagem na identificação de diversas espécies.

Marcadores nucleares também têm sido utilizados em estudos filogenéticos. Um exemplo é o do gene 18S rRNA que por ser muito conservado tem sido utilizado para definir relações evolutivas entre taxa mais distantes (VAN TUINEN et al., 2000). Genes como o do íntron II do gene da Mioglobina, o *c-myc*, o RAG-1, o do β -Fibrinogênio (intron7) e o da Ornitina Descarboxilase (introns 6 e 7, e o exon 7), assim como mais alguns foram utilizados por Hackett et al. (2008) em uma abordagem filogenômica com 19 locos nucleares e 169 espécies de aves. Esses autores propuseram uma nova visão da classificação atual e do nosso entendimento a respeito da evolução das aves. Nesse estudo foi incluída apenas uma espécie da família Threskiornithidae e, por esse motivo, as relações internas desse grupo não foram analisadas.

No entanto existem limitações na utilização de DNAmít ou de DNA nuclear. O DNA mitocondrial possui uma maior taxa evolutiva, mas é limitado pelo fato de ser herdado por uma só linhagem parental. Os genes nucleares podem sofrer recombinação, possuem uma taxa evolutiva geralmente menor, mas são herdados por ambas as linhagens. A tendência atual é a utilização de ambos os tipos de genes e trabalhar com um maior número de genes com o intuito de evitar o efeito estocástico do processo

coalescente, refletindo assim as histórias evolutivas das espécies e não de um único gene.

1.2. *Sistemática em aves*

Inicialmente, a sistemática das aves era descritiva e a classificação era baseada somente na anatomia. Essa etapa foi sucedida por um período comparativo confinado aos estudos dos esqueletos, articulações ou sistemas e, depois, por um período filogenético intenso estimulado por descobrimentos paleontológicos e pela expansão de análises baseadas em sequências de DNA (LIVEZEY; ZUSI, 2007). Apesar dos diversos enfoques, a maioria das relações evolutivas dentro do grupo das aves permanece sem solução (HACKETT et al. 2008).

As dificuldades para recuperar as relações evolutivas no grupo das aves são possivelmente devidas a uma rápida divergência inicial na sua história evolutiva. Essa condição resultou no surgimento de muitos grupos morfologicamente distintos, com poucas formas intermediárias que unam esses grupos bem definidos (HACKETT et al. 2008). Apenas dois nós na base da árvore das aves são consistentemente suportados pelos estudos filogenéticos moleculares e morfológicos. O primeiro nó divide os Paleognathae (ratitas e tinamídeos) e os Neognathae (todas as outras aves) e o segundo nó divide os Neognathae em Galloanserae (galinhas, patos e outros) e Neoaves (os outros neognathos) (HACKETT et al. 2008). A maioria das aves pertence ao grupo das Neoaves (95% das espécies existentes), mas existe pouco consenso sobre as relações dentro deste clado. James (2005) afirma que o maior problema na sistemática das aves são as relações profundas entre os taxa modernos.

1.2.1. A família *Threskiornithidae* na ordem dos *Pelecaniformes*

A família *Threskiornithidae* foi tradicionalmente classificada em uma das ordens mais clássicas da sistemática das aves: a ordem dos *Ciconiiformes* que abrange aves pernaltas, de bico e pescoço longos (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Há controvérsias, entretanto, sobre a monofilia desta ordem e alguns autores propuseram este grupo como parafilético (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). A ordem compreende grupos heterogêneos e somente as famílias *Ciconiidae* (cegonhas), *Threskiornithidae* (íbis e colhereiros) e *Ardeidae* (garças) foram geralmente aceitas como pertencentes à ordem (VAN TUINEN et al., 2001; LIVEZEY; SUZI, 2001). Outras duas famílias monogênicas (*Balaenicipitidae* e *Scopidae*) também foram consideradas como pertencentes à ordem dos *Ciconiiformes*, embora estudos moleculares as coloquem como mais relacionadas aos *Pelecaniformes* (VAN TUINEN et al., 2001).

Estudos moleculares, entretanto, apontaram evidências que não corroboram a monofilia da ordem. Ericson et al. (2006) trabalhando com cinco genes nucleares (~5000pb) encontraram que os pelicanos (*Pelecanidae*) estão relacionados às garças (*Ardeidae*) e ao grupo dos íbis (*Threskiornithidae*) e confirmaram que os tradicionais *Pelecaniformes* e *Ciconiiformes* não são monofiléticos. Hackett et al. (2008) em seu estudo filogenômico, analisaram aproximadamente 32 Kb e confirmaram que os *Pelecaniformes* e *Ciconiiformes* típicos estão misturados em um mesmo clado. Baseando-se neste último trabalho, o projeto mundial “*Tree of life*” e a American Ornithologists' Union consideraram somente a família *Ciconiidae* como pertencente à ordem dos *Ciconiiformes*. As famílias *Threskiornithidae*, *Ardeidae*, *Balaenicipitidae* e *Scopidae* foram reclassificadas como membros da ordem *Pelecaniformes* (CHESSER et al., 2010a) e essa designação foi adotada no presente estudo.

1.2.2. A família *Threskiornithidae*

Threskiornithidae é uma família que abrange aves de porte médio a grande (de 50 cm até os 110 cm da íbis gigante), sendo os machos levemente maiores que as fêmeas em algumas espécies. O corpo é alongado, mas robusto, com um bico razoavelmente longo, sendo esse indiscutivelmente, o elemento morfológico mais importante (MATHEU; DEL HOYO, 1992). A família *Threskiornithidae* inclui 13 gêneros e 32 espécies, mas devido à escassez de estudos de sistemática nesse grupo, pouco se sabe sobre suas relações interespecíficas (MATHEU; DEL HOYO, 1992). Sua monofilia não tem sido seriamente questionada. Um dos poucos trabalhos realizado com número maior de espécies e baseado em caracteres da osteologia craniana encontrou a família *Threskiornithidae* como um grupo monofilético (FERREIRA, 2007).

Threskiornithidae foi tradicionalmente subdividida em duas subfamílias: *Threskiornithinae* que compreende os íbis e as curicacas (caracterizados pelo seu bico curvo, longo e estreito) e *Plataleinae* formado pelos colhereiros (caracterizados pelo bico em forma de espátula, longo, com a ponta achatada) (AUSTIN JUNIOR.; SINGER, 1983). O principal caractere que distingue as duas subfamílias é a forma do bico. A validade destas duas subfamílias tem sido questionada por alguns autores (SIBLEY; AHLQUIST, 1990; FLEISCHER; MCINTOSH 2001; FERREIRA, 2007). No entanto, outros autores consideram a subfamília *Plataleinae* como uma família independente (LIVEZEY; ZUSI, 2007). Informação adicional, em especial dados genéticos, poderia contribuir na organização da classificação dentro desta família.

Entre as principais controvérsias taxonômicas da família *Threskiornithidae* estão as designações dos gêneros, espécies ou subespécies (REMSEM et al., 2010; MATHEU; DEL HOYO, 1992). Algumas espécies às vezes são isoladas em gêneros monoespecíficos (*Ajaja*, *Carphibis*, *Hagedashi*, *Harpiprion*, *Lampribis*, *Platibis*,

Thaumatibis), sendo que o número de gêneros da família varia de acordo com cada autor, sendo 13 para Matheu & Del Hoyo (1992), 14 para Monroe e Sibley (1993) ou ainda 18 para Howard e Moore (1998) dependendo de se há ou não a inclusão destes gêneros.

O problema das subespécies é apresentado para quase todas as espécies desta família como exemplo: *Threskiornis aethiopicus*, *Bostrychia hagedash*, *Theristicus caudatus*, *Phimosus infuscatus*. Essa questão não é colocada apenas para algumas formas bem diferenciadas como as das espécies do gênero *Platalea* (cujas espécies *P. flavipes* e *P. ajaja* costumam ser isoladas em gêneros monoespecíficos) (MATHEU; DEL HOYO, 1992).

1.3. *Eudocimus ruber* e *Eudocimus albus* são ou não espécies distintas?

Uma questão taxonômica que merece ser investigada é a que envolve *Eudocimus ruber* (LINNAEUS, 1758) e *E. albus* (LINNAEUS, 1758), isto é, elas deveriam ser consideradas como espécies ou como subespécies? *Eudocimus ruber* possui plumagem vermelha carmesim e ocorre no norte, noroeste e sudeste da América do Sul, em manguezais das regiões costeiras e nas áreas alagáveis de água doce no interior (Figura 1B) (SICK, 1997). *Eudocimus albus* possui plumagem branca e sua distribuição inclui todas as três Américas (Figura 1A). Uma zona de sobreposição de ocorrência de *E. ruber* e *E. albus* pode ser observada nas suas áreas de distribuição geográfica, localizada na região dos Llanos da Venezuela e da Colômbia (Figura 1) (RAMO; BUSTO, 1987). Nessa região *E. ruber* e *E. albus* parecem ocupar o mesmo nicho ecológico, alimentam-se nos mesmos locais, voam juntas nas mesmas formações, ocupam as mesmas colônias de ninhais e não apresentam diferenças na alimentação, nem no comportamento reprodutivo (RAMO; BUSTO, 1987).

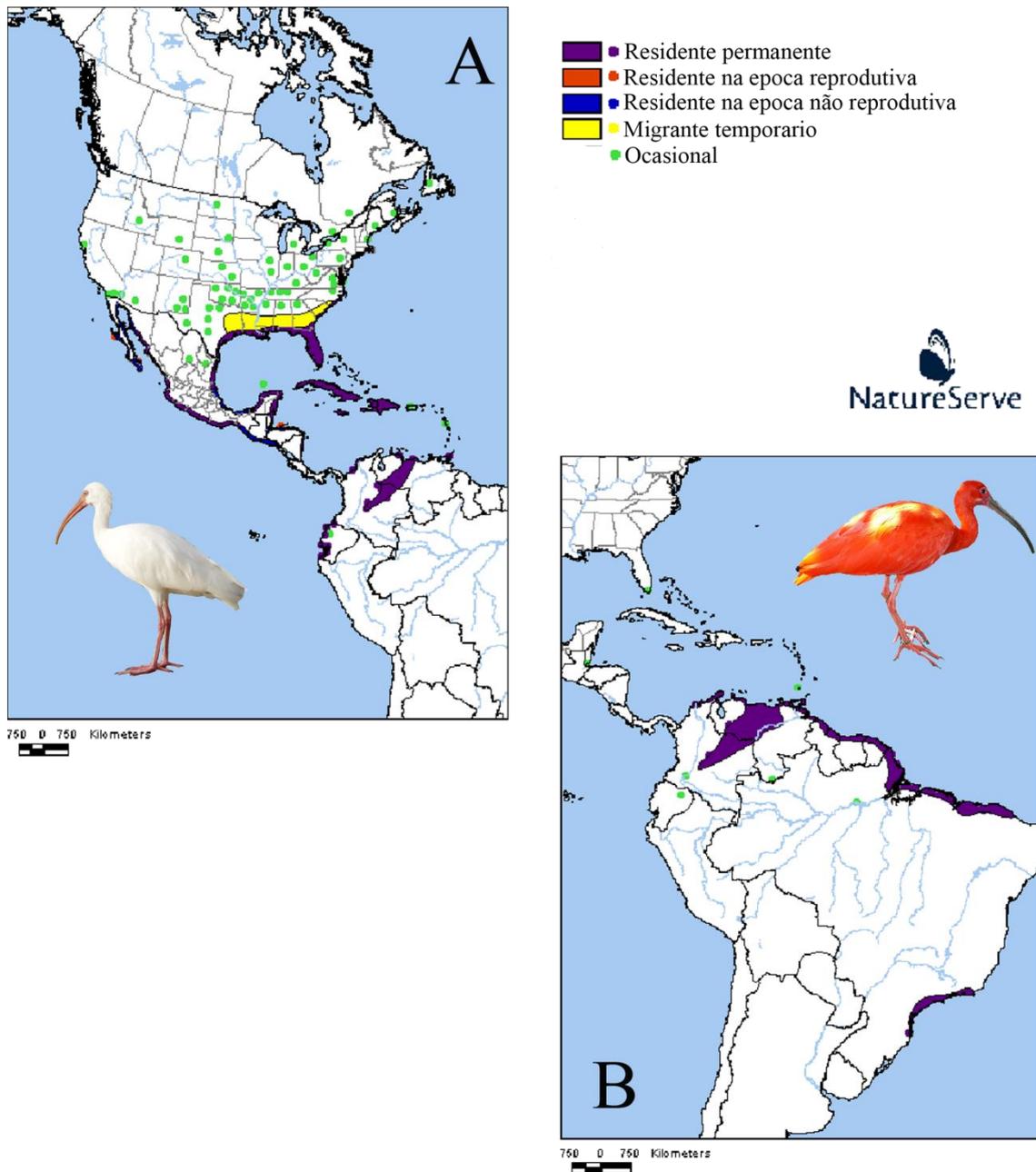


Figura 1 Distribuição geográfica de *Eudocimus albus* (A) e *Eudocimus ruber* (B).

Mapas retirados do site <http://www.natureserve.org/infonatura/>.

O primeiro registro de hibridização entre as duas espécies foi no *Greyolds Park* na Florida, onde ovos de *E. ruber* foram introduzidos em 1961 e onde posteriormente foram observados híbridos rosados na colônia. (Z AHL, 1967). Ramo e Busto (1987) relatam ainda a observação de 40 casais mistos e 14 cópulas mistas entre 1981 e 1984 nos Llanos da Venezuela. Híbridos rosados foram encontrados, também nos EUA, na forma selvagem na região costeira da Flórida e mais ao norte da Carolina do Sul, e seu surgimento foi atribuído à fuga de indivíduos de *E. ruber* do cativeiro (BELSER, 1989).

Ridgway (1884) considerou-as como uma única espécie e Kushlan e Bildstein (1992) consideraram estas duas espécies como variantes de cor co-específicas. Ramo e Busto (1987) propõem sua reclassificação como subespécies, baseando-se na observação de cruzamentos entre elas com progênie, nos Llanos da Venezuela. Hancock et al. (1992) propõem sua classificação como duas subespécies, baseando-se na falta de isolamento reprodutivo entre indivíduos em cativeiro. Além disso, esses últimos autores, baseando-se em informação morfológica sobre o tamanho e coloração na época reprodutiva, propõem que *E. albus* seja formada por duas subespécies: uma distribuída desde a América do Norte até Panamá e a outra na América do Sul, a segunda subespécie seria variante de cor do *E. ruber* (HANCOCK et al., 1992).

Como a especiação é um processo gradual e não repentino, muitas vezes é difícil determinar o limite entre espécies. Conceitos modernos de espécie como o conceito geral de linhagem (DE QUEIROZ, 2007) levam em conta esta mudança gradual e propõe a existência de uma *gray zone* entre uma e duas espécies. Esta *gray zone* seria dividida em passos graduais (*species criterion*), sendo cada um deles representado pela aquisição de diferenças que levariam à formação das duas novas espécies a partir de uma. Esses passos seriam caracterizados pelas etapas em que as duas espécies se tornam feneticamente diferenciáveis, diagnosticáveis, ou quando apresentam monofilia

recíproca, isolamento reprodutivo, ou se tornam ecologicamente distintas, etc.. A *gray zone* pode ser utilizada quando os diferentes conceitos de espécie entram em conflito.

1.4. *Distribuição de Eudocimus ruber*

O nome popular de *E. ruber* no Brasil é guará e essa ave tem sido considerada como uma das mais belas da avifauna brasileira. Até o século XIX o Brasil apresentava dois grupos populacionais de *E. ruber* que estavam espalhadas por grande parte do litoral brasileiro no norte e sudeste-sul do país. Antas et al. (1990) estimaram que a população brasileira totalizava 24.000 guarás. A população do sudeste sofreu um declínio populacional intenso, possivelmente relacionado à alteração do seu hábitat pelo homem, o que resultou na sua redução drástica. Atualmente, as populações de *E. ruber* no Brasil estão quase totalmente restritas às regiões costeiras dos estados de Maranhão, Pará e Amapá e, em algumas raras colônias, encontradas nos manguezais do estado de São Paulo, no município de Cubatão e na Ilha Comprida. A falta de informação sobre a saúde dessas populações remanescentes representa um problema para a conservação da espécie (SANTOS et al., 2006).

Uma das práticas que ainda ameaça essas populações é a utilização do guará na alimentação. Esse hábito não está relacionado à escassez de outros recursos nas áreas de ocorrência da espécie. Em colônias como a da ilha do Cajual (MA), essas aves correm risco de desaparecer devido ao hábito de coleta de ovos e filhotes por parte dos habitantes locais (RODRIGUES, 1995). Além disso, a caça com armas de fogo representa outra ameaça real às populações do norte do país.

A população de Cubatão foi localizada há mais de vinte anos e a procedência dos indivíduos fundadores é ainda controversa. Olmos e Silva e Silva (2003) propõem duas hipóteses: essa população seria remanescente do original da região costeira sudeste e, de alguma forma, sobreviveu durante o período de declínio populacional, sem ter sido

detectada anteriormente, ou os fundadores são originários de outro lugar e se estabeleceram na região naturalmente ou com ajuda humana. Outros registros esparsos em São Paulo, nos municípios de Itanhaém e Iguape informam a presença de pequenos grupos ou de indivíduos isolados, inclusive com indícios de atividade reprodutiva. A grande maioria dos registros, porém se refere à região de Santos / Cubatão, onde grupos numerosos são vistos desde 1984. O número de aves avistadas em Cubatão foi de cerca de 160 na década dos 90 (ARGEL-DE-OLIVEIRA et al., 1993) e de cerca de 500 indivíduos em 2003 (OLMOS e SILVA E SILVA, 2003). A ocupação da Ilha Comprida parece ser mais recente, pois o grupo foi avistado pela primeira vez no ano 2003, por todo o Lagamar. No ano de 2005, no período de um ano, saltou de 45 para perto de 500 aves, com um rápido aumento nos filhotes o que indica as boas condições para a reprodução na região. No ano 2007, a contagem das aves foi 829, com uma estimativa de 200 a 300 filhotes nos ninhos. A expectativa é que esse número ultrapasse 1000 aves em breve. (http://www.ilhacomprida.sp.gov.br/home/pag_meio_amb_019.htm Data de acesso: maio de 2009).

As três populações de *E. ruber*, da ilha do Caju (MA), da ilha da Canela (PA) e de Cubatão (SP), foram caracterizadas geneticamente por Santos (2005) com a utilização de marcadores microssatélites (12 locos) e por uma análise preliminar com marcadores RAPD. Os níveis da variabilidade genética observada variaram de baixo (microssatélites) a moderado (marcadores RAPD) e o autor atribui esse padrão aos eventos ancestrais do tipo “gargalo”, seguidos de expansões populacionais posteriores. Segundo o autor, essas populações analisadas apresentaram baixo fluxo gênico entre si.

Gonçalves et al. (2010) estudaram a diversidade e a estruturação genética de *E. ruber* dessas mesmas três localidades (ilha do Caju MA, ilha da Canela PA e Cubatão SP), baseando-se no íntron 7 do gene do β -fibrinogênio. Os autores não encontraram

estruturação genética e a diversidade encontrada dentro das localidades foi maior que a detectada entre as mesmas. Os autores sugeriram para explicar seus resultados que as populações foram recentemente isoladas a partir de uma população panmítica originalmente distribuída ao longo de toda costa brasileira.

1.5. *Distribuição de Eudocimus albus*

Historicamente *E. albus* é uma das aves aquáticas mais abundantes da América do Norte, com populações regionais com 20000 - 30000 casais. Sua distribuição inclui as costas dos estados norte americanos da Virginia, Louisiana, o interior da Carolina do Sul e a Florida. A espécie ocorre também nas costas do México, incluindo a Baja California, e na América Central ocorre desde Belize até a Nicarágua e também ao longo do Pacífico, com exceção das costas de Costa Rica e Panamá. Indivíduos residentes e aparentemente nidificando são encontrados em Cuba, Hispaniola e Jamaica. Na América do Sul, a nidificação ocorre em pequenos núcleos, na costa e no interior da Colômbia e da Venezuela e podem ser vistos também ao leste, como nas Guianas (KUSHLAN; BILDSTEIN, 1992).

Frederick et al. (1996) encontraram evidências de pelo menos quatro grandes mudanças na localização geográfica das populações dos EUA, num período de 63 anos. Esses autores mostraram que estas mudanças não se devem a movimentos migratórios, mas à uma conduta nômade da espécie. O número de indivíduos flutua anualmente entre as distintas áreas ocupadas pela espécie. Os registros disponíveis indicam colônias reprodutivas de 125.000 casais em 1993, 170.000 casais em 1976 e 51.000 casais em 1991, números esses que indicam que a população dos EUA parece estar decrescendo (FREDERICK et al., 1996).

Apesar do impacto da espécie sobre a aquicultura de moluscos ser mínimo, ela tem sido considerada uma ameaça pelos criadores de lagostim. Os adultos de *E. albus*

são comidos por residentes locais na América do Norte como uma tradição. Restrições de caça têm sido efetivas em algumas áreas e ainda que a espécie continue sendo caçada diretamente pelo homem, sua maior ameaça se deve à destruição dos sítios apropriados para estabelecimento de suas colônias reprodutivas (KUSHLAN; BILDSTEIN, 1992).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o número de espécies atualmente ameaçadas de extinção e a velocidade com que são extintas podem superar em muito a magnitude das extinções ocorridas no passado em nosso planeta (SMITH et al., 1993). As populações e espécies de plantas e animais estão desaparecendo rapidamente como consequência direta e indireta das atividades humanas. Essas perdas podem ser ainda maiores com o avanço das mudanças climáticas e com o incremento do tamanho da população humana (SODHI; EHRLICH, 2010). Um dos principais investimentos de pesquisa que se contrapõe à esta crise ambiental é o que trata de estabelecer prioridades de conservação, procurando caracterizar e manter a maior quantidade de elementos biológicos dentro dos sistemas naturais (PRIMACK et al., 2001).

As aves aquáticas da família Threskiornithidae dependem de planícies inundáveis para sua reprodução, sua alimentação e repouso. Essas áreas, como pântanos e manguezais, têm sido intensamente impactadas e sua avifauna se tornado criticamente ameaçada. Todos os membros da família Threskiornithidae estão vulneráveis às transformações massivas ocorridas nesse tipo de habitat e que podem implicar em perda de diversidade genética. Como exemplo dessa vulnerabilidade, podemos citar a condição de *Nipponia nippon* e *Geronticus eremita*, duas espécies dessa família com *status* de ameaçadas. O conhecimento das relações filogenéticas entre as espécies dessa família é, portanto, urgente (MATHEU & DEL HOYO, 1992).

A classificação e identificação dos organismos vivos acompanham o homem desde seus primórdios. Apenas 1,7 milhões de espécies foram descritas e a maioria pelo uso de marcadores morfológicos, mas estima-se que existam cerca de 10 a 100 milhões de eucariontes vivos (HEBERT et al., 2003).

Os marcadores mitocondriais têm sido utilizados nos estudos filogenéticos em diversos grupos de organismos, não somente nas aves. Dentre as macromoléculas usadas nas análises filogenéticas, o rRNA, particularmente o 16S rRNA tem provado ser útil no estabelecimento de relações evolutivas, devido ao seu alto conteúdo de informação, sua conservação e sua distribuição natural nos organismos (LANE et al., 1985; AVISE, 2004).

Estudos filogenéticos incluem cada vez mais um número maior de marcadores, sejam mitocondriais ou nucleares, para que as topologias obtidas reflitam a história evolutiva das espécies e não a dos marcadores utilizados (AVISE 2004). O DNA mitocondrial é limitado pelo fato de ser herdado por uma só linhagem parental. Prychitko e Moore (1997) propõem o uso de genes nucleares que representem linhagens distintas e que tenham suficiente informação filogenética para resolver as relações evolutivas entre espécies relacionadas. Os autores sugerem a utilização de íntrons que evoluem mais rapidamente do que os éxons. O íntron 7 do gene do β -fibrinogênio foi testado por esses autores e ficou demonstrada a sua utilidade para análises filogenéticas, sendo seu sinal filogenético tão informativo quanto o do gene mitocondrial Citocromo B.

Nossa hipótese é de que a monofilia da família Threskiornithidae seja confirmada, pois ela não foi previamente questionada na literatura. Espera-se, entretanto, não encontrar uma monofilia recíproca das duas subfamílias Plataleinae e Threskiornithinae, conforme evidências encontradas na literatura (SIBLEY; AHLQUIST, 1990; FLEISCHER; MCINTOSH 2001; FERREIRA, 2007). Atualmente não existe nenhum estudo a nível genético entre complexos de espécies (superespécies ou subespécies) na família Threskiornithidae. O caso de *Eudocimus ruber* e *E. albus* é uma das maiores controvérsias na taxonomia do grupo. Elas têm sido consideradas

comumente como espécies separadas, apesar de mostrarem similaridades no comportamento alimentar e reprodutivo e dos registros de hibridização na natureza. Alguns autores as classificam como co-específicas (KUSHLAN; BILDSTEIN, 1992) ou como subespécies de *E. ruber* (RAMO; BUSTO, 1987).

Nossa hipótese é de que *Eudocimus ruber* e *E. albus* constituem duas espécies. Pela análise de delimitação de espécies, usando-se os genes nucleares e mitocondriais, espera-se encontrar grau de separação genética entre elas e encontrar evidências de que as duas espécies formam linhagens evolutivas diferentes. Como há híbridos naturais entre elas, esta hipótese poderá ser descartada, e evidências de que as duas espécies formam uma única unidade evolutiva poderão ser encontradas.

Os métodos e conceitos da sistemática, principalmente a análise da diversidade filogenética, têm sido cada vez mais utilizados para subsidiar planos para a conservação. A informação obtida nesse estudo poderá contribuir nos planos de conservação das espécies da família Threskiornithidae e das populações de *Eudocimus ruber* e *E. albus*.

3. OBJETIVO

Reconstruir as relações filogenéticas entre representantes de taxas da família Threskiornithidae, visando avaliar a monofilia da família e das subfamílias Plataleinae e Threskiornithinae, baseando-se em dados de marcadores mitocondriais como nucleares. Em paralelo, procurar-se-á avaliar se *Eudocimus albus* e *E. ruber* possuem *status* de espécies ou não, usando-se marcadores mitocondriais e nucleares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Material*

O material biológico foi obtido de distintas fontes. Amostras de sangue estocadas no Laboratório de Genética de Aves (UFSCar) foram usadas. Amostras de tecidos provenientes do *National Museums of Kenya* (Nairóbi, Quênia) e do *American Museum of Natural History* (Nova York, EUA) (Tabela 1) foram também utilizadas como fontes de DNA. Cinco seqüências para os distintos marcadores escolhidos, disponíveis na base de dados do GenBank, foram incluídas nas análises (Tabela 1). Utilizou-se como grupo externo, amostras de *Mycteria americana* (Ciconiidae) e de *Ardea alba* (Ardeidae).

Para o estudo das duas espécies do gênero *Eudocimus*, foi extraído DNA de amostras de sangue de 10 indivíduos de *E. ruber* e de amostras de tecido de 10 indivíduos de *E. albus*. As amostras de sangue de *Eudocimus ruber* estavam estocadas no Laboratório de Genética de Aves e são provenientes de colônias no Amapá. As amostras de tecido (fígado) de *Eudocimus albus* são provenientes da Flórida (USA) e foram enviadas pelo Dr. Peter Frederick (Department of Wildlife Ecology and Conservation, University of Florida). Foi utilizado como grupo externo um indivíduo de *Theristicus caudatus*.

Tabela 1 Descrição das amostras e das seqüências analisadas para a realização da filogenia molecular. LGA: Laboratório de Genética de Aves (UFSCar), AMNH: American Museum of Natural History, NMK: National Museums of Kenya, GB: GenBank. ✓: amplificado com sucesso, “-”: desconhecido, *: Grupo externo.

Código	Espécie	Subfamília	Fonte	Data	Tipo de amostra	Localidade	16S	FIB
MK39	<i>Platalea alba</i>	Plataleinae	NMK	-	Pele	-	✓	✓
M335	<i>Platalea ajaja</i>	Plataleinae	LGA	2007	Sangue	Brasil	✓	✓
-	<i>Platalea leucorodia</i>	Plataleinae	GB	-	-	-	NC_012772	
-	<i>Platalea minor</i>	Plataleinae	GB	-	-	-	NC_010962	
MK70	<i>Bostrychia hagedash</i>	Threskiornithinae	NMK	1959	Pele	-	✓	
PAC1657	<i>Eudocimus albus</i>	Threskiornithinae	AMNH	2006	Tecido	Cativeiro	✓	✓
M226	<i>Eudocimus ruber</i>	Threskiornithinae	LGA	2007	Sangue	Brasil	✓	✓
-	<i>Geronticus eremita</i>	Threskiornithinae	GB	-	-	-	EU144041	
-	<i>Nipponia nippon</i>	Threskiornithinae	GB	-	-	-	NC_008132	
CH57	<i>Plegadis chihi</i>	Threskiornithinae	LGA	2008	Sangue	Brasil	✓	✓
PRS1911	<i>Plegadis chihi</i>	Threskiornithinae	AMNH	1994	Tecido	USA	✓	✓
PAC1127	<i>Plegadis falcinellus</i>	Threskiornithinae	AMNH	2003	Tecido	USA	✓	✓
S803360	<i>Plegadis ridgwayi</i>	Threskiornithinae	AMNH	1958	Pele	Bolívia	✓	
S778593	<i>Pseudibis papillosa</i>	Threskiornithinae	AMNH	1954	Pele	Índia	✓	
TC	<i>Theristicus caudatus</i>	Threskiornithinae	LGA	-	Pele	Brasil	✓	✓
-	<i>Theristicus caerulescens</i>	Threskiornithinae	GB	-	-	-		DQ881962
PRS2838	<i>Theristicus melanopis</i>	Threskiornithinae	AMNH	2005	Tecido	Argentina	✓	✓
PRS2383	<i>Threskiornis aethiopicus</i>	Threskiornithinae	AMNH	-	Tecido	-	✓	
MKL12	<i>Threskiornis molucca</i>	Threskiornithinae	AMNH	1995	Tecido	Ilha Salomão	✓	✓
L218	<i>Mycteria americana</i> *	Ciconiidae	LGA	2007	Sangue	Brasil	✓	✓
T183d	<i>Ardea alba</i> *	Ardeidae	LGA	-	Sangue	Brasil	✓	✓

4.2. Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras de sangue pelo método de fenol-clorofórmio modificado (Sambrook et al., 1989). As amostras de tecido e pele foram extraídas usando os kits DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN) e NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL), com a adição de 30 µL de DTT (0,1g/ml) durante a digestão em sala separada livre de DNA. As amostras de fígado de *E. albus* foram extraídas pelo método de fenol-clorofórmio modificado (SAMBROOK et al., 1989) com a adição de SDS 1%.

4.3. Amplificação dos fragmentos

Para o estudo de filogenia molecular da família Threskiornithidae foram utilizados dois marcadores (um mitocondrial e um nuclear): Um fragmento de aproximadamente 600 pb do gene do 16S rRNA foi amplificado usando-se os *primers* Tr16SL (5'-CGAGCYRGGTGATAGCTGGTT-3') e Tr16SH (5'-TTACGCTACCTTCGCACGGT-3'). Esses *primers* foram desenhados no presente estudo, baseados nos *primers* universais 16L2a e 16H10 (HEDGES, 1994) e nos genomas mitocondriais de espécies da família Threskiornithidae e de famílias relacionadas disponíveis no GenBank. Para o íntron 7 do gene do β-fibrinogênio foram usados os *primers* FIB-BI7U (5'-GGAGAAAACAGGACAATGACAATTAC-3') e FIB-BI7L (5'-TCCCCAGTAGTATCTGCCATTAGGGTT-3'), desenvolvidos por Prychitko e Moore (1997), cujo uso resultou na amplificação de um fragmento de aproximadamente 1 Kb.

A amplificação dos dois genes foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando-se 25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada *primer*, 2

mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase. A temperatura de anelamento foi de 53°C para ambos os *primers*.

Como a amostra de pele de museu de *Platalea alba* somente produziu produto amplificado para o gene 16S rRNA, foram desenhados *primers* internos baseados nas sequências de outras espécies de Threskiornithidae obtidas no presente trabalho, visando amplificar fragmentos de aproximadamente 300 pb do gene do β-fibrinogênio. Os *primers* internos desenvolvidos foram: F206 (5'-TTACCAGCCAAATGTCCA-3'), F380 (5'-ATGGTGGCAGTGCTGAGG-3'), F613 (5'-GGGATKSTTTAGACTGG-3'), F819 (5'-GGCGATGGTCAATCTTT-3'), R260 (5'-AGTTTTACCTSCCCTTG-3'), R476 (5'-GCTACCTGTCTCTTTCCTC-3'), R681 (5'-GCAATATCAAYGCAATTT-3') R900 (5'-CCTGCCCCTGTACTGAA-3').

A amplificação foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando 25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada *primer*, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase. As temperaturas de anelamento e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram de: FIBU - R260 = 48°C (260 pb), F206 - R476= 50°C (271 pb), F380 - R681= 48°C (302 pb), F613 - R900= 50°C (288 pb), F819 – FIBL0 45°C (255 pb).

Para o estudo das espécies do gênero *Eudocimus* foram utilizados tanto marcadores mitocondriais (16S rRNA, Citocromo B, Citocromo Oxidase I) como nucleares (íntron 7 do gene do β-Fibrinogênio, íntron 11 da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, íntron 4 da Proteína Proteolípídica de Mielina, íntron 2 da Mioglobina). Os marcadores 16S rRNA e o íntron 7 do gene do β-Fibrinogênio foram amplificados seguindo o protocolo já descrito.

Um fragmento de aproximadamente 1.1 Kb foi amplificado para o gene mitocondrial do Citocromo B (CytB), usando-se os *primers* CytBF (5'-

AACATCTCWGCHTGATGAAA-3') e CytBR (5'-CTTCATTCTTTGGTTTACAAGAC-3'). Esses *primers* foram desenhados no presente estudo, baseando-se nos *primers* universais L14990 e H16065 (SLIKAS, 1997) e nos genomas mitocondriais de espécies da família Threskiornithidae e de famílias relacionadas disponíveis no GenBank. A amplificação foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando-se 0,25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase; e temperatura de anelamento de 58° C.

Um fragmento de 906 pb do gene Citocromo C Oxidase (COI) foi amplificado usando o par de *primers* COIF (5'-AAAGGACTACAGCCTAACGC-3') e COIR (5'-GATGTGAAGTATGCTCGGG), modificados a partir dos *primers* LTYr (Oliver Haddrath, com. pessoal) e COIH7557 (GONÇALVES, 2009). A amplificação foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando-se 0,25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada *primer*, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase; e temperatura de anelamento de 53° C.

Um fragmento de 470 pb d íntron 11 da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) foi amplificado usando-se os *primers* GadpL890 (5'-ACCTTTCATGCGGGTGCTGGCATTGC-3') e GapdH950 (5'-CATCAAGTCCACAACACGGTTGCTGTA-3'), desenvolvidos por Stone et al. (1985). A amplificação foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando 0,25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada *primer*, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase; e a temperatura de anelamento de 65° foi usada para a maioria das amostras, em alguns casos foi necessário aumentar para 69° C para eliminar bandas espúrias.

A amplificação de um fragmento de 379 pb do íntron 4 da Proteína proteolipídica de mielina (MPP) foi obtida usando-se os *primers* MPPF (5'-TACATCTACTTTAACACCTGGACCACCTG-3') e MPPR (5'-TTGCAGATGGAGAGCAGGTTGGAGCC-3'), desenvolvido por Schliess e Stoffel (1991). A amplificação foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando-se 0,25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada primer, 2,5 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase; e temperatura de anelamento de 62° C.

Um fragmento de 758 pb do íntron 2 da Mioglobina (Myo) foi amplificado usando-se os *primers* Myo 2 (5'-GCCACCAAGCACCAAGATCCC-3') (SLADE et al., 1993) e Myo 3F (5'-TTCAGCAAGGACCTTGATAATGACTT-3') (HESLEWOOD et al., 1998). A amplificação foi realizada num volume final de 12,5 µL, usando 0,25 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,4 µM de cada primer, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase; e temperatura de anelamento de 60° C.

4.4. Sequenciamento

Após a amplificação, 8µl do produto de PCR foram incubados com 1U de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (GE) e 10U de Exonuclease I (GE), a 37°C durante 1 hora, seguido de incubação à 80°C, por 15 minutos. Os produtos purificados foram diluídos para uma concentração aproximada de 50ng/µL e utilizados na reação de sequenciamento usando-se o *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit* (Perkin Elmer). As corridas foram feitas no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems), no centro de Estudos do Genoma Humano (USP/SP) e no sequenciador automático ABI Prism 3730 na unidade da UNESP de Jaboticabal.

4.5. Análise dos dados

4.5.1. Análises na família *Threskiornithidae*

As sequências obtidas foram editadas com a ajuda do programa BioEdit (HALL, 1999). O alinhamento das sequências foi feito pelo programa Clustal X2 (LARKIN et al., 2007). As análises de distância foram feitas baseando-se na média de substituições por sítio entre as sequências, usando-se o programa MEGA (KUMAR et al., 2004) e considerando-se todas as posições conforme “*Maximum Composite Likelihood method*” e usando a *p-distance*.

O número de sítios informativos para parcimônia e o número de sítios conservados foram obtidos no programa MEGA. Foi reconstruída a filogenia pelo método de distância (*Neighbor-joining*) usando-se um modelo de *Maximum Composite Likelihood*, com *bootstrap* com 1000 réplicas no programa MEGA. Esse modelo evolutivo estima com maior precisão os parâmetros de substituição em métodos de distância (TAMURA et al., 2004). As análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança foram feitas no programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 1998). A análise de Máxima Parcimônia foi feita usando-se um algoritmo de busca heurística, a partir de uma árvore inicial obtida por *stepwise addition* e usando-se o algoritmo *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR) para o *Branch-swapping* (SWOFFORD, 1998). O suporte dos nós foi estimado mediante 1000 réplicas de *bootstrap*. A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada com um algoritmo de busca heurística e uma árvore inicial obtida por *stepwise addition*. O algoritmo de TBR foi usado para o *Branch-swapping*. Para otimizar a análise foram usado os parâmetros do modelo de substituição nucleotídica selecionado, usando-se o programa jModeltest (POSADA, 2008) e seguindo o critério de *Akaike Information Criterion* (AIC) e *Bayesian Information Criterion* (BIC) para a inferência bayesiana. O suporte dos nós foi estimado mediante

1000 réplicas de *bootstrap*. O modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo programa jModeltest (POSADA, 2008) para o gene 16S rRNA foi TIM2+G (Posada 2003, gama= 0,2040), e TVM+G (POSADA 2003, gama= 1,9880) para o gene FIB-7.

A análise bayesiana foi realizada no programa Mr. Bayes 3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), usando-se 3.000.000 de gerações de cadeias de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC), com uma amostragem de 300 em quatro cadeias com duas repetições independentes. Para o cálculo das probabilidades e das árvores usou-se um *burn-in* de 9000. Em todas as análises usou-se como grupo externo as espécies *Mycteria americana* (Ciconiidae) e *Ardea alba* (Ardeidae).

Uma árvore de espécies (*species tree*) foi estimada pelo programa *BEAST (HELED; DRUMMOND, 2010), usando-se a informação dos dois locos simultaneamente. Nesta análise, foram incluídos somente os indivíduos que tinham dados dos dois marcadores seqüenciados (N=9). O programa *BEAST estimou a árvore de espécies diretamente dos dados e retirou as incertezas associadas às árvores dos genes, ao modelo de substituição nucleotídica e ao processo coalescente (HELED; DRUMMOND, 2010). Foi usado o algoritmo do *Yule process*. Foram usadas 10.000.000 gerações de cadeias de MCMC, com uma amostragem de 1.000 e um *burn-in* de 9.000.

Para se testar a monofilia das subfamílias foram usados os testes de permutação T-PTP (FAITH, 1991), o teste de Kishino e Hasegawa (1989), o teste de Shimodaira e Hasegawa (1999) e o teste de Templeton (1983). Em todos os casos foram comparadas as topologias obtidas restringindo ou não a monofilia recíproca.

Estimativas de tempos de divergência foram realizadas pelo programa BEAST 1.6.1 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007) para os dois conjuntos de dados e para os dois marcadores juntos. A análise foi realizada supondo um relógio molecular relaxado,

com uma distribuição log-normal. Foram usados três milhões de MCMC com uma amostragem de 1000. As taxas de evolução foram estimadas para cada gene usando-se dois pontos de calibração obtidos no *Time Tree* (HEDGES, et al. 2006). O primeiro ponto se refere à separação de Ardeidae e Ciconiidae, estimada em: 1) 75 milhões de anos por Brown et al. (2007), baseando-se em cinco genes nucleares; 2) 88 milhões de anos por Brown et al. (2008), baseando-se em 13 genes mitocondriais; e 3) 80.7 milhões de anos por Fain et al. (2007) baseando-se em quatro genes mitocondriais e três nucleares. O ponto de calibração adotado no presente estudo para uso no programa BEAST foi de 82 milhões de anos, com desvio padrão de 3.5 milhões de anos que engloba todas as datas da literatura. O segundo ponto se refere à separação entre Ardeidae e Threskiornithidae estimada em: 1) 69 milhões de anos por Brown et al. (2007); 2) 77 milhões de anos por Brown et al. (2008). O ponto de calibração no programa BEAST foi de 74 milhões de anos com desvio padrão de 2.5 milhões de anos.

4.5.2. *O caso Eudocimus*

As seqüências obtidas para a avaliação do estudo das espécies de *Eudocimus* foram editadas com ajuda do programa BioEdit (HALL, 1999). O alinhamento das seqüências foi feito pelo programa Clustal X2 (LARKIN et al., 2007). Nas seqüências heterozigotas detectadas na análise dos genes nucleares, os alelos foram identificados usando-se o algoritmo do programa Phase 2.1 (STEPHENS et al. 2001), implementado no programa DnaSP v5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). As análises de distância foram feitas baseando-se na média de substituições por sitio entres as seqüências e usando-se o programa MEGA (KUMAR et al., 2004). Uma rede de haplótipos foi construída utilizando-se o programa Network (BANDELT et al., 1999), mediante o algoritmo de *Median Joining*.

Diversas abordagens de delimitação de espécies baseadas na informação tipo multilocos foram realizadas. Uma análise de delimitação bayesiana de espécies foi realizada usando-se o software *Bayesian Phylogenetics and Phylogeography* BPP v.2.0 (YANG; RANNALA, 2010). Foram analisados os dados mitocondriais e nucleares separadamente. Foram analisadas 100.000 gerações de rjMCMC (*reversible-jump Markov chain Monte Carlo*), com frequência de amostragem de cinco e *burn-in* de 50.000. Foi usado o algoritmo 0 para o *fine-tuning* com um parâmetro $\epsilon=5$ (YANG; RANNALA, 2010). Os *priors* da distribuição do tamanho da população ancestral (θ) e a idade da raiz (τ_0) foram de (2,20) e de (2, 2000) respectivamente. Esta combinação é conservativa favorecendo modelos com poucas espécies, sendo a mais apropriada para o caso de *Eudocimus*. Este análise nos permitiu estimar a probabilidade posterior de cada bifurcação na árvore guia (probabilidade de especiação).

O nível de divergência genealógica foi avaliado mediante o *genealogical sorting index* (*gsi*) (CUMMINGS et al., 2008) para as duas espécies de *Eudocimus*. A análise foi feita baseando-se nas árvores de genes obtidas, usando-se os marcadores nucleares e os marcadores mitocondriais (as árvores foram obtidas usando-se a inferência Bayesiana no programa BEAST). O estatístico *gsi* quantifica o grau de ancestralidade (divergência genealógica) de um grupo na base de uma genealogia enraizada. O estatístico *gsi* possui valores desde 0 (total falta de divergência genealógica com os outros grupos) até 1 (total monofilia). Foi calculado o *gsi* para 100 árvores a partir dos quais foi obtido o *gsi_T*, o qual serve como medida da divergência genealógica. A significância desses parâmetros estatísticos foi obtida usando-se 1.000 permutações randômicas. Todas as análises foram feitas no *Genealogical Sorting Index web Server* (www.genealogicalsorting.org).

Para a delimitação das linhagens foi aplicada a metodologia descrita por Knowles; Carstens (2007), com a construção de uma árvore de genes para cada loco

usando-se o modelo HKY+gamma usando como base uma topologia de UPGMA no programa PAUP. A verossimilhança da árvore de espécie dado um conjunto de árvores de genes foi calculada usando-se o programa STEM (KUTBATKO et al., 2009). Foi avaliada a hipótese de *Eudocimus ruber* e *E. albus* serem linhagens diferentes assim como a hipótese de serem uma linhagem única. Foi usado o *likelihood ratio test* (LRT) com grau de liberdade um para se testar se a diferença no valor de verossimilhança das árvores de espécies foi significativa. Esta metodologia foi avaliada com os dados dos marcadores mitocondriais, dos marcadores nucleares, e com ambos os conjuntos de dados. O programa STEM assume que os locos evoluem seguindo um relógio molecular, pelo que foi usado um LRT para se testar esta hipótese no programa PAUP. Além disso, o programa STEM assume que o valor $\theta = 4N_e\mu$ é constante nas linhagens, sendo este valor informado pelo usuário. O valor de θ foi estimado para as subespécies usando-se o programa Migrate-n (BEERLI; FELSENSTEIN, 2001).

5. RESULTADOS

5.1. *Filogenia interespecífica*

Foram obtidas 16 sequências de um fragmento do gene mitocondrial 16S rRNA para 14 espécies da família Threskiornithidae e 10 sequências do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio para nove espécies da família (Tabela 1). A esse conjunto de dados foram adicionadas mais quatro sequências do gene 16S rRNA e uma sequência do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio, obtidas no GenBank (Tabela 1).

As 20 sequências do gene 16S rRNA variaram de 550 a 560 pb (sem os *primers*). O alinhamento gerado possui 589 sítios, sendo 360 conservados, 214 variáveis e 15 *indels*, totalizando 157 sítios parcimoniosamente informativos. As 13 sequências do gene FIB-7 apresentaram entre 893 e 920 pb, mas *Plegadis falcinellus* e *P. chihi*

(USA) apresentaram 949 pb, devido à uma duplicação de 29 pb. O alinhamento das sequências do FIB-7 resultou em 968 sítios, sendo 782 conservados, 180 variáveis e seis *indels* totalizando 92 sítios parcimoniosamente informativos. As distâncias genéticas para o gene 16S rRNA são mostradas na Tabela 2, as distâncias genéticas para o marcador FIB-7 são mostradas na Tabela 3.

As árvores obtidas pelos quatro distintos métodos filogenéticos para os dois genes (16S rRNA e FIB-7) resultaram em topologias similares, e, por isso, somente a árvore obtida pela análise Bayesiana foi apresentada para cada gene (Figura 2 e Figura 3). Por sua vez, essas árvores são congruentes entre si. A topologia obtida pelo programa *BEAST para as 10 espécies para as quais foram produzidos dados dos dois genes (Figura 4) também é congruente com as árvores anteriores.

Como no presente estudo não foi possível obter uma amostragem mais completa de espécies da família Threskiornithidae, os resultados relacionados a seguir devem ser considerados como preliminares. A família Threskiornithidae parece ser um grupo monofilético, fortemente sustentado por todas as nossas análises (Figura 2 a Figura 4). A subfamília Threskiornithinae, no entanto, se comportou como grupo parafilético. Árvores baseadas no gene 16S estão de acordo com hipótese de monofilia dos Plataleinae. Nessas árvores, entretanto, Plataleinae parece formar parte do clado que contém *Bostrychia hagedash*, *Geronticus eremita*, *Nipponia nippon*, *Pseudibis papillosa*, *Threskiornis aethiopicus* e *Threskiornis molucca*, e as espécies do gênero *Plegadis*, todas classificadas na subfamília Threskiornithinae. Este clado foi designado nesse trabalho como clado Velho e Novo Mundo. As relações dentro do clado Velho e Novo Mundo não puderam ser bem estabelecidas. Os gêneros *Eudocimus* e *Theristicus* formam um clado à parte, designado nesse trabalho como clado Novo Mundo. Nas árvores filogenéticas baseadas no gene FIB7 foram encontrados dois clados principais

fortemente suportados: 1) contendo dois grupos ((*Platalea ajaja*, *Platalea alba*), *Threskiornis molucca*), e dois indivíduos de *Plegadis chihi* relacionados à *P. falcinellus*, 2) incluindo (*E. ruber*, *E. albus*) e ((*Theristicus caudatus*, *T. melanopis*), *T. caerulescens*). Essas mesmas relações filogenéticas foram encontradas na árvore de espécies (Figura 4).

A natureza monofilética da subfamília Threskiornithinae não foi suportada por nenhuma das análises anteriores (Neighbor-Joining, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Análise Bayesiana e Estimativa Bayesiana de árvore de espécies). Além disso, todas as análises realizadas para testar a monofilia desta subfamília rejeitaram essa hipótese com valores significativos.

O valor médio de tempo ao ancestral comum mais recente (tMRCA) encontrado para a família Threskiornithidae foi de 35,97 milhões de anos baseado no gene 16S rRNA, com um intervalo de confiança (95% HPD) de 23,33 a 50,34. Esse valor baseado no gene FIB-7 foi de 40,10 milhões de anos, com um intervalo de confiança de 30,11 a 49,33. A análise incluindo os dados dos dois marcadores resultou em 39,49 de milhões de anos para o tMRCA dos Threskiornithidae, com intervalo de confiança de 29,4281 a 50,5218. Um cronograma obtido da análise somente com o FIB-7 mostra as datas de divergências dos clados fortemente sustentados (Figura 5).

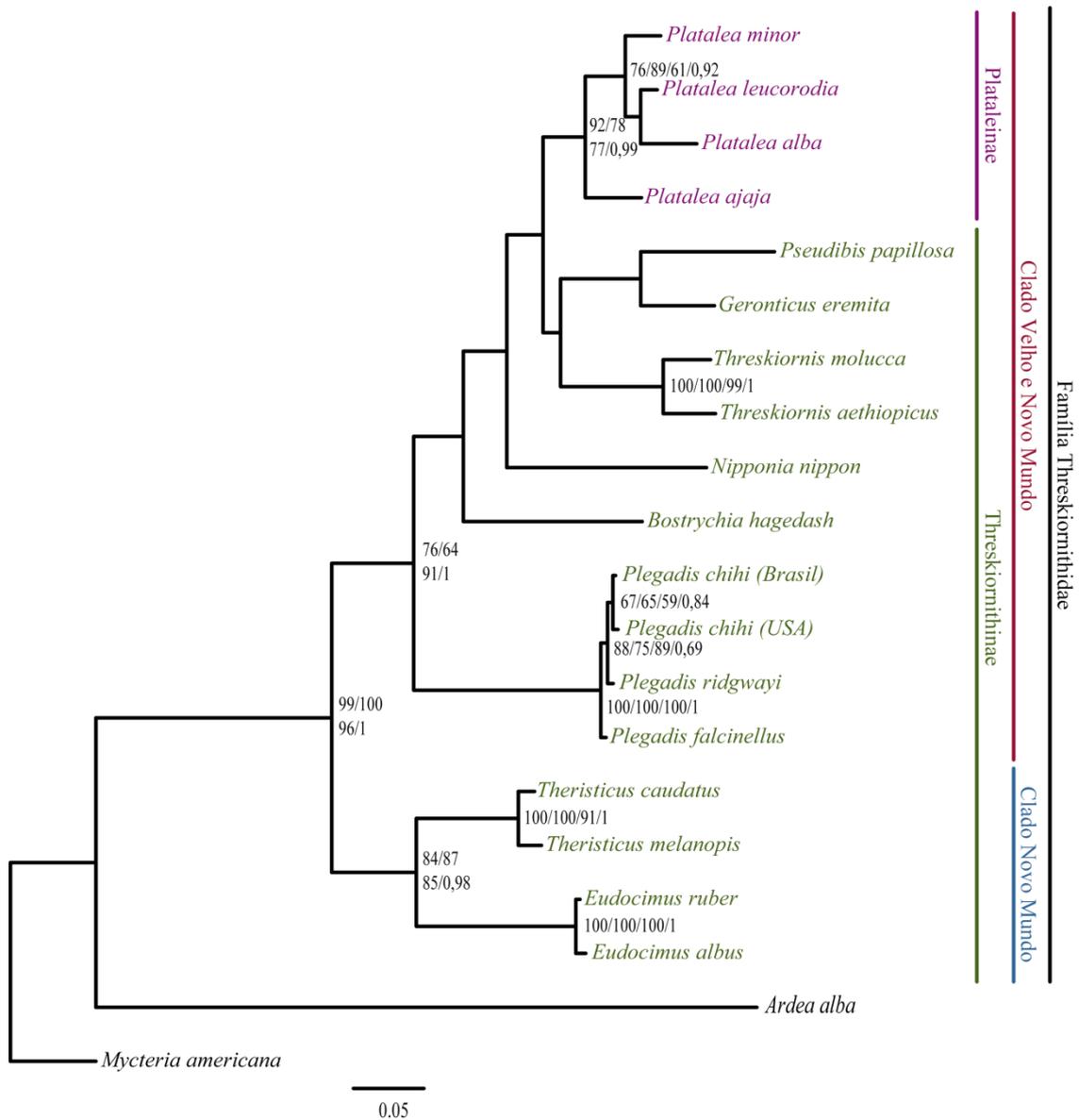


Figura 2 Árvore filogenética baseada em 589 pb do gene 16S rRNA obtida por inferência bayesiana. Os valores dos nós suportados por todas as análises são mostrados, indicando bootstrap para *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e valores de probabilidade posterior para a inferência bayesiana.

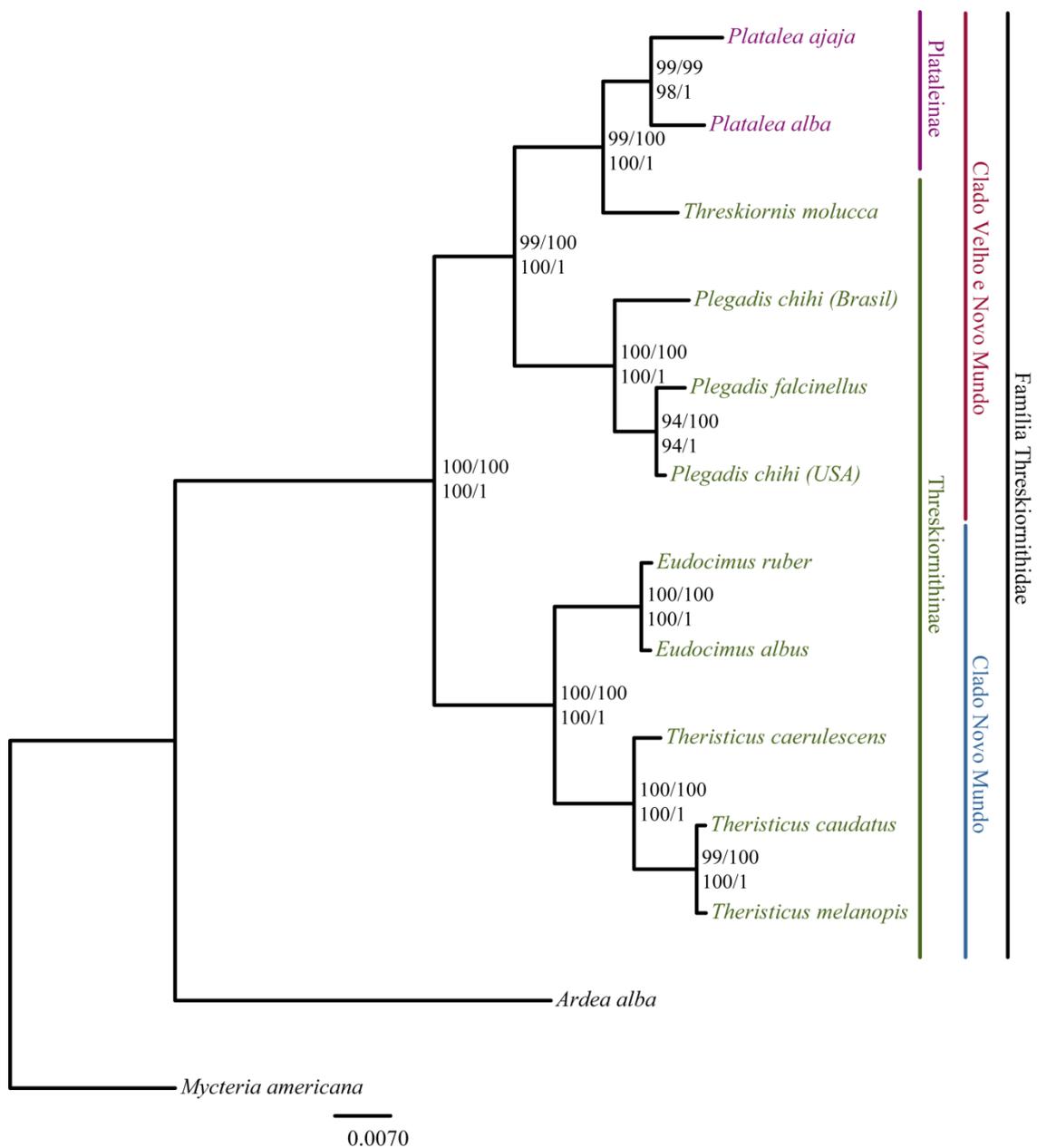


Figura 3 Árvore filogenética baseada em 968 pb do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio obtida por inferência bayesiana. Os valores nos nós indicam bootstrap para *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e valores de probabilidade posterior para a inferência bayesiana.

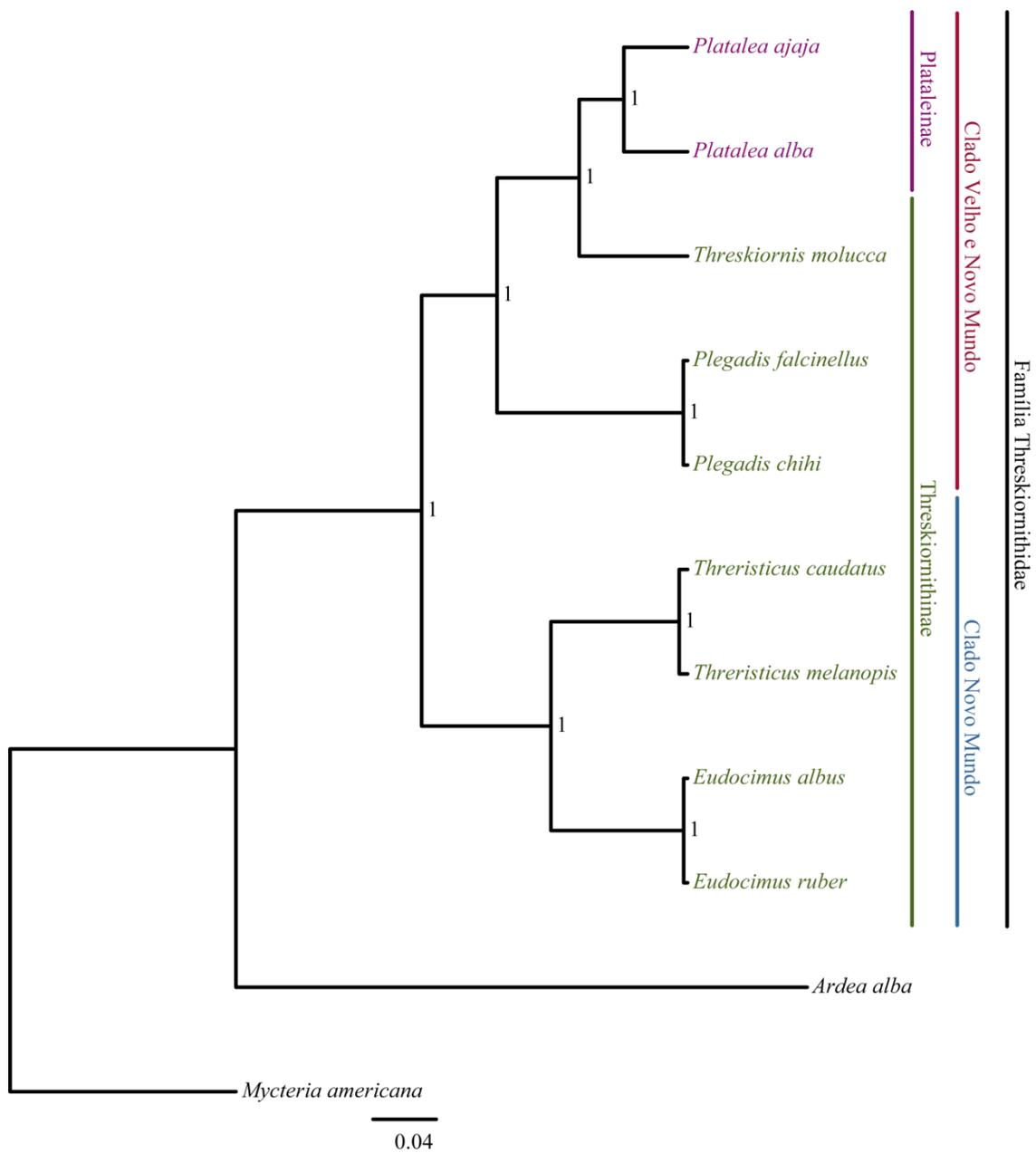


Figura 4 Árvore de espécies baseada em 589 pb do 16S rRNA e 968 pb do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio obtido no programa *BEAST. Os valores nos nós indicam probabilidade posterior.

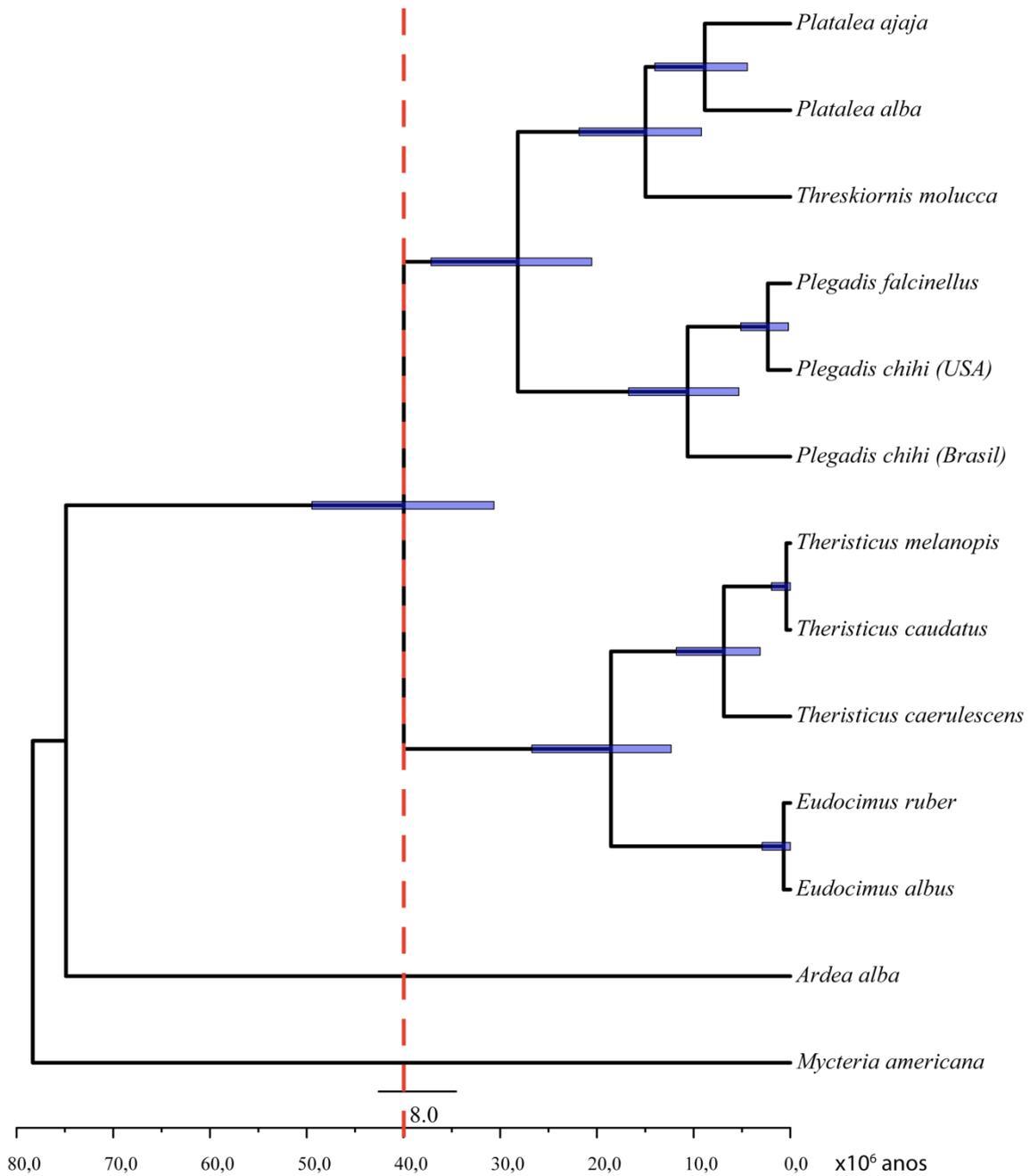


Figura 5 Cronograma baseado em 968 pb do íntron 7 do gene do β -fibrinogênio obtida pelo programa BEAST assumindo relógio molecular relaxado. Tempo em milhões de anos. Linha vermelha indica a divergência inicial dos Threskiornithidae. Barras representam o intervalo de confiança de 95% referentes aos valores de probabilidade posterior.

Tabela 2 Distâncias genéticas entre as distintas espécies usando o gene 16S rRNA. Os valores da metade inferior foram obtidos usando o modelo evolutivo. A metade superior foi obtida usando a *p-distance*.

	ER	EA	TC	TM	NN	PsP	GE	BH	ThM	ThA	PIM	PIL	PIAI	PIAj	PC	PC	PF	PR	MA	AA
<i>Eudocimus ruber</i>		0.005	0.104	0.104	0.131	0.112	0.136	0.123	0.143	0.144	0.134	0.123	0.121	0.123	0.119	0.121	0.116	0.119	0.147	0.182
<i>Eudocimus albus</i>	0.005		0.109	0.109	0.129	0.117	0.14	0.123	0.141	0.146	0.139	0.128	0.123	0.129	0.125	0.127	0.121	0.125	0.148	0.185
<i>Theristicus caudatus</i>	0.115	0.122		0.022	0.134	0.097	0.143	0.139	0.137	0.14	0.132	0.128	0.121	0.136	0.13	0.132	0.126	0.13	0.151	0.185
<i>Theristicus melanopis</i>	0.115	0.122	0.022		0.143	0.112	0.15	0.14	0.137	0.143	0.141	0.142	0.133	0.143	0.133	0.135	0.13	0.133	0.145	0.178
<i>Nipponia nippon</i>	0.152	0.149	0.155	0.167		0.105	0.117	0.116	0.114	0.119	0.114	0.108	0.105	0.107	0.112	0.113	0.11	0.112	0.158	0.191
<i>Pseudibis papillosa</i>	0.127	0.134	0.107	0.126	0.117		0.069	0.099	0.112	0.099	0.079	0.079	0.079	0.087	0.094	0.097	0.09	0.092	0.138	0.166
<i>Geronticus eremita</i>	0.158	0.164	0.165	0.175	0.133	0.074		0.115	0.099	0.097	0.095	0.086	0.099	0.086	0.119	0.12	0.115	0.119	0.159	0.187
<i>Bostrychia hagedash</i>	0.142	0.142	0.16	0.162	0.13	0.11	0.129		0.12	0.129	0.118	0.107	0.109	0.107	0.131	0.129	0.128	0.131	0.155	0.177
<i>Threskiornis molucca</i>	0.167	0.164	0.156	0.157	0.127	0.125	0.107	0.134		0.049	0.098	0.098	0.096	0.089	0.122	0.123	0.118	0.122	0.133	0.19
<i>Threskiornis aethiopicus</i>	0.168	0.171	0.161	0.166	0.134	0.109	0.105	0.145	0.051		0.102	0.091	0.082	0.091	0.132	0.134	0.129	0.132	0.142	0.199
<i>Platalea minor</i>	0.154	0.162	0.15	0.162	0.128	0.085	0.104	0.133	0.107	0.111		0.031	0.049	0.055	0.124	0.126	0.121	0.124	0.15	0.192
<i>Platalea leucorodia</i>	0.14	0.147	0.145	0.163	0.12	0.085	0.092	0.119	0.106	0.097	0.032		0.04	0.055	0.118	0.117	0.115	0.118	0.15	0.18
<i>Platalea alba</i>	0.137	0.14	0.136	0.152	0.116	0.085	0.108	0.122	0.104	0.087	0.051	0.041		0.069	0.128	0.129	0.124	0.128	0.132	0.177
<i>Platalea ajaja</i>	0.141	0.148	0.154	0.163	0.118	0.094	0.093	0.119	0.096	0.098	0.057	0.057	0.073		0.12	0.122	0.117	0.12	0.157	0.194
<i>Plegadis chihi (Brasil)</i>	0.136	0.144	0.147	0.153	0.127	0.104	0.135	0.15	0.137	0.152	0.141	0.133	0.145	0.136		0.002	0.005	0.004	0.16	0.197
<i>Plegadis chihi (EUA)</i>	0.138	0.146	0.15	0.155	0.129	0.107	0.137	0.148	0.14	0.154	0.144	0.131	0.147	0.139	0.002		0.007	0.005	0.162	0.197
<i>Plegadis falcinellus</i>	0.132	0.139	0.143	0.148	0.125	0.099	0.13	0.146	0.133	0.147	0.137	0.129	0.141	0.132	0.005	0.007		0.005	0.16	0.196
<i>Plegadis ridgwayi</i>	0.136	0.144	0.148	0.153	0.127	0.101	0.135	0.151	0.137	0.152	0.141	0.133	0.145	0.137	0.004	0.005	0.005		0.164	0.199
<i>Mycteria americana</i>	0.173	0.176	0.177	0.17	0.189	0.161	0.191	0.185	0.156	0.168	0.179	0.177	0.153	0.187	0.19	0.192	0.191	0.196		0.144
<i>Ardea alba</i>	0.229	0.235	0.229	0.219	0.248	0.205	0.238	0.227	0.243	0.256	0.249	0.23	0.224	0.249	0.257	0.257	0.255	0.259	0.174	

Tabela 3 Distâncias genéticas entre as distintas espécies usando o gene FIB-7. Os valores da metade inferior foram obtidos usando o modelo evolutivo. A metade superior foi obtida usando a *p-distance*.

	ER	EA	Tca	TC	TM	PIAj	PIAI	ThM	PC	PF	PC	AA	MA
<i>Eudocimus ruber</i>		0.000	0.021	0.025	0.025	0.053	0.05	0.051	0.052	0.047	0.045	0.093	0.088
<i>Eudocimus albus</i>	0.003		0.02	0.024	0.024	0.051	0.048	0.048	0.052	0.047	0.045	0.093	0.086
<i>Theristicus caerulescens</i>	0.021	0.02		0.009	0.009	0.053	0.05	0.05	0.051	0.051	0.049	0.096	0.088
<i>Theristicus caudatus</i>	0.026	0.025	0.009		0	0.057	0.054	0.054	0.056	0.055	0.053	0.1	0.092
<i>Theristicus melanopis</i>	0.026	0.025	0.009	0.00		0.057	0.054	0.054	0.056	0.055	0.053	0.1	0.092
<i>Platalea ajaja</i>	0.055	0.053	0.055	0.06	0.06		0.014	0.021	0.044	0.04	0.038	0.101	0.098
<i>Platalea alba</i>	0.052	0.05	0.052	0.057	0.057	0.014		0.018	0.041	0.037	0.034	0.098	0.094
<i>Threskiornis molucca</i>	0.053	0.05	0.052	0.056	0.056	0.022	0.018		0.037	0.034	0.032	0.096	0.093
<i>Plegadis chihi (Brasil)</i>	0.055	0.054	0.053	0.059	0.059	0.045	0.042	0.038		0.015	0.012	0.101	0.089
<i>Plegadis falcinellus</i>	0.049	0.049	0.053	0.058	0.058	0.042	0.038	0.035	0.015		0.002	0.095	0.089
<i>Plegadis chihi (EUA)</i>	0.047	0.046	0.051	0.055	0.055	0.039	0.035	0.033	0.012	0.002		0.093	0.087
<i>Ardea alba</i>	0.1	0.1	0.104	0.108	0.108	0.11	0.106	0.104	0.109	0.103	0.1		0.079
<i>Mycteria americana</i>	0.094	0.093	0.094	0.099	0.099	0.106	0.101	0.1	0.096	0.095	0.093	0.084	

5. 2. O caso *Eudocimus*

As sequências obtidas para os sete marcadores, sendo três deles mitocondriais e quatro nucleares, para as amostras de *Eudocimus albus* e *E. ruber* estão mostradas na Tabela 4. Os haplótipos detectados nas duas espécies e os alelos reconstruídos estão apresentados na Tabela 5. Os haplótipos dos três marcadores mitocondriais não são compartilhados pelas duas espécies. As redes de haplótipos mitocondriais obtidas com essas sequências apresentam as duas espécies em grupos separados (Figura 6). A rede de haplótipos para o COI não foi apresentada por ocorreram apenas dois haplótipos, cada um deles fixado numa espécie. Os dados do gene 16S rRNA mostram as duas espécies separadas por três passos mutacionais e só um passo entre os haplótipos de uma mesma espécie. A distância genética interespecífica variou de 0,5% a 0,9%. A rede de haplótipos formada a partir das sequências do gene CytB mostra as duas espécies em clados separados por sete passos mutacionais, com distância genética de 0,8% a 1%. Segundo os dados do gene COI, os haplótipos são exclusivos de cada espécie e estão separados por quatro passos mutacionais, com uma distancia genética de 0,6% entre eles.

As sequências obtidas para três dos marcadores nucleares (FIB-7, GADPH e Myo) mostraram alelos compartilhados pelas duas espécies (Figura 7 A, D, C). O marcador nuclear MPP não apresentou alelos compartilhados entre as espécies, mas mostrou-se pouco variável e apresentou só um único haplótipo em *E. ruber*. A rede de haplótipos construída com os dados desse marcador mostrou uma separação mínima entre as espécies, com um único passo mutacional (Figura 7 B).

Tabela 4 Descrição das amostras e das seqüências analisadas para a delimitação de espécies no gênero *Eudocimus*. “✓”: amplificado com sucesso. “-” : não se obteve produto na reação de amplificação.

Código	Espécie	16S	CYTB	COI	FIB7	MPP	GADPH	MYO
M129	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M143	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M159	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M193	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M226	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M241	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M272	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M337	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M376	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
M425	<i>Eudocimus ruber</i>	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
EA172	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EA175	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EA177	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓
EA180	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
EA189	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EA200	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EA206	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EA210	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
EA225	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EA227	<i>Eudocimus albus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TC	<i>Theristicus caudatus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabela 5 Haplótipos recuperados a partir das sequências analisadas para a delimitação de espécies no gênero *Eudocimus*. “-” : não se obteve produto na reação de amplificação.

Código	Espécie	16S	CYTB	COI	FIB7	MPP	GADPH	MYO
M129	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1/2	Hap 1
M143	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 2	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1/3	Hap 1
M159	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 3	Hap 2	Hap 1	Hap 1/2	Hap 1	Hap 3/9	Hap 1
M193	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 3	Hap 1	Hap 4/5	Hap 1
M226	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 4	Hap 1	Hap 6/7	Hap 1/2
M241	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 2/8	Hap 1/3
M272	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 3	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 7/10	Hap 1
M337	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 4	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 2/9	Hap 4
M376	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1	Hap 1/9	-
M425	<i>Eudocimus ruber</i>	Hap 4	Hap 1	Hap 1	Hap 1	-	-	Hap 5
EA172	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 5	Hap 2	Hap 4/5	Hap 2	Hap 11/12	Hap 1/5
EA175	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 6	Hap 2	Hap 1/4	Hap 2	Hap 13	Hap 1/2
EA177	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 6	-	Hap 4	Hap 2	Hap 14/15	Hap 6
EA180	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 5	Hap 2	Hap 4/6	Hap 2	Hap 16/17	-
EA189	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 5	Hap 2	Hap 4	Hap 3	Hap 18/19	Hap 3/5
EA200	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 5	Hap 2	Hap 7	Hap 3	Hap 20/21	Hap 1/6
EA206	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 6	Hap 6	Hap 2	Hap 8	Hap 2	Hap 5/22	Hap 2/6
EA210	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 7	Hap 2	Hap 4/6	Hap 2	-	Hap 1/6
EA225	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 8	Hap 2	Hap 3/4	Hap 2/3	Hap 17	Hap 1/6
EA227	<i>Eudocimus albus</i>	Hap 5	Hap 8	Hap 2	Hap 1/4	Hap 2/3	Hap 23	Hap 1/7

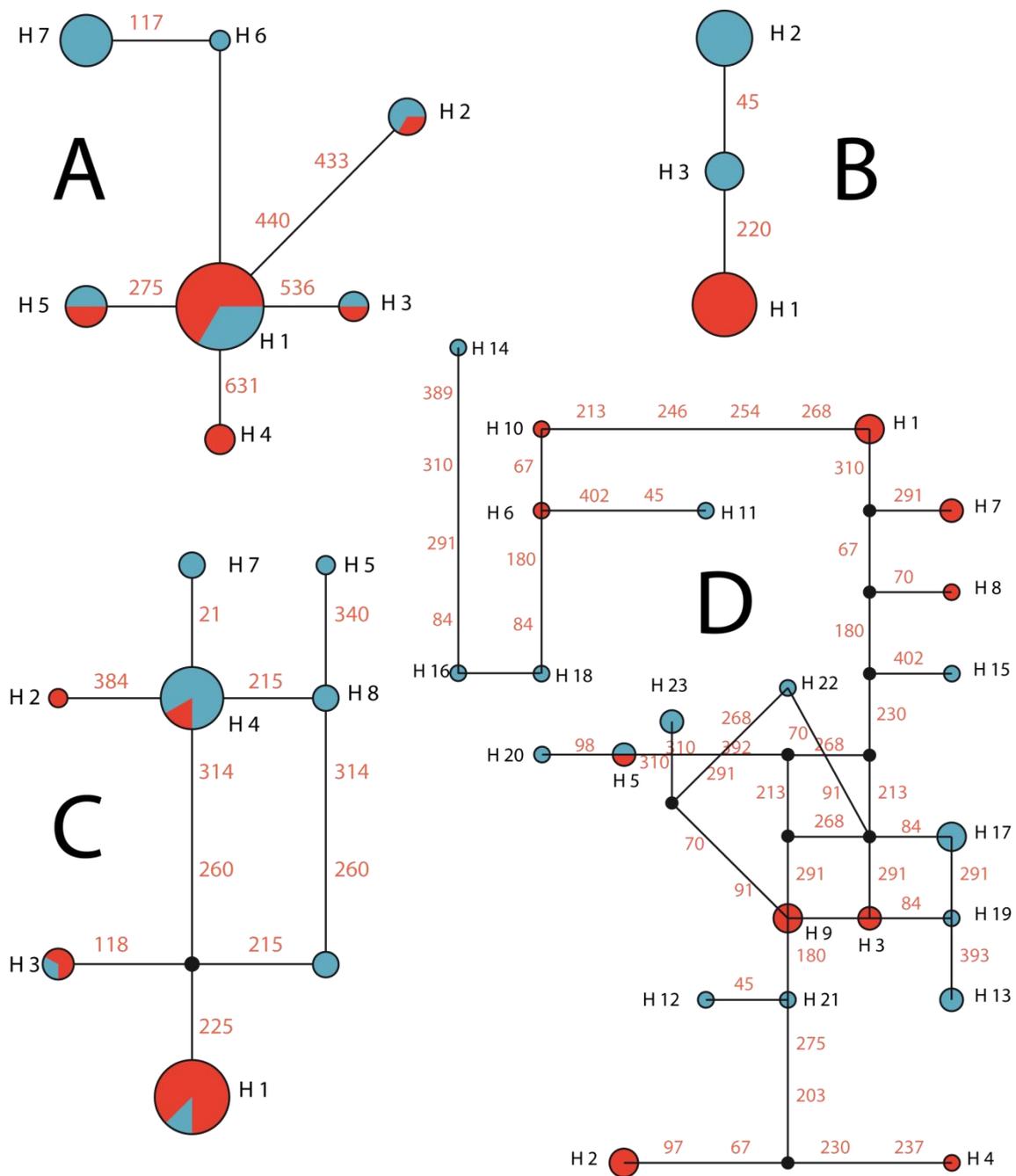


Figura 7 Redes de haplótipos obtidas com os dados dos marcadores nucleares. A) FIB-7; B) MPP; C) Myo; D) GADPH. Vermelho: *Eudocimus ruber*; Azul: *Eudocimus albus*.

A delimitação Bayesiana de espécie usando o programa BPP resultou em valores para a probabilidade de especiação de 1.0 para os dois conjuntos de dados (mitocondrial e nuclear). Uma probabilidade de especiação ≥ 0.95 é indicativa de suporte forte para o evento de especiação. A análise estatística *gsi* resultou num valor de *gsi_T* significativa de 1 para as árvores determinadas com os dados dos marcadores mitocondriais. O *gsi_T* obtido a partir dos dados nucleares foi de 0,5628308 para *Eudocimus albus* (P=0,0001) e 0,690499 para *E. ruber* (P=0,0001), sendo ambos os valores significantes estatisticamente.

A hipótese do relógio molecular não foi rejeitada pelo teste LRT para todos os marcadores, sugerindo que as taxas de substituição dos genes não variaram significativamente entre os ramos. A estimativa média de θ pelo programa Migrate-n foi de 0,002 e esse valor não variou entre as estimativas que consideraram *Eudocimus* como uma ou como duas espécies.

A delimitação de linhagens foi avaliada usando-se a metodologia desenvolvida por Knowles e Carstens (2007). A hipótese de *Eudocimus albus* e *E. ruber* serem duas linhagens diferentes apresentou valores maiores de lnL do que a hipótese deles serem uma única linhagem. Para verificar se a diferença era significativa, calculou-se o LRT da diferença entre os valores de verossimilhança e ele não foi significativo (Tabela 6), não podendo ser rejeitada nenhuma das hipóteses.

Tabela 6 Valores de verossimilhança (lnL) encontrados na delimitação de linhagens usando-se a metodologia desenvolvida por Knowles e Carstens (2007). O valor k indica o numero de espécies na arvore de espécies (incluindo *Theristicus caudatus*). M: valor para os genes mitocondriais, N: genes nucleares e N+M: valores para o conjunto de dados.

	lnL	k	LRT	p
M	174.378815	3	1.424682	0.232635
	175.091156	2		
N	723.484863	3	0.05127	0.820868
	723.510498	2		
N+M	754.107056	3	1.40869	0.235274
	754.811401	2		

6. DISCUSSÃO

6.1. *Filogenia interespecífica*

O presente trabalho representa o primeiro estudo baseado em seqüências de DNA mitocondrial e nuclear mais representativo da família Threskiornithidae. Na análise filogenética baseada no gene 16S rRNA foram incluídas 53% das espécies e 69% dos gêneros da família. Na análise baseada no gene FIB-7 foram utilizadas 31% das espécies e 38% dos gêneros da família.

A família Threskiornithidae tem sido amplamente aceita como um grupo natural e a sua monofilia nunca foi seriamente questionada. Apesar de a amostragem de espécies da família e dos grupos próximos não estar completa no presente estudo, não foram encontradas evidências de que a família Threskiornithidae não seja monofilética.

A divisão proposta em duas subfamílias, entretanto, não foi corroborada. No nosso estudo a subfamília Plataleinae aparece como grupo monofilético, mas parece ser grupo irmão de um clado que contém espécies do grupo Threskiornithinae e este, por sua vez, parece ser parafilético. Essa disposição contraria o proposto pela taxonomia tradicional para as subfamílias e a separação em duas famílias (Threskiornithidae e Plataleidae), segundo Livezey e Zusi (2007). Estudos prévios, entretanto, já apontavam Threskiornithinae como grupo parafilético (hibridação DNA-DNA: Sibley e Ahlquist (1990) ; seqüências mitocondriais: Fleischer e McIntosh (2001); morfologia: Ferreira (2007); seqüências mitocondriais: (CHESSER et al., 2010b). (Figura 8).

Uma das primeiras hipóteses sobre as relações taxonômicas entre espécies da família Threskiornithidae foi proposta por Sibley e Ahlquist (1990) (Figura 8A), baseando-se em dados de hibridação DNA-DNA. Esse trabalho foi feito com 11 espécies de oito gêneros. A árvore obtida por esses autores sugeriu relação de grupos

irmãos entre *Platalea* e *Threskiornis* e o seu agrupamento dentro dos outros Threskiornithinae. Nesse trabalho, Sibley e Ahlquist (1990) também encontraram uma divisão em dois clados: um clado do Novo Mundo e outro do Velho Mundo.

Fleischer e McIntosh (2001) mostraram uma árvore de parcimônia construída por outros autores com dados do gene 12S rRNA. Nessa árvore, uma espécie pertencente ao gênero *Platalea* (não designado) está relacionada às espécies de íbis do Velho Mundo, já as espécies de *Plegadis* formaram um clado que é irmão de um grupo que inclui *Eudocimus*, *Apteribis* e espécies de íbis do Novo Mundo (Figura 8B).

Ferreira (2007) também encontrou o grupo dos Plataleinae como monofilético e o dos Threskiornithinae como parafilético. A autora fez sua análise baseando-se em caracteres osteológicos cranianos e observou a presença de dois grupos dentro desta família: o primeiro incluindo *Phimosus*, *Mesembrinibis*, *Eudocimus*, *Theristicus caerulescens*, *Geronticus* e *Pseudibis* e o segundo englobando *Bostrychia carunculata*, *Theristicus melanopis*, *Lophotibis*, *Cercibis* e *Platalea* (Figura 8C).

Chesser et al. (2010b) usaram dois marcadores mitocondriais (CytB e ND2) para resolver a filogenia da subfamília Plataleinae. Os autores encontraram forte suporte para a monofilia da subfamília. Nesse estudo foi usado um conjunto limitado de espécies da família Threskiornithidae (três) e a separação nas duas subfamílias (Plataleinae e Threskiornithinae) também não foi suportada (Figura 8D).

Os colhereiros (gênero *Platalea*) foram inicialmente descritos como pertencentes à família Plataleidae (BONAPARTE, 1838), mas depois foram incluídos junto com Threskiornithinae (POCHE, 1904), na família Threskiornithidae (RICHMOND, 1917). O nome dessa família deveria passar a ser Plataleidae porque espécies desse grupo foram as primeiras a serem descritas, mas foram mantidos os nomes Threskiornithidae e Plataleinae.

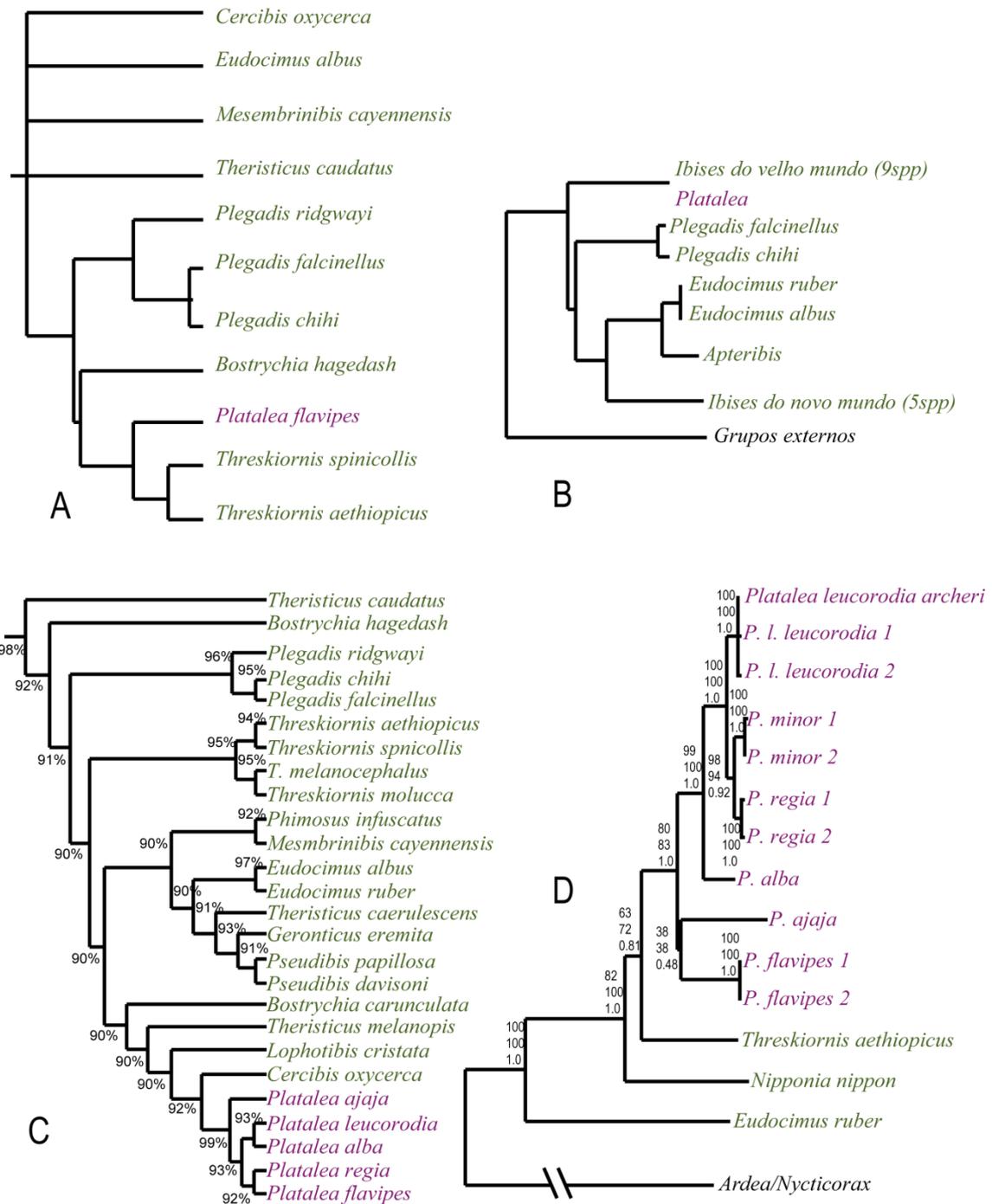


Figura 8. Filogenias de Threskiornithidae: a) Sibley e Ahlquist (1990); b) Fleischer e McIntosh (2001); c) Ferreira (2007); d) Chesser et al. (2010b). roxo: Plataleinae; verde: Threskiornithidae.

Nossos resultados para a família Threskiornithidae também mostram dois grupos principais reciprocamente monofiléticos. O primeiro foi fortemente sustentado em todas as nossas análises, agrupando gêneros endêmicos do continente americano (“clado Novo Mundo”, Figuras Figura 2 Figura 3 e Figura 4). As espécies restantes foram agrupadas com sustentação de mediana à forte num clado que inclui gêneros endêmicos do Velho mundo assim como gêneros com espécies tanto do Novo como do Velho mundo (“clado Velho e Novo Mundo”). Essa subdivisão está de acordo com a hipótese de Sibley e Ahlquist (1990) e rejeita a proposta por Ferreira (2007). Dentro do “clado Velho e Novo Mundo” observa-se as espécies do gênero *Plegadis* (Figuras Figura 2 Figura 3 e Figura 4), uma posição diferente da proposta por Fleischer e McIntosh (2001; Figura 8B). A subdivisão atual da família nas subfamílias Threskiornithinae e Plataleinae deveria ser modificada, portanto, visando restaurar as monofilias dos grupos. No entanto, é necessário que um estudo com amostragem de espécies mais completa seja realizado para permitir avaliar com cuidado esse problema.

O padrão da distribuição de espécies em dois clados: um deles incluindo só gêneros com representantes do Novo Mundo e o outro com espécies de gêneros distribuídos somente no Velho Mundo e no Novo e Velho Mundos foi também observado em outras famílias de aves (CRACRAFT, 2001; ERICSON et al., 2002). Este padrão pode ser explicado pela divisão inicial Gondwânica e uma colonização posterior por espécies do Velho Mundo no Novo Mundo. Esse tipo de distribuição consistente com origem Gondwânica com posterior diversificação por vicariância já foi observado em clados de aves nas ordens dos Gruiformes, Caprimulgiformes, Apodiformes e Passeriformes, (CRACRAFT, 2001). A divergência inicial da família Threskiornithidae parece ter ocorrido antes da separação entre o continente americano e a Antártica, sendo que alguma conexão pode ter existido entre os dois continentes até cerca de 30 a 35

milhões de anos atrás (COX; MOORE, 2010). As nossas estimativas do tMRCA foram de 35 a 40 milhões de anos para a família Threskiornithidae suportando esta hipótese.

6. 2. *Controvérsias nas designações de gêneros*

Entre as principais controvérsias taxonômicas da família Threskiornithidae está o caso da espécie atualmente denominada *Platalea ajaja* a qual foi inicialmente colocada no gênero *Ajaja* (PINTO, 1938; HELLMAYR; CONOVER, 1948; AOU, 1998), sendo depois incluída no gênero *Platalea* (HANCOCK et al., 1992; BANKS et al., 2002). No presente estudo baseado no gene 16S rRNA, *Platalea ajaja* mostrou-se basal em relação às três espécies do gênero *Platalea* incluídas na análise (Figura 2). Além disso, *Platalea ajaja* se diferenciou bem das demais espécies do gênero: a distância genética entre *Platalea ajaja* e as outras espécies do gênero foi de 0,06-0,07 e a distância entre as demais espécies de *Platalea* variou de 0,03-0,05 (Tabela 2). Esse resultado está concordante com os dados morfológicos, pois *Platalea ajaja* apresenta cabeça desnudada o que a diferencia das outras espécies incluídas no estudo. As distâncias encontradas entre espécies do mesmo gênero da família Threskiornithidae no geral foram de 0,01-0,05 e a distâncias entre espécies de diferentes gêneros variou de 0,09-0,18 (Tabela 2). O resultado encontrado nesse estudo foi similar ao encontrado por Chesser et al.(2010b). A adição futura de duas espécies faltantes em nosso estudo, em especial de *Platalea flavipes* que fica às vezes isolada no gênero monoespecífico *Platibis* e é considerada como espécie irmã de *Platalea ajaja* por Chesser et al. (2010b) – apesar do baixo valor de suporte - (Figura 8D), poderá ajudar a resolver esta controvérsia sobre a validade taxonômicas desses gêneros monoespecíficos.

Outro caso interessante obtido na análise de FIB-7 (Figura 3) foi o apresentado pela espécie *Theristicus caerulescens*, classificada em gênero monotípico *Harpiprion* (Pinto, 1938; Hellmayr; Conover, 1948; Hancock et al., 1992), mas geralmente incluída

no gênero *Theristicus* pela maioria dos autores que seguem a Steinbacher (1979), apesar desta espécie ser morfológicamente muito diferente das outras espécies do gênero. Nessa análise pudemos observar *Theristicus caerulescens* como espécie basal a *T. melanopis* e a *T. caudatus*, compartilhando o mesmo haplótipo estas duas últimas, que são consideradas como co-específicas por Hellmayr e Conover (1948) e Hancock et al. (1992). A distância genética entre *Theristicus caerulescens* e as outras duas espécies foi de 0,009, um valor baixo quando comparado ao observado para espécies de diferentes gêneros (0,021 a 0,060) (Tabela 3), o que não suportaria a classificação dessas espécies em gêneros diferentes. Nosso resultado está de acordo com Hancock et al. (1992) que sugeriram que não existem dados que suportem essa divisão em gêneros diferentes. *Theristicus caerulescens*, *T. caudatus* e *T. melanopis* foram consideradas como superespécies por Steinbacher (1979), Fjeldså e Krabbe (1990), Matheu e Del Hoyo (1992), hipótese coerente com os nossos resultados.

Nas nossas análises foram incluídos dois indivíduos de *Plegadis chihi* de duas localidades distantes (EUA e Brasil) representando os extremos da distribuição da espécie. Nas análises baseadas no gene 16S rRNA (Figura 2) estes dois indivíduos se agruparam (mas com baixo suporte), tendo como grupo irmão *P. ridgwayi* e *P. falcinellus* resultou possível grupo irmão desse clado (todos esses nós possuem baixo suporte). Na análise com o marcador FIB-7 (Figura 3) o indivíduo de *P. chihi* dos EUA se mostrou mais proximamente relacionado com *P. falcinellus*, compartilhando uma duplicação de 29 pb e se diferenciando do *P. chihi* do Brasil. Ainda não há análises de distribuição geográfica da diversidade genética de *P. chihi* e de *P. falcinellus*, mas o resultado encontrado com o FIB-7 indica que *P. chihi* pode apresentar estruturação genética. *P. ridgwayi* também foi considerada como superespécie junto com *P. chihi* e *P. falcinellus* (SHORT, 1975). Na análise baseada no gene 16S rRNA esta espécie

mostrou-se estreitamente relacionada a *P. chihi*. *Plegadis falcinellus* e *P. chihi* foram consideradas como superespécies por Steinbacher (1979) e Sibley e Monroe (1990) e como co-específicas por Palmer (1962). Estas espécies têm sido reportadas se reproduzindo em simpatria em Louisiana, EUA (AOU, 1998). Seria interessante investigar mais indivíduos desse trio de espécies, especialmente de *P. falcinellus* que ocorre tanto na América, Europa, África, Ásia como Austrália, para compreender melhor as relações evolutivas dentro deste gênero.

6. 3. O Caso *Eudocimus*

Os casos de hibridização entre espécies de aves em populações naturais representam um grande problema quando se pretende definir o *status* taxonômico de espécies, superespécies ou subespécies. Nessas avaliações, é importante se considerar todas as informações biológicas disponíveis. Ao nosso conhecimento, não foram produzidos estudos genéticos anteriores a esse estudo que contribuam para a definição do caso *Eudocimus* na família Threskiornithidae. O caso de *Eudocimus ruber* e *E. albus* é uma das maiores controvérsias na taxonomia do grupo, pois são consideradas como espécies separadas, apesar de mostrarem similaridades no comportamento de forrageamento e de reprodução, além dos registros de hibridização na natureza.

Segundo nossas análises baseadas nos genes mitocondriais, as duas espécies de *Eudocimus* se comportam como dois grupos separados e sem evidência de hibridização. Pelas análises do gene 16S rRNA, as duas espécies de *Eudocimus* apresentaram distância genética de 0,5% a 0,9% entre elas, formando dois grupos separados e sem haplótipos compartilhados. Esta distância foi comparável às encontradas entre outras espécies pertencentes ao mesmo gênero na nossa análise filogenética da família Threskiornithidae. É importante considerar que a maioria dos gêneros da família apresenta problemas de complexos de espécies. Por exemplo, as duas espécies de

Theristicus apresentaram distância de 2% entre elas e as três espécies do gênero *Plegadis* apresentaram distância de 0,5-0,7% entre elas. Nos gêneros *Threskiornis* e *Platalea* as distâncias interespecíficas são maiores (5% e de 3% a 5%, respectivamente) (Tabela 2). Aliabadian et al. (2009) avaliaram distâncias genéticas entre espécies de aves do mesmo gênero (708 sequências de 498 espécies pertencentes a 270 gêneros) e as comparou com as distâncias encontradas entre espécies de aves parapátricas (24 pares de espécies). Esses autores encontraram para o gene 16S rRNA distância genética intragenérica média de 3,13%, distância genética média entre as espécies parapátricas de 1,30% e não encontraram diferença significativa para os valores de distância genética entre espécies que hibridizavam ou não. Os nossos valores (0,5-0,9%) são inferiores aos encontrados por Aliabadian et al. (2009). A distância genética interespecífica encontrada no presente estudo baseando-se no gene Citocromo B variou de 0,8% a 1%, valores esses inferiores aos encontrados para o mesmo marcador por Aliabadian et al. (2009) para espécies de um mesmo gênero (3%). O valor de distância genética interespecífica calculado com os dados do gene COI no presente estudo foi de 0,6%, valor esse inferior ao encontrado para este marcador por Aliabadian et al. (2009) para espécies parapátricas de mesmo gênero (3,64%). Aliabadian et al. (2009) menciona também uma distancia de 0.9% para *Plegadis falcinellus* e *P. chihi* para o gene COI. Uma das possíveis razões para os valores encontrados no nosso trabalho é a recente separação destas duas linhagens, estimada em dois milhões de anos, segundo estimativa de tempos de divergência na nossa filogenia molecular (Figura 5). Outra possível razão é a de que a família Threskiornithidae é uma das famílias com a menor taxa de mutação no DNAmít entre o grupo das aves (HYUNG; DEWOODY, 2010)

Avaliar o nível de diferenciação genética entre duas espécies proximamente relacionadas usando marcadores nucleares é uma difícil tarefa quando não há monofilia.

Processos como o sorteamento de linhagem, introgressão, duplicações de genes podem causar diferenças entre as árvores de genes e a árvore de espécie. Os vários métodos de delimitação de espécies propostos recentemente (O'MEARA, 2010), visando recuperar sinal de especiação ainda sem monofilia em locos múltiplos, foram aplicados nesse trabalho. Entre os marcadores aqui utilizados, foi possível recuperar a partir dos dados do marcador nuclear (MPP) sinais que diferenciam as duas espécies de *Eudocimus* (Figura 7B), ainda que ao ser enraizado, *E. albus* mostrou-se como grupo parafilético a *E. ruber*. Apesar de os outros três marcadores (FIB-7, GADPH, Myo) indicarem compartilhamento de haplótipos e ausência de monofiletismo recíproco, possivelmente devido ao sorteamento de linhagens e a retenção do polimorfismo ancestral, foi possível recuperar um forte sinal de especiação nas diversas análises coalescentes de delimitação de espécies que suportaram a hipótese de que *Eudocimus ruber* e *E. albus* são duas linhagens evolutivamente separadas. A análise de delimitação bayesiana de espécies revelou valores máximos para este evento de especiação, inclusive quando somente os marcadores nucleares foram utilizados. O estatístico gsi_T foi significativo quanto à separação destas duas espécies, apresentando maior valor para os marcadores mitocondriais. Apesar deste parâmetro estatístico não ter resultado em valor de 1 para os marcadores nucleares, o valor foi estatisticamente significativo, indicando grau de diferenciação significativa entre os dois táxons.

A análise de delimitação de espécies foi feita pelo método de Knowles e Carstens (2007) no programa STEM, dado que os marcadores não rejeitaram a hipótese do relógio molecular. O programa STEM utiliza a distância nos ramos junto com o valor θ para obter o comprimento dos ramos em unidades de coalescência. Nesta análise não foi possível rejeitar nenhuma das duas hipóteses acima mencionadas, já que o programa conseguiu diferenciar a separação de linhagens, mas a diferença obtida pelo

valor de verossimilhança com a hipótese de uma espécie só não foi significativa. Esse resultado foi obtido, possivelmente, devido à recente separação das linhagens. Como controle negativo da análise foi avaliado o efeito da atribuição incorreta dos indivíduos às linhagens, realizando a permuta de indivíduos de *Eudocimus albus* com indivíduos de *E. ruber* na análise. Assim, ao realizar a permuta de apenas um indivíduo escolhido ao acaso, a hipótese de uma única espécie foi sempre significativamente maior do que a que supõe duas linhagens, comprovando que os resultados obtidos anteriormente não são produtos de algum artefato metodológico.

Eudocimus albus e *E. ruber* têm aspectos ecológicos similares, têm distribuições geográficas distintas e são interférteis, o que é evidenciado na zona parapátrica da distribuição das espécies, apesar da maioria dos cruzamentos ocorrer entre indivíduos da mesma espécie (RAMOS; BUSTO, 1987). Alguns autores já propuseram as duas como superespécies (SIBLEY; MONROE 1990), como co-específicas (KUSHLAN; BILDSTEIN, 1992) ou como subespécies de *E. ruber* (RAMO; BUSTO, 1987). O termo superespécies implica em alopatria, o que não acontece com as espécies de *Eudocimus* que apresentam zona de hibridização. Outra proposta foi feita por Ramos e Busto (1987) considerando *Eudocimus* contendo uma espécie com duas subespécies, baseando-se na não-existência de mecanismos de isolamento reprodutivo e no conceito biológico de espécie.

Nossas análises genéticas não são conclusivas, pois não foram incluídos indivíduos representantes de toda a área de distribuição de *E. ruber* e *E. albus*. Se considerarmos, entretanto, que não há grande diferenciação intraespecífica como foi demonstrado para *E. ruber* cuja distribuição geográfica da diversidade genética foi estudada por Gonçalves et al. (2010) usando o intron 7 do gene do β fibrinogênio e por Santos (2005) usando 12 locos de microssatélites. Gonçalves et al. (2010) não

encontraram estruturação genética entre as três populações estudadas, dois do nordeste e uma do sudeste do Brasil. Quando os nossos dados são adicionados aos obtidos por Gonçalves et al. (2010), também não foi observada estruturação genética nem por *Fst* ou por AMOVA, mas sim entre *E. albus* e *E. ruber*. Santos (2005) encontrou baixa diferenciação pela análise de microssatélites entre populações de Cubatão (sudeste do Brasil) e algumas populações do nordeste do Brasil, mas sem uma correlação com a distância geográfica. As amostras aqui analisadas de *E. albus* são de uma localidade no extremo norte de sua distribuição, mas não tem sido detectada estruturação genética entre populações de *E. albus* (STANGEL, 1991). *E. albus* possui um baixo nível de filopatria tanto para o local do nascimento como para alimentação, assim como comportamento nômade (FREDERICK et al., 1996; HEATH et al., 2009), comportamentos esses que contribuem para a formação de populações panmíticas.

Hancock et al. (1992), baseando-se em informação morfológica, propôs que *E. albus* seria formada por duas subespécies, sendo uma das destas subespécies a que hibridiza com *E. ruber*, a qual não foi amostrada no presente estudo. Uma amostragem na zona de hibridização também nos forneceria mais informação sobre o grau de diferenciação das espécies e nos permitiria testar a hipótese de Hancock et al. (1992).

Conceitos modernos de espécies como é o caso do conceito geral de linhagem podem ser mais adequados para interpretar o caso *Eudocimus* e, segundo nossos resultados, podemos considerar *E. albus* e *E. ruber* como duas linhagens diferentes que representam duas espécies diferentes.

7. CONCLUSÕES

- A família Threskiornithidae parece ser um grupo monofilético e a divisão proposta atualmente em duas subfamílias não foi corroborada. A subfamília Plataleinae formou um grupo monofilético, mas dentro de Threskiornithinae. A subdivisão nestas duas subfamílias deveria ser reavaliada obedecendo as monofilias recíprocas.
- A filogenia de representantes da família Threskiornithidae resultou em dois grupos reciprocamente monofiléticos. O primeiro agrupa gêneros endêmicos do continente americano. O segundo grupo foi formado por espécies tanto do Novo como do Velho Mundo. Isso poderia ser explicado por uma divergência inicial em dois clados ocorrido na Gondwana e posterior colonização do Novo Mundo por espécies do Velho Mundo.
- As divergências iniciais dentro da família Threskiornithidae foram estimadas em 35 – 40 milhões de anos, data anterior à separação do continente americano da Antártica.
- Nas análises baseadas nos genes mitocondriais *Eudocimus ruber* e *E. albus* se comportam como dois grupos reciprocamente monofiléticos. Nas análises baseadas nos genes nucleares e usando métodos coalescentes de delimitação de espécies foi possível recuperar um forte sinal de especiação, apesar da ausência de monofilia recíproca em três dos quatro marcadores. O conjunto apesar de não conter indivíduos de toda área de distribuição geográfica de *E. ruber* e *E. albus* aponta para duas linhagens evolutivamente separadas e que devem ser manejadas como tais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliabadian, M.; M. Kaboli; V. Nijman; M. Vences. Molecular identification of birds: performance of distance-based DNA Barcoding in three genes to delimit parapatric species. **PLoS ONE**, 4: e4119, 2009.
- AMERICAN ORNITHOLOGISTS UNION. **Check-list of North American birds**. 7th.ed. Washington, D.C., 1998.
- Antas, P.; R. Roth; G. Morrison. 1990. Status and conservation of the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*) in Brazil. In: **The Scarlet Ibis (*Eudocimus ruber*): Status, Conservation and Recent Research** (Eds Frederick PC, Morales LG, Spaans AL, Luthin CS), pp. 130–136. International Waterfowl and Wetlands Research Bureau, Slimbridge.
- Argel-de-Oliveira, et al. O status atual do guará (*Eudocimus ruber*) no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. Painel 64. In: Congresso Brasileiro de Ornitologia, 3, Pelotas, RS, **Resumos**. Pelotas, Universidade Católica de Pelotas, Sociedade Brasileira de Ornitologia. 1993.
- Austin Jr., O.; A. Singer. **Birds of the World**. Verona: Ed. Optimun Books, 1983.
- Avice, J. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2 ed. New York: Chapman & Hall, 2004.
- Bandelt, H.; P. Forster; A. Röhl. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16: 37-48, 1999.
- Banks, R. C., et al. Forty-third supplement to the American Ornithologists' Union Check-list of North American Birds. **Auk**, 119: 897-906, 2002.
- Berli P.; J. Felsenstein. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98: 4563–4568, 2001.
- Belser, C. A scarlet ibis or a hybrid white ibis x scarlet ibis in South Carolina. **Chat** 53: 90–91, 1989.
- Brown, W.; M. George; A. Wilson. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76: 1967-71; 1979.
- Brown, J.; R. Payne; D. Mindell. Nuclear DNA does not reconcile ‘rocks’ and ‘clocks’ in Neoaves: a comment on Ericson et al. **Biology letters**, 3: 257-259, 2007.

- Brown, J. et al. Strong mitochondrial DNA support for a Cretaceous origin of modern avian lineages. **BMC Biology**, 6: 6, 2008.
- Chesser, R. et al.. Fifty-first supplement to the American Ornithologists' Union Checklist of North American Birds. **Auk**, 127: 726-744, 2010a
- Chesser, R. et al.. Molecular phylogeny of the spoonbills (Aves: Threskiornithidae) based on mitochondrial DNA. **Zootaxa**, 2603: 53-60, 2010b
- Cox, C. B.; P. D. Moore. **Biogeography: an ecological and evolutionary approach**. Ed. John Wiley & Sons. 2010.
- Cracraft, J. Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous-Tertiary mass extinction event. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 268:459–469, 2001.
- Convention of Biological Diversity. **Convenio sobre Diversidad biológica. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente**. Rio de Janeiro. 1992.
- Cummings, M.; M. Neel, K.; Shaw KL. A genealogical approach to quantifying lineage divergence. **Evolution**, 62: 2411–2422, 2008.
- De Queiroz, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, 56(6): 879–886, 2007.
- Drummond, A.; A. Rambaut. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 214, 2007.
- Ericson, P., et al. A Gondwanan origin of passerine birds supported by DNA sequences of the endemic New Zealand wrens. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 269:235–241, 2002.
- Ericson, P., et al. Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. **Biology Letters**, 2: 543-547, 2006.
- Fain, M.; P. Houde. Multilocus perspectives on the monophyly and phylogeny of the order Charadriiformes (Aves). **BMC Evolutionary Biology** 7:35, 2007.
- Fain, M.; C. Krajewski; P. Houde. Phylogeny of "core Gruiformes" (Aves: Grues) and resolution of the Limpkin-Sungrebe problem. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 43: 515-29, 2007.
- Faith, D. Cladistic permutation tests for monophyly and non monophyly. **Systematics Zoology**, 40: 336-375, 1991.

- Ferreira, C. **Filogenia dos Ciconiiformes (Aves) com Ênfase em Threskiornithidae**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP. Botucatu, Brasil. 2007.
- Fjeldså, J.; N., Krabbe. **Birds of the High Andes**. Copenhagen: Zoological Museum, Univ. Copenhagen, 1990.
- Fleischer, R.C.; C.E. McIntosh. Molecular systematics and biogeography of the Hawaiian avifauna. **Studies in Avian Biology**, 22: 51–60. 2001.
- Frederick, P. C., et al. Conservation of large, nomadic populations of white ibises (*Eudocimus albus*) in the United States. **Conservation Biology**, 10: 203-216, 1996.
- Gonçalves, P. **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. Dissertação para a obtenção de Título de Mestre em Ciências na Área de Biologia/Genética. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2009.
- Gonçalves, E., et al. Genetic diversity and differentiation of three Brazilian populations of Scarlet íbis (*Eudocimus ruber*). **Journal of Ornithology**, 151: 797-803, 2010.
- Hackett, S., et al. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. **Science**, 320: 1763-1768, 2008.
- Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95–98, 1999.
- Hancock, J.; J. Kushlan; M. Kahl. **Storks, ibises, and spoonbills of the world**. London: Academic Press, 1992.
- Hebert, P., et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 270: 313-322, 2003
- Hebert, P., et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PloS Biology**, 2: 1657–1663, 2004.
- Hedges S. Molecular evidence for the origin of birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91: 2621-2624, 1994.
- Hedges, S.; J. Dudley; S. Kumar. TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. **Bioinformatics**, 22: 2971-2972, 2006.
- Heled, J.; A. J. Drummond. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular Biology and Evolution**, 27: 570–580, 2010.
- Hellmayr, C. E.; B. Conover. Catalogue of birds of the Americas. **Field Mus. Nat. Hist. Publ., Zool. Ser.**, vol. 13, pt. 1, no. 2, 1948.

- Heslewood, et al. Myoglobin intron variation in the Gouldian finch *Erythrura gouldiae* assessed by temperature gradient gel electrophoresis. **Electrophoresis**, 19: 142–151, 1998.
- Howard, R.; A. Moore. **A complete checklist of the birds of the world**. 2. Ed. London: Academic Press Ltd, 1998.
- Huelsenbeck, J.; F. Ronquist. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, 17: 754-755, 2001.
- Hyung, S.; A. DeWoody. Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 277: 3587-3592, 2010.
- InfoNatura: Animals and Ecosystems of Latin America [web application]. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): **NatureServe**. Disponível em: <http://www.natureserve.org/infonatura>. 2007.
- James, H. Palaeogene fossils and the radiation of fossil birds. **Auk**., 122: 1049–1054, 2005.
- Kerr, K., et al. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. **PLoS ONE**, 4: e4379, 2009.
- Kishino, H.; M. Hasegawa. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary topologies from DNA sequences data and the branching order in hominoidea. **Journal of Molecular Evolution**, 29: 170-179, 1989.
- Knowles L.; B. Carstens. Delimiting species without monophyletic gene trees. **Systematic Biology**, 56:887–895, 2007.
- Kumar, S.; K. Tamura; M. Nei. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, 5: 150-163, 2004.
- Kushlan, J.; K. Bildstein. White ibis (*Eudocimus albus*). In: A. Poole; P. Stettenheim; F. Gill. **The Birds of North America, No. 9**. Philadelphia: The Birds of North America Inc., 1992.
- Kubatko L.S.; B.C. Carsten; L. Knowles. STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. **Bioinformatics**, 25:971–973, 2009.
- Lane, D., et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 82: 6955-6959, 1985.

- Larkin, M., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23, 2947–2948, 2007.
- Librado, P.; J. Rozas. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452. 2009.
- Linnaeus, O. Systema Naturae. Tomus I. Holmias Impensis Direct Laurentii Salvii. 1758.
- Livezey, B.; R. Zusi. Higher-order phylogenetics of modern Aves based on comparative anatomy. **Netherlands Journal of Zoology**, 51: 179–206, 2001.
- Livezey, B.; R. Zusi. Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 149: 1–95, 2007.
- Matheu, E.; J. Del Hoyo. Family Threskiornithidae. In: J. Del Hoyo; A. Elliott; J. Sargatal. **Handbook of the Birds of the World**, vol. 1. Barcelona: Lynx Ediciones, 1992.
- Monroe, B; C. Sibley. **A World Checklist of Birds**. New Haven: Yale University Press, 1993.
- Noss, R. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. **Conservation Biology**, 4: 355-364, 1990.
- O'Meara, B.C. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. **Systematic Biology**, 59:5 9-73,2010.
- Olmos, F.; R. Silva e Silva. **Guará: Ambiente, Flora e Fauna dos Manguezais de Santos-Cubatão**. São Paulo: Empresa das Artes, 2003.
- Palmer, R. S. Loons through flamingos In: **Handbook of North American Birds**. Vol. 1..New Haven: Yale University Press, 1962.
- Pinto, O. M. de O. Catálogo das aves do Brasil. Parte 1. **Rev. Museu Paulista** 22: 1-566. 1938.
- Posada D. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. In: Baxevanis AD, et al. (Eds.). **Current Protocols in Bioinformatics**. New York: John Wiley & Sons, 2003. p. 6.5.1–6.5.14.
- Posada, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256, 2008.
- Prychitko, T.; W. Moore. The utility of DNA sequences of an intron from the β -fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 8:193-204, 1997.

- Primack, R., et al. **Fundamentos de Conservación Biológica: perspectivas latinoamericanas.** México: Fondo de Cultura Económica, 2001.
- Ramo, C.; B. Busto. Hybridization between the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*) and the white ibis (*E. albus*) in Venezuela. **Colonial Waterbirds**, 10: 111-114, 1987.
- Remsen, J. V., et al.. **A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union.** Disponível em: <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>. Acesso 2010.
- Ridgway, R. Remarks upon the close relationship between the White and Scarlet Ibises (*Eudocimus albus* and *E. ruber*). **Auk**. 3: 239-240, 1884.
- Rodrigues, A. Ocorrência da reprodução de *Eudocimus ruber* na ilha do Cajual, Maranhão, Brasil (Ciconiiformes: Threskiornithidae). **Ararajuba**, 3: 67-68, 1995.
- Sambrook, J.; E. Fritish; T. Maniatis. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Santos, M. **Análise de Populações Naturais de *Eudocimus Ruber* (Ciconiformes Threskiornithidae) Através de Marcadores Microsatélites: Implicações para a Conservação da Espécie.** Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Pará. Pará - Brasil. 2005.
- Santos, M., et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae-Aves). **Molecular Ecology Notes**, 6: 307–309, 2006.
- Schliess, F.; W. Stoffel. Evolution of the myelin integral membrane proteins of the central nervous system. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, 372: 865–874, 1991.
- Shimodaira, H.; M. Hasegawa. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetics inference. **Molecular Biology and Evolution**, 16: 1114-1116. 1999.
- Short, L. L., Jr. A zoogeographic analysis of the South American Chaco avifauna. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, 154: 163-352, 1975.
- Sibley, C.; J. Ahlquist. **Phylogeny and Classification of Birds: A Study in Molecular Evolution.** New Haven: Yale University Press, 1990.
- Sibley, C.; B. Monroe Jr. **Distribution and Taxonomy of Birds of the World.** New Haven: Yale University Press, 1990.

- Sick, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.
- Slade, R., et al. Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. **Molecular Ecology**, 2: 359–373, 1993.
- Slikas, B. Phylogeny of the avian family Ciconiidae (storks) based on cytochrome B sequences and DNA–DNA hybridization distances. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 8: 275–300, 1997.
- Smith, F., et al. How much do we know about the current extinction rate? **Trends in Ecology and Evolution**, 8: 375-378, 1993.
- Sodhi, N.; P. Ehrlich. **Conservation Biology for All**. New York: Oxford University Press, 2010.
- Stangel, P.W. et al. Low genetic differentiation between two disjunct White Ibis colonies. **Colonial Waterbirds**, 14: 13 – 16, 1991.
- Steinbacher, J. Family Threskiornithidae. In: Mayr, E.; G. W. Cottrell (Ed.). **Check-list of birds of the World**, Vol. 1, Second Edition. Cambridge: Museum of Comparative Zoology, Pp. 253-268. 1979.
- Stephens, M; N. Smith; P. Donnelly. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Genetics**, 68: 978–989, 2001.
- Stoeckle, M. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. **BioScience**, 53: 2-3, 2003.
- Stone, E., et al. Complete sequence of the chicken glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. **Proceedings Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 82: 1628-1632, 1985.
- Swofford, D. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Massachusetts: Sinauer, Sunderland, 1998. Version 4.0b8a.
- Tamura, K.; M. Nei; S. Kumar. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101:11030-11035. 2004.
- Templeton, A. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. **Evolution**, 37: 221-224, 1983.
- Van Tuinen, M.; C. Sibley; S. Hedges. The early history of modern birds inferred from DNA sequences of nuclear and mitochondrial ribosomal genes. **Molecular Biology and Evolution**, 17: 451–457, 2000.
- Van Tuinen, M., et al. Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 268: 1345-1350, 2001.

Yang Z.; B. Rannala. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 9264–9269, 2010.

Yoo, H., et al. DNA barcoding Korean birds. **Molecules and Cells**, 22: 323–327, 2006.

Zahl, P.A. New scarlet ibis in Florida skies. **National Geographic**, 32:847-882, 1967.