

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Carlos Congrains Castillo

“Filogeografia de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) na África e o processo de colonização do continente americano por essa espécie”

São Carlos – SP

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Carlos Congrains Castillo

“Filogeografia de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) na África e o processo de colonização do continente americano por essa espécie”

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

Orientadora: Prof. Dra. Sílvia Nassif Del Lama

São Carlos – SP

2013

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

C749fb Congrains Castillo, Carlos.
 Filogeografia de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) na África
e o processo de colonização do continente americano por
essa espécie / Carlos Congrains Castillo. -- São Carlos :
UFSCar, 2013.
 87 f.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2013.

 1. Genética. 2. Garça-vaqueira. 3. Filogeografia. 4.
Demografia. 5. Invasão biológica. 6. Estrutura populacional.
I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

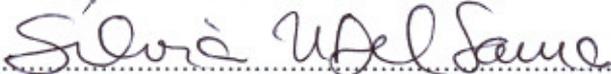
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

"Filogeografia de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) na África e o processo de colonização do continente americano por essa espécie".

Dissertação de Mestrado de
CARLOS CONGRAINS CASTILLO

Banca Examinadora

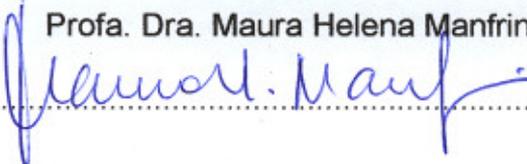
Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama


.....

Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito


.....

Profa. Dra. Maura Helena Manfrin


.....

**Quero dedicar todas as horas de esforço
investidas nesse trabalho a meus pais
Ada e Carlos, minha irmã Ada
e minha noiva Karla**

"Nothing in biology makes sense except in the light of Evolution"

Theodosius Dobzhansky (1973)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sílvia Del Lama por depositar sua confiança em mim sem me conhecer pessoalmente. Agradeço sua amizade, conselhos, conhecimentos transmitidos e pelas inúmeras horas investidas por ela que permitiram desenvolver esse trabalho.

À minha família que nunca deixou de incentivar meu trabalho. Carlos e Ada meus pais que sempre acreditaram em mim. À Ada, minha irmã, por ser a pioneira e um excelente modelo a seguir. À Kaita, minha noiva, porque sempre tive alguém com quem discutir sobre meu trabalho e sempre esteve ao meu lado para fazer com que esses dois anos longe de casa não sejam tão difíceis.

Ao Jorge pela amizade de não sei quantos anos, por ser o vanguardista que abriu o caminho que permitiu essa feliz aventura.

À Cynthia, Elaine, Manu, Pámela, Regina, Fagner, Luiza meus amigos do laboratório pelas incontáveis e gratas horas que passamos juntos nessa etapa de nossas vidas. Por terem compartilhado comigo um pouco de cada um de vocês tornando até os momentos mais difíceis um bom motivo para rir.

Agradeço especialmente aos coletores das amostras da África: Sílvia Del Lama, Emmanuel Moralez-Silva, Cristiano Dosualdo Rocha, Rá Cavalcanti, Hamilton Amarildo Barbosa Monteiro, Aissa Regalla, Moussa Dióp, Daryl Bosu, David e Dominic Henry.

Aos meus amigos do laboratório de embaixo, nossa são muitos! Ueslei, Andiara, Bruno, Alline, Aline, Carla, Dany, Fernanda, Camila, Adriana, Eliana, Karen, Rafa e Lucas.

Ao Prof. Marco sempre disposto a ajudar. Aos meus colegas do lado de lá, especialmente Elder, Tony, Diego e Simone.

Ao Prof. Reinaldo e Daniel pela ajuda intelectual e logística.

À Dany pela ajuda prestada no laboratório.

Ao programa PEC-PG por ter concedido a bolsa CNPq e permitir que esse mestrado seja uma realidade. À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Quem me conhece sabe que minha memória não uma das minhas melhores virtudes, assim que tenho que agradecer a tudo quem participou de forma direta ou indireta no sucesso desse trabalho.

RESUMO

Bubulcus ibis (garça-vaqueira) é um ardeídeo cuja presença na América do Sul foi reportada pela primeira vez no final do século XIX e já na década de 1950 encontrava-se espalhada por todo o continente. O presente estudo teve por objetivo analisar a distribuição da diversidade genética nas populações africanas e brasileiras de *B. ibis* visando compreender os processos que modelaram os padrões de colonização da área não-nativa no Brasil. Foi estudada a variação genética da região controladora (RC) do DNA mitocondrial (DNAmít) (N = 412 africanas e 177 brasileiras) e dos genes ATPases 6 e 8 do DNA mitocondrial (N = 108 africanas e 49 brasileiras) e do íntron 5 do gene nuclear *Transforming growth factor beta-2* (TGFB2) (N = 96 africanas e 50 brasileiras). Níveis de diversidade genética encontrados foram semelhantes entre as regiões africanas, exceto pela menor diversidade encontrada na África do Sul. Os testes de neutralidade, as curvas de *mismatch distribution* e o *Bayesian Skyline Plot* evidenciaram uma expansão demográfica na população total africana, datada por essa última metodologia em 15 mil anos atrás, ocorrida após o último máximo glacial. Esses resultados foram discutidos supondo que eventos climáticos dessa época produziram os padrões encontrados no presente da distribuição da diversidade genética. Os testes de AMOVA e os F_{ST} par a par mostraram ausência de diferenciação entre quase todas as populações africanas e quando achada, envolveram as populações da África do Sul e/ou da Nigéria. As populações brasileiras não se diferenciaram geneticamente, nem apresentaram desvios do tamanho efetivo ao longo do tempo. A variabilidade genética avaliada pelos genes do DNAmít e do DNA nuclear foram semelhantes nas populações brasileiras e africanas, sugerindo a ocorrência de múltiplos eventos de introdução. Uma provável rota de migração entre os dois continentes foi suposta nesse estudo baseando-se nos registros históricos e nos dados genéticos (graus de diferenciação e compartilhamento de haplótipos): aves partiriam da costa oeste da África, passando por ilhas oceânicas e/ou arquipélagos como Cabo Verde e chegariam ao continente sul americano pelo norte e/ou sul do litoral brasileiro.

Palavras chave: *Bubulcus ibis*, filogeografia, histórico demográfico, invasão biológica, estruturação populacional.

ABSTRACT

The cattle egret (*Bubulcus ibis* [Ardeidae]) was first reported in the New World in the late nineteenth century and has been found scattered throughout the Americas since the 1950s. The aim of the present study was to analyze the distribution of genetic diversity in African and Brazilian populations of the cattle egret to understand the process of colonization of the non-native area in the Brazil. Genetic variation in the mitochondrial DNA (mtDNA) Control Region (CR) (n = 412 African and 177 Brazilian individuals), in ATPase 6 and 8 genes (n = 108 African and 49 Brazilian individuals) and in the intron 5 of the nuclear transforming growth factor beta-2 gene (n = 96 African and 50 Brazilian individuals) were evaluated. Genetic diversity across regions of Africa was similar, except for the lesser diversity found in South Africa. Neutrality tests, mismatch distributions and Bayesian skyline plots revealed demographic expansion in the overall African population, dated by the latter method as 15000 years before the present, occurred after the last glacial maximum. The findings were discussed hypothesizing that past climatic events have shaped the current distribution of genetic diversity. AMOVA and pairwise F_{st} tests revealed a lack of differentiation among nearly all African populations. The few cases of differentiation involved the South African and/or Nigerian populations. Brazilian populations exhibited no genetic structure or effective size deviations over time. Mitochondrial and nuclear DNA genetic variability demonstrated similar levels of genetic variation between the Brazilian and African populations, suggesting multiple introduction events. Based on historical and genetic data (differentiation levels and shared haplotypes), we propose a likely migration route between both continents departing from West Africa, passing through oceanic islands and archipelagos, such as Cape Verde, and finally arriving in the Americas on the northern and/or southern coast of Brazil.

Keywords: *Bubulcus ibis*, phylogeography, demographic history, biological invasion, population structure.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição geográfica dos locais de coleta	12
Tabela 2. Índices de diversidade genética da RC do DNAMit nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$	26
Tabela 3. Índices de diversidade das ATPses 6 e 8 do DNAMit nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$	27
Tabela 4. Índices de diversidade do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . N: tamanho amostral em número de cópias do íntron, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$	28
Tabela 5. AMOVA global das populações africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador a RC do DNAMit. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito	29
Tabela 6. AMOVA global das populações africanas de <i>B. ibis</i> agrupadas por países usando como marcador a RC do DNAMit. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito	30
Tabela 7. F_{ST} par a par entre as colônias africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador a RC do DNAMit. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	31
Tabela 8. F_{ST} par a par entre as regiões africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador a RC do DNAMit. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg	31
Tabela 9. AMOVA global das populações africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador as ATPses 6 e 8 do DNAMit. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito	32
Tabela 10. AMOVA global das populações africanas de <i>B. ibis</i> agrupadas por países usando como marcador as ATPses 6 e 8 do DNAMit. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$	32

Tabela 11. F_{ST} par a par entre as colônias africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador as ATPases 6 e 8 do DNAmít. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	33
Tabela 12. F_{ST} par a par entre as regiões africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador as ATPases 6 e 8 do DNAmít. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$	33
Tabela 13. AMOVA global das populações africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador o íntron nuclear TGFB2. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito	34
Tabela 14. AMOVA global das populações africanas de <i>B. ibis</i> agrupadas por países usando como marcador o íntron nuclear TGFB2. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito	35
Tabela 15. F_{ST} par a par entre as colônias africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador o íntron nuclear TGFB2. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	36
Tabela 16. F_{ST} par a par entre as regiões africanas de <i>B. ibis</i> usando como marcador as íntron nuclear TGFB2. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	36
Tabela 17. Testes de neutralidade e estatísticos para as curvas de <i>mismatch distribution</i> baseados na RC do DNAmít nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . F_s (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) e rg (Harpending <i>et al.</i> , 1993) e SSD. Em negrito os valores significativos ($p \leq 0.05$). * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg	37
Tabela 18. Testes de neutralidade e estatísticos para as curvas de <i>mismatch distribution</i> baseado nos dados dos genes das ATPases 6 e 8 do DNAmít, nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . F_s (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending <i>et al.</i> , 1993) e SSD. Em negrito mostram-se os valores significativos ($p \leq 0.05$). * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg	40
Tabela 19. Testes de neutralidade e estatísticos das curvas de <i>mismatch distribution</i> do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . F_s (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending <i>et al.</i> , 1993) e SSD. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$	42
Tabela 20. Índices de diversidade da RC do DNAmít nas populações brasileiras de <i>B. ibis</i> . N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – Hd: desvio padrão de Hd, π : diversidade nucleotídica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP – $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP –	

$\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$	46
Tabela 21. Índices de diversidade das ATPases 6 e 8 do DNAmít nas populações brasileiras de <i>B. ibis</i> . N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – Hd: desvio padrão de Hd, π : diversidade nucleotídica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$	47
Tabela 22. Índices de diversidade do TGFB2 do DNA nuclear nas brasileiras de <i>B. ibis</i> . N: tamanho amostral em número de cópias do íntron, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – Hd: desvio padrão de Hd, π : diversidade nucleotídica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$	47
Tabela 23. F_{ST} par a par entre as populações brasileiras de <i>B. ibis</i> usando o fragmento da RC do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	48
Tabela 24. F_{ST} par a par entre as populações brasileiras de <i>B. ibis</i> usando o fragmento das ATPases 6 e 8 do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	48
Tabela 25. F_{ST} par a par entre as populações brasileiras de <i>B. ibis</i> usando o fragmento do íntron do TGFB2 do DNA nuclear. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$	49
Tabela 26. Testes de neutralidade e os estatísticos da <i>mismatch distribution</i> da RC do DNAmít nas populações brasileiras de <i>B. ibis</i> . Fs (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending <i>et al.</i> , 1993) e SSD. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). * Indicam os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg	49
Tabela 27. Testes de neutralidade e os estatísticos da <i>mismatch distribution</i> das ATPases 6 e 8 do DNAmít na população brasileira de <i>B. ibis</i> . Fs (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending <i>et al.</i> , 1993) e SSD. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$)	51
Tabela 28. Testes de neutralidade e os estatísticos da <i>mismatch distribution</i> do íntron nuclear TGFB2 na população brasileira de <i>B. ibis</i> . Fs (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending <i>et al.</i> , 1993) e SSD. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$	52
Tabela 29. F_{ST} par a par entre populações das regiões africanas e as brasileiras de <i>B. ibis</i> usando o fragmento da RC do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). * Indica os valores significativos após a	

correção de Benjamini-Hochberg	53
Tabela 30. F_{ST} par a par entre as regiões africanas e as brasileiras de <i>B. ibis</i> usando o fragmento das ATPases 6 e 8 do DNAmIt. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	54
Tabela 31. F_{ST} par a par entre as regiões africanas e as brasileiras de <i>B. ibis</i> usando o fragmento do íntron TGFB2 do DNA nuclear. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg	54
Tabela 32. Ocorrência dos haplótipos da RC do DNAmIt nas regiões amostradas de <i>B. ibis</i> ..	55
Tabela 33. Ocorrência dos haplótipos das ATPases 6 e 8 do DNAmIt nas regiões amostradas de <i>B. ibis</i>	57
Tabela 34. Ocorrência dos haplótipos do íntron do TGFB2 do DNA nuclear nas regiões amostradas de <i>B. ibis</i>	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da garça-vaqueira. Colorações diferentes indicam as regiões onde a espécie foi reportada como residente, onde ela não se reproduziu e onde ocorre apenas na temporada reprodutiva (modificado de Kushlan e Hancock (2005))	1
Figura 2. Mapa dos ventos do Oceano Atlântico com vorticidade absoluta e 850-hPa de pressão atmosférica, extraído do site http://www.atmos.albany.edu/student/carl/weather/maps/vort/atlantic/28.png	5
Figura 3. Mapa de América do Sul mostrando as datas e países onde foram avistadas pela primeira vez as garças-vaqueiras, extraído de Telfair II (1983)	6
Figura 4. Mapas mostrando a distribuição de <i>B. ibis</i> no continente africano. A) Mapa mostrando as áreas de reprodução e ocorrência de <i>B. ibis</i> em 1920 (modificado de Chapin, 1920 e Siegfried, 1965). B) Mapa mostrando as áreas de reprodução e ocorrência atuais de <i>B. ibis</i> (modificado de Kushlan e Hancock (2005)).....	7
Figura 5. Mapa do Brasil mostrando os locais coletados, cada ponto representa uma colônia reprodutiva. 1. Pará. 2. Rio Grande do Norte. 3. Ilha de Fernando de Noronha. 4. Pernambuco. 5. São Paulo. 6. Rio Grande do Sul. Mapa do Brasil mostrando os locais coletados.	13
Figura 6. Mapa da África mostrando os países coletados. Cada ponto representa duas-três colônias reprodutivas amostradas em cada país, com exceção de Cabo Verde que é uma amostra de um pouso (ver Tabela 1) 1. Cabo Verde. 2. Senegal. 3. Guiné Bissau. 4. Gana. 5. Nigéria. 6. Quênia. 7. África do Sul.	13
Figura 7. Gráfico do número de transições e transversões versus a distância genética par a par, calculada segundo o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P)	23
Figura 8. Diversidade nucleotídica da RC do DNAmIt de <i>B. ibis</i> encontrada ao longo do fragmento analisado	23
Figura 9. Diversidade nucleotídica da RC do DNAmIt de <i>B. ibis</i> avaliada a cada 20 nucleotídeos no fragmento da RC, após a retirada dos sítios com suspeita de conter informação homoplástica	24
Figura 10. Eletroferograma do íntron TGFB2 de um indivíduo africano de <i>B. ibis</i> mostrando a posição 261 em heterozigose. A) Fita sequenciada com o <i>primer</i> E4. B) Fita sequenciada com o <i>primer</i> E5	25
Figura 11. Teste de Mantel entre as matrizes de distância genética da RC do DNAmIt e a distância geográfica das colônias africanas de <i>B. ibis</i>	30

- Figura 12.** Teste de Mantel entre as matrizes de distância genética das ATPases 6 e 8 do DNAmít e a distância geográfica das colônias africanas de *B. ibis* 34
- Figura 13.** Teste de Mantel entre as matrizes de distância genética do íntron do TGFB2 do DNA nuclear e a distância geográfica entre as colônias africanas de *B. ibis*35
- Figura 14.** Gráficos de *mismatch distribution* determinados a partir da variação encontrada nas sequências da RC do DNAmít para populações africanas de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) Quênia; E) África do Sul e F) África (total)38
- Figura 15.** Histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* baseadas na RC do DNAmít, usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot*. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e F) África (total)39
- Figura 16.** Gráficos das curvas de *mismatch distribution* baseadas nos genes das ATPases 6 e 8 nas populações africanas de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e E) África (Total) 40
- Figura 17.** Histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot* baseada nas ATPases 6 e 8 do DNAmít. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul; F) África (total)41
- Figura 18.** Gráficos de *mismatch distributions* do íntron TGFB2 das populações africanas de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e E) África (total)42
- Figura 19.** Histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* baseadas nos dados do íntron do TGFB2 do DNA nuclear, usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot*. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e F) África (total)43
- Figura 20.** Rede de haplótipos baseada na variação da RC do DNAmít nas populações africanas de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior está a legenda com a cor de cada população e a escala. Os números em vermelho indicam a posição do

sítio onde ocorreu a substituição dentro do fragmento estudado	44
Figura 21. Rede de haplótipos baseada na variação do gene das ATPases 6 e 8 do DNAmít nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está a legenda com a cor de cada população e a escala. Os números em vermelho indicam a posição dentro do fragmento do sítio onde ocorreu a substituição	45
Figura 22. Rede de haplótipos baseado na variação do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas de <i>B. ibis</i> . Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está a escala e na superior à esquerda a legenda das cores. Os números em vermelho indicam a posição dentro do fragmento do sítio onde ocorreu a substituição	46
Figura 23. Curvas de <i>mismatch distributions</i> baseadas nos dados da RC do DNAmít nas populações brasileiras de <i>B. ibis</i> . Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Pará; B) Rio Grande do Norte; C) Fernando de Noronha; D) Pernambuco; E) São Paulo; F) Rio Grande do Sul; G) Brasil (total)	50
Figura 24. História demográfica da população brasileira de <i>B. ibis</i> usando a metodologia <i>Bayesian Skyline Plot</i> baseada na RC do DNAmít. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade	51
Figura 25. Curva de <i>mismatch distribution</i> baseada nos dados dos genes das ATPases 6 e 8 do DNAmít da população brasileira de <i>B. ibis</i> . Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico	51
Figura 26. História demográfica da população brasileira de <i>B. ibis</i> usando-se a metodologia <i>Bayesian Skyline Plot</i> baseada nos genes ATPases 6 e 8 do DNAmít. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade	52
Figura 27. Gráfico da <i>Mismatch distribution</i> do íntron nuclear do TGFB2 da população brasileira de <i>B. ibis</i> . Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico	52
Figura 28. História demográfica da população brasileira de <i>B. ibis</i> usando a metodologia <i>Bayesian Skyline Plot</i> baseada no íntron do TGFB2 do DNA nuclear. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade	53

- Figura 29.** Rede de haplótipos baseada na variação da RC do DNAmít nas populações africanas e brasileiras de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está escala e legenda. Os números em vermelho indicam a posição dentro do fragmento do sitio onde ocorreu a substituição55
- Figura 30.** Rede de haplótipos baseada na variação das ATPases 6 e 8 do DNAmít nas populações africanas e brasileiras de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está escala e legenda. Os números em vermelho indicam a posição dentro do fragmento do sitio onde ocorreu a substituição56
- Figura 31.** Rede de haplótipos baseada na variação do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas e brasileiras de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está escala e legenda. Os números em vermelho indicam a posição dentro do fragmento do sitio onde ocorreu a substituição57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A espécie alvo e sua biologia.....	1
1.2. Processos de invasão e dispersão de <i>B. ibis</i>	4
1.2.1 A invasão da garça-vaqueira no continente americano.....	4
1.2.2. A Dispersão da garça-vaqueira no continente africano.....	6
1.3. A filogeografia e o processo de invasão.....	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Amostra.....	12
3.2. Métodos.....	14
3.2.1. Extração do DNA.....	14
3.2.2. Amplificação do DNA.....	14
3.2.2.1. RC do DNAmít.....	14
3.2.2.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	15
3.2.2.3. Íntron 5 do gene nuclear <i>Transforming growth factor beta-2</i>	15
3.2.3. Avaliação da amplificação por PCR.....	16
3.2.4. Purificação dos produtos de PCR.....	16
3.2.5. Sequenciamento do DNA.....	16
3.2.6. Análise dos dados.....	16
3.2.6.1. Análise das sequências de DNA.....	16
3.2.6.1.1. Edição dos eletroferogramas.....	16
3.2.6.1.2. Validação das sequências de DNA.....	17
3.2.6.1.3. Alinhamento das sequências.....	17
3.2.6.1.4. Análise de possíveis homoplasias da RC do DNAmít.....	17
3.2.6.1.5. Resolução da fase gamética dos alelos do TGFB2.....	17
3.2.6.1.6. Teste de Recombinação.....	18
3.2.6.2. Estimativas dos parâmetros populacionais.....	18
3.2.6.2.1. Diversidade Genética.....	18
3.2.6.2.2. Testes de neutralidade.....	19
3.2.6.2.3. Distribuição das diferenças pareadas nucleotídicas dos haplótipos.....	19
(<i>mismatch distribution</i>)	

3.2.6.2.4. Mudanças ao longo do tempo dos tamanhos efetivos populacionais.....	20
3.2.6.2.5. Estruturação populacional.....	21
3.2.6.2.6. Rede de haplótipos.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Análise das sequências e alinhamento múltiplo.....	22
4.1.1. Validação das sequências de DNA.....	22
4.1.1.1. RC do DNAmít.....	22
4.1.1.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	22
4.1.1.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	22
4.1.2. Análise de homoplasias e características do alinhamento da RC.....	22
4.1.3. Características do alinhamento das ATPases 6 e 8.....	24
4.1.4. Resolução da fase gamética e características do alinhamento de TGFB2.....	24
4.1.5. Recombinação.....	25
4.2. Índices de diversidade genética das populações africanas (área nativa) de <i>B. ibis</i>	25
4.2.1. RC do DNAmít.....	26
4.2.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	27
4.2.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	28
4.3. Estruturação populacional das populações africanas (área nativa) de <i>B. ibis</i>	29
4.3.1. RC do DNAmít.....	29
4.3.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	32
4.3.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	34
4.4. Histórico Demográfico das populações africanas (área nativa) de <i>B. ibis</i>	37
4.4.1. RC do DNAmít.....	37
4.4.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	39
4.4.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	41
4.5. Rede de Haplótipos da população nativa de <i>B. ibis</i>	43
4.5.1. RC do DNAmít.....	43
4.5.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	44
4.5.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	45
4.6. Parâmetros genéticos nas populações brasileiras (área colonizada) de <i>B. ibis</i>	46
4.6.1. Diversidade genética das populações brasileiras de <i>B. ibis</i>	46
4.6.1.1. RC do DNAmít.....	46
4.6.1.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	47
4.6.1.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	47
4.6.2. Diferenciação genética entre as populações brasileiras (área colonizada) de <i>B. ibis</i>	48

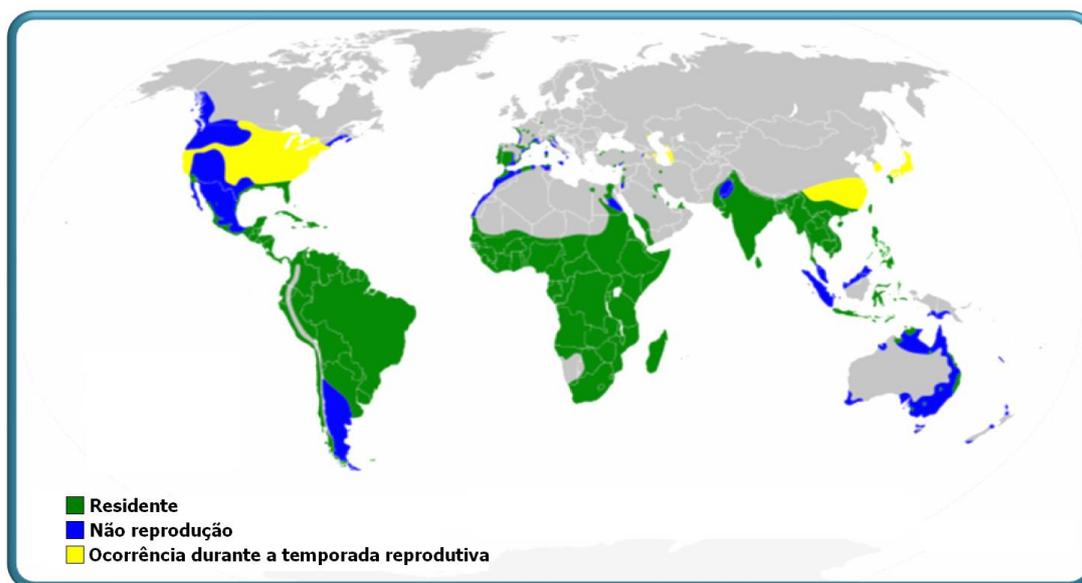
4.6.2.1. RC do DNAmít.....	48
4.6.2.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	48
4.6.2.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	49
4.6.3. Histórico Demográfico das populações brasileiras (área colonizada) de <i>B. ibis</i>	49
4.6.3.1. RC do DNAmít.....	49
4.6.3.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	51
4.6.3.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	52
4.7. Análise comparativa entre as populações brasileiras e africanas de <i>B. ibis</i>	53
4.7.1. Diversidade Genética.....	53
4.7.2. Diferenciação genética entre as populações africanas e brasileiras de <i>B. ibis</i>	53
4.7.2.1. RC do DNAmít.....	53
4.7.2.2. ATPases 6 e 8 do DNA mitocondrial.....	54
4.7.2.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	54
4.7.3. Rede de haplótipos.....	54
4.7.3.1. RC do DNAmít.....	54
4.7.3.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít.....	56
4.7.3.3. TGFB2 do DNA nuclear.....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
5.1. Homoplasias da RC do DNAmít.....	59
5.2. Diversidade Genética nas populações africanas de <i>B. ibis</i>	60
5.3. Estruturação populacional das populações africanas de <i>B. ibis</i>	61
5.4. Histórico demográfico das populações africanas de <i>B. ibis</i>	64
5.5. Rede de haplótipos das populações africanas de <i>B. ibis</i>	66
5.6. Diversidade Genética das populações brasileiras e africanas de <i>B. ibis</i>	67
5.7. Diferenciação populacional entre as populações brasileiras e africanas.....	68
5.8. Histórico demográfico das populações brasileiras de <i>B. ibis</i>	69
5.9. Rede de haplótipos das populações africanas e brasileira de <i>B. ibis</i>	70
5.10. Considerações finais.....	71
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. A espécie alvo e sua biologia

Bubulcus ibis (LINNAEUS, 1758) é conhecida no Brasil pelo nome comum de garça-vaqueira. Essa espécie pertence à família Ardeidae e à ordem Pelecaniformes. Conhecem-se três subespécies diferenciadas pela coloração da plumagem reprodutiva e pelo tamanho (TELFAIR II, 2006). *Bubulcus i. ibis*, cuja distribuição abrange a África, o sul da Europa e oeste da Ásia e que mais recentemente colonizou o Novo Mundo. *Bubulcus i. coromandus* que ocupava ancestralmente a Ásia e que chegou durante o século passado à Oceania. *Bubulcus i. seychellarum* que apresenta uma distribuição restrita ao arquipélago das ilhas Seychelles (ao leste da África) (KUSHLAN; HANCOCK, 2005; KUSHLAN; HAFNER, 2000; TELFAIR II, 2006). Durante o século XX, as populações desta espécie se expandiram tanto em número de indivíduos quanto na área de sua distribuição geográfica, de maneira impressionante, tendo-se atualmente registros dessa ave em quase todo o mundo (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) (Figura 1). A única subespécie que será o foco do presente trabalho é a *Bubulcus ibis ibis*, mas será mencionado o nome da espécie (*B. ibis*).

Figura 1. Distribuição mundial da garça-vaqueira. Colorações diferentes indicam as regiões onde a espécie foi reportada como residente, onde ela não se reproduziu e onde ocorre apenas na temporada reprodutiva



Fonte: KUSHLAN; HANCOCK, 2005

B. ibis pode habitar em áreas úmidas e alagadas, manguezais, campos de pastagem, açudes, granjas, zonas urbanas e até locais de resíduos sólidos (TELFAIR II, 2006; SI

BACHIR et al., 2012a). Essa grande variedade de ambientes, que incluem zonas altamente antropizadas permitem-lhe ocupar nichos que normalmente não são habitados por outras espécies. Essa plasticidade é uma das razões pelas quais *B. ibis* atualmente tenha uma distribuição cosmopolita.

A garça-vaqueira geralmente forrageia em grupo e associada com animais de pastagem (SIEGFRIED, 1971). Essa associação parece ser do tipo comensalismo (HEATWOLE, 1965). Ela tem sido reportada tanto na África como na América e ocorre preferencialmente com animais de grande porte como elefantes, búfalos, zebras, bois e gnus (GRIMES, 1987; BURGER; GOCHFELD, 1989; SICK, 1997). No entanto, foi também reportada a associação dessa espécie com o avestruz comum da mesma forma que com esses grandes mamíferos (KAMLER; SUINYUY; GOULDING, 2008). Como resultado do comensalismo, a captura das presas é energeticamente mais eficiente (SEEDIKKOYA; AZEEZ; SHUKKUR, 2005). Dada essa associação, é bastante provável que a expansão da garça-vaqueira tenha sido favorecida pelo aumento da atividade pecuária tanto na África como na América.

Outra característica de *B. ibis* é seu hábito alimentar generalista. Sua dieta inclui insetos, aranhas, ácaros, répteis, anfíbios e roedores. (FOLK et al. 2000; SI BACHIR, et al., 2001; SHARAH; ALI; MOHAMMED, 2008). Apesar de que a garça-vaqueira prefere os ortópteros, pode capturar outras presas segundo a disponibilidade deles no local e na estação (BELLA; AZEVEDO-JÚNIOR, 2007; SHARAH; ALI; MOHAMMED, 2008). Sendo essa outra das suas qualidades com as quais ela pode-se adaptar a diversos ambientes.

As características reprodutivas deste ardeídeo permitem-lhe variar o período de nidificação, segundo a disponibilidade de alimento. Podem fazer duas posturas por ano e, sob condições favoráveis, podem fazer posturas todos os meses do ano (SICK, 1997). Colocam de 2-5 ovos em uma variedade de árvores, arbustos e até no solo. A reprodução ocorre geralmente em áreas rodeadas por corpos de água, com abundante fauna de insetos (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Devido às suas características reprodutivas podem gerar populações que superam os 260,000 indivíduos num mesmo sítio (Delta Central do Rio Níger na República de Mali em 1995) (KUSHLAN; HAFNER, 2000).

Durante as épocas reprodutivas algumas colônias alcançam grandes densidades tornando o espaço e alimentos escassos. Sob essa pressão, principalmente os juvenis tendem a dispersar-se erráticamente, podendo se afastar grandes distâncias da colônia original em um comportamento conhecido como *wandering* (SIEGFRIED, 1971; BROWDER, 1973; SI BACHIR et al., 2008). Esse fenômeno comportamental se diferencia da migração. Os processos migratórios são realizados com regularidade anual, além de que pelo menos um dos sexos apresenta filopatria (BROWDER, 1973). As migrações de *B. ibis* geralmente são realizadas em pequenas revoadas, em resposta à pressão ambiental, evitando-se os tempos de chuva e de bruma (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

Uma das perguntas que surge ao se estudar espécies invasoras é qual poderia ser o impacto da espécie invasora sobre espécies nativas. *B. ibis* compete com outras espécies de garças com as que co-habita (BURGER, 1978). O comportamento agressivo de *B. ibis* durante a nidificação favorece que essa garça ocupe os locais de maior qualidade em relação às outras espécies (DAMI; BENNETS; HAFNER, 2006). Além disso, pode capturar pequenos filhotes de aves aquáticas (STONE; ANDERSON, 1988). No entanto, é difícil avaliar a magnitude do impacto que ela tem sobre espécies nativas. Apesar disso, em ilhas oceânicas onde as espécies nativas e invasoras disputam sobre um espaço reduzido, esse impacto pode ser mais evidente. Na ilha de Fernando de Noronha, a garça-vaqueira invadiu colônias de espécies nativas como *Sula sula* e deslocou a reprodução às espécies dessa área (BARBOSA-FILHO et al., 2009). Nesse mesmo ambiente, as populações invasoras da garça-vaqueira têm predado o lagarto endêmico *Euprepis atlanticus* que pode ser extinto, caso não haja um controle (SILVA-JR; PERES-JR; SAZIMA, 2005).

Por outro lado, quando a espécie atinge tamanhos populacionais muito altos produz muitos resíduos que podem causar a eutrofização da água e conseqüentemente mudanças no ecossistema (BELLA; AZEVEDO-JUNIOR, 2004; PHILLIPS; WIEDENFELD; SNELL, 2012). Outro ponto negativo é a provável introdução de parasitas e vírus originais da área africana da garça-vaqueira nas outras espécies de garças nativas como *Ardea alba* e *Egretta thula* que nidificam conjuntamente com a espécie em nosso país.

1.2. Processos de invasão e dispersão de *B. ibis*

Uma invasão pode ser descrita por um processo complexo subdividido em uma série de etapas que começa com o transporte de uma espécie para fora da sua área de distribuição natural, seguido da introdução, estabelecimento e dispersão da espécie invasora na nova área (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009). Davis (2009) sugere um outro modelo mais simples para explicar o processo de invasão no qual enfatiza apenas dois passos: a dispersão e o estabelecimento, mas ambos ocorreriam de forma dinâmica e cíclica.

Um dos fatores mais importantes para o sucesso do estabelecimento é a pressão de propágulo (LOCKWOOD; CASSEY; BLACKBURN, 2005; SIMBERLOFF, 2009). Essa pressão é definida pela quantidade de indivíduos (tamanho do propágulo) e pelo número de eventos de introdução (número de propágulos) (LOCKWOOD; CASSEY; BLACKBURN, 2005). A pressão de propágulo determinará ainda a diversidade genética da população introduzida e a intensidade do efeito fundador na população exótica na nova área (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009). Durante uma introdução, o esperado será que apenas uma pequena parte da diversidade genética seja levada para a nova área. No entanto, se os processos de introdução forem sucessivos ou procedentes de várias regiões a quantidade de variação poderá ser inclusive maior do que nas zonas nativas (WILSON et al., 2009).

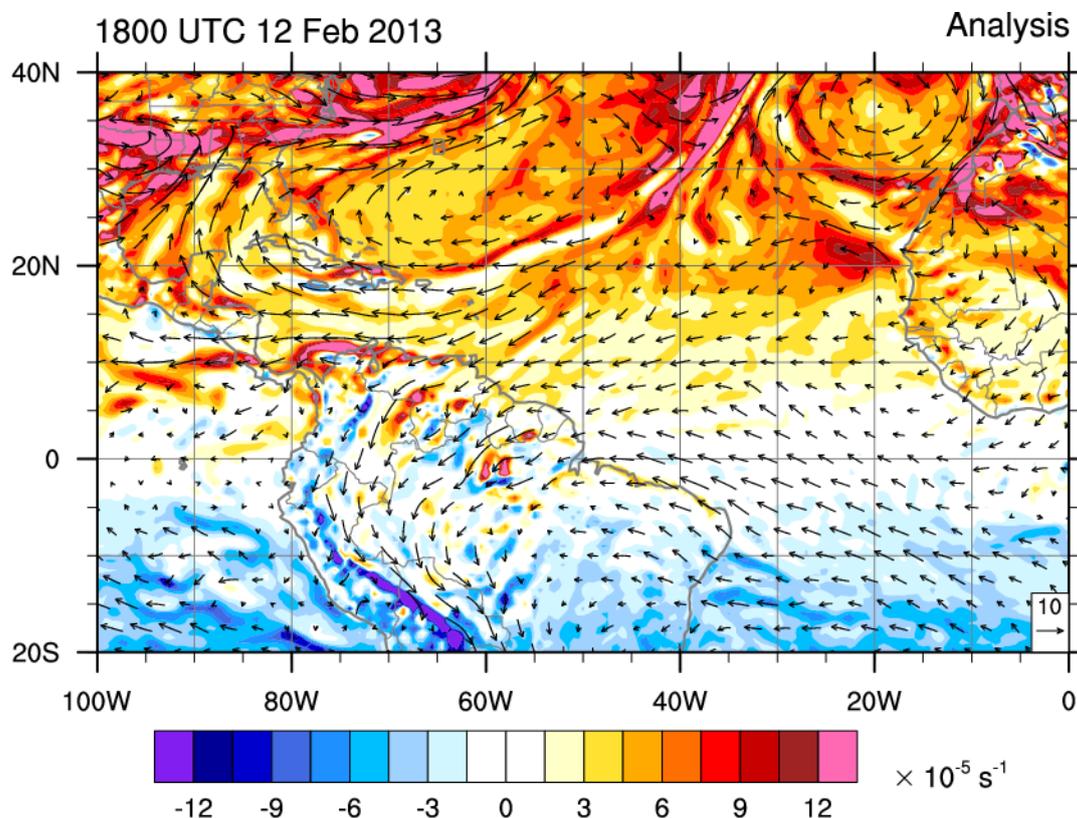
Espécies de aves podem ser introduzidas em habitats exóticos pelo homem ou de maneira natural (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009). Nesse último contexto, *B. ibis* pertence a um pequeno grupo de aves de origem no Velho Mundo, que chegaram ao Novo Mundo, sem aparente intervenção humana (RAPPOLE; DERRICKSON; HUBÁLEK, 2000). Para esse estudo utilizou-se a definição de população invasora como um grupo de indivíduos que se introduziu numa nova área, estabeleceu-se, aumentou em tamanho populacional e dispersou-se geograficamente (ESTOUP; GUILLEMAUD, 2010).

1.2.1. A invasão da garça-vaqueira no continente americano

A hipótese mais aceita supõe que a garça-vaqueira partiu da costa noroeste da África, atravessou o Oceano Atlântico e chegou ao nordeste da América do Sul (TELFAIR II, 1983; TELFAIR II, 2006). Á primeira vista pode se duvidar que uma ave atravesse um

oceano (distância aproximada desde Senegal até a Guiana é de 2800 km), mas dados paralelos detalhados a seguir dão suporte a tal travessia.

Figura 2. Mapa dos ventos do Oceano Atlântico com vorticidade absoluta e 850-hPa de pressão atmosférica.



Fonte: <http://www.atmos.albany.edu/student/carl/weather/maps/vort/atlantic/28.png>.

Aves dessa espécie têm sido encontradas por embarcações, procurando por refúgio, no meio do Oceano Atlântico (SICK, 1997). Além disso, populações da espécie foram encontradas em ilhas com poucos habitantes humanos como na de Santa Helena (1800 km de distância da África) e Tristão da Cunha (2800 km de distância da África), localizadas entre esses dois continentes (SIEGFRIED, 1978; TELFAIR II, 2006). O trajeto seria facilitado pelos ventos alísios, ventos que sopram constantemente dos trópicos para o equador, em baixas altitudes (SICK, 1997; TELFAIR II, 2006). Como se observa na Figura 2, as correntes de ventos sopram desde o oeste da África até o norte de América do Sul a uma pressão de 850 hPa (esperada para altitudes entre 1000 - 2000 m sob condições ambientais de 15°C e 0% de umidade relativa) (<http://www.atmos.albany.edu/student/carl/weather>). Estudos fisiológicos têm demonstrado que essa ave possui a capacidade de manter vôos à velocidade entre 50 – 90 Km/h, à altitude de 1-2 km por mais de 40 horas (MADDOCK; BRIDGMAN, 1992;

BRIDGMAN; MADDOCK, 1994). Esses dados apóiam a hipótese de que esta ave chegou ao continente americano com seus próprios recursos.

Figura 3. Mapa de América do Sul mostrando as datas e países onde foram avistadas pela primeira vez as garças-vaqueiras.



Fonte: TELFAIR II, 1983.

Atualmente a garça-vaqueira se reproduz no Brasil, tendo o *status* de residente, segundo a lista das aves do Brasil 10ª edição (2011) desenvolvida pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO).

1.2.2. A dispersão da garça-vaqueira no continente africano

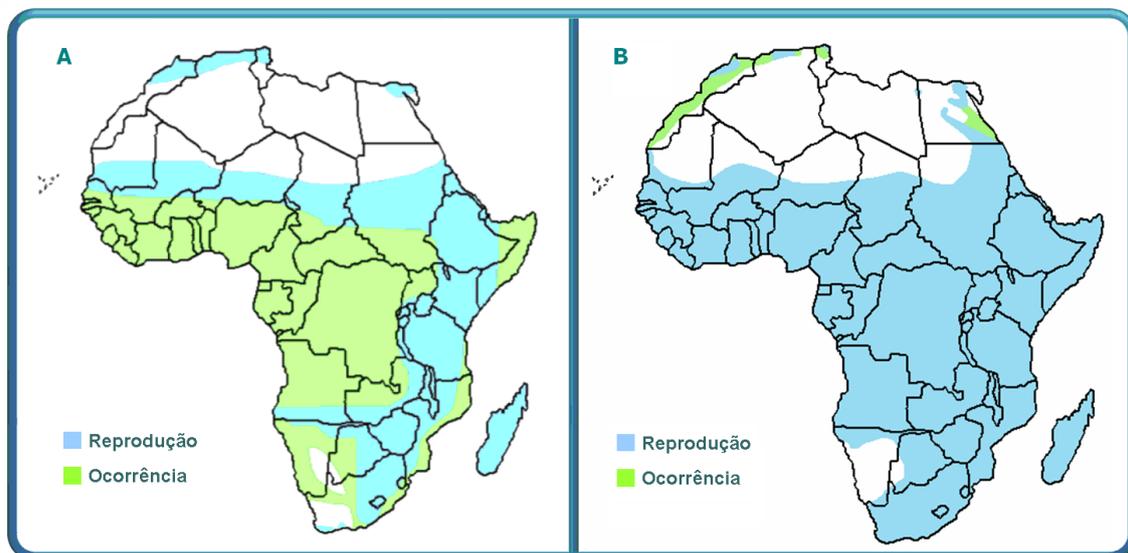
B. ibis estava inicialmente espalhada pela faixa tropical do continente africano (SIEGFRIED, 1978; TELFAIR II, 2006). Chapin (1932) publicou um mapa com as prováveis áreas de reprodução e ocorrência da garça-vaqueira na África, no qual pode-se ver que em algumas áreas onde hoje ocorrem colônias reprodutivas na época só reportavam ocorrência (Figura 4A). Siegfried (1965) publicou registros de reprodução

As primeiras avistagens da espécie na América datam de 1877-1882 no Suriname (na época Guiana Holandesa) e em 1911-1912 na Guiana (Guiana Inglesa) onde se estabeleceram 40 anos depois (TELFAR II, 1983) (Figura 3). No Brasil, a presença desta garça foi reportada pela primeira vez na Ilha de Marajó (região norte) em 1962 (SICK, 1965).

Em poucos anos, a espécie se disseminou até atingir a região mais sul do continente americano, em 1977, e também o norte, alcançando a América Central e do Norte (STRANGE, 1979; CROSBY, 1972).

dessa ave naquela época na região da África do Sul e esses dados foram agregados aos do mapa original da figura 4A. Quando comparadas as distribuições do começo do século XX e a atual, podemos observar que a área de nidificação aumentou, e atualmente abrange praticamente o continente todo, com exceção dos desertos do Sahara e da Namíbia que são representados em branco (Figura 4B). O aumento da densidade populacional e de zonas de reprodução de *B. ibis* ocorreu em várias regiões do globo desde o início do século passado. As populações do sul da África, por exemplo, aumentaram de tamanho populacional entre os anos 1920 – 40 em resposta a uma revolução tecnológica nos sistemas de irrigação, na agricultura e criação de gado nessa região (SIEGFRIED, 1965; KUSHLAN; HANCOCK, 2000). No século XIX na Argélia a espécie tinha um hábitat muito restrito, mas nos últimos 50 anos começou a se expandir e entre os anos 1999 e 2007, sua população triplicou em número nesse país e sua área de distribuição aumentou (BALSAC; MAYAUD, 1962; SI BACHIR et al., 2012 b).

Figura 4. Mapas mostrando a distribuição de *B. ibis* no continente africano. A) Mapa mostrando as áreas de reprodução e ocorrência de *B. ibis* em 1920. B) Mapa mostrando as áreas de reprodução e ocorrência atuais de *B. ibis*.



Fonte: A) CHAPIN, 1932; SIEGFRIED, 1965. B) KUSHLAN; HANCOCK, 2005.

Na região ocidental da África a garça-vaqueira apresenta características migratórias, procurando zonas com precipitação (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). No país de Guiné-Bissau foi catalogada como comum e abundante inclusive durante a época seca, apesar de se ter indícios de ocorrer migração para o sul, durante esse período (NIKOLAUS, 2000; WALSH, 1987). Foi encontrada também nesse país, tanto em zonas próximas da costa como continentais, em ambientes de tipo savana e em áreas de

cultivo (DEMEY, 1995; NIKOLAUS, 2000). No Senegal foi vista de forma abundante nas cidades de Dakar, Louga, Kaolack (SAUVAGE; RODWELL, 1998). Em Gana, a espécie é comum e está amplamente distribuída, com períodos de nidificação na época úmida, entre maio até julho (HELSENS, 1996). Um pouco mais ao sul, no W National Park (Nigéria) foram encontradas com maior frequência durante a época seca, junto com aves que chegam de outros lugares da faixa conhecida como Sahel (CRISLER; JAMESON; BROUWER, 2003). A garça-vaqueira habita também as zonas úmidas do bosque de Kumbira na Angola, que é um *hotspot* de biodiversidade da avifauna africana (SEKERCIOGLU; RILEY, 2005).

As condições ambientais dos verões na África do Sul (novembro-fevereiro) favorecem o incremento de espécies de insetos que são a principal fonte de alimento da garça-vaqueira, fornecendo o habitat adequado para o seu desenvolvimento (SIEGFRIED, 1972). Na província de North-West na África do Sul é avistada de forma abundante (HUDSON; BOUWMAN, 2006). Na ilha de Robben (localizada a 11 km de Cape Town - África do Sul), entretanto, teve pouca ocorrência entre 1977-2001 (UNDERHILL; WHITTINGTON; CALF, 2001).

Durante o inverno (abril - agosto) as populações do sul da África migram em direção à área central do continente (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Em países como o Congo, *B. ibis* tem sido vista frequentemente voando entre os meses de janeiro e abril no Irangi Forest, mas também foi encontrada no ambiente urbano forrageando lixo (RICHARDS, 1982; KIZUNGU, 2001). Na capital de Camarões foi avistada, primeiramente em número pequeno, apenas entre os meses de janeiro a maio, nos anos 1993-5 (QUANTRILL; QUANTRILL, 1998). Scholte, De Kort e Van Werrd (1999) posteriormente a reportaram como uma espécie residente em Camarões durante todo o ano, sendo muito abundante na área de Warza-Lagone, com períodos de nidificação entre junho e agosto.

1.3. A filogeografia e o processo de invasão

A filogeografia analisa os padrões filogenéticos e a distribuição geográfica das populações ou espécies proximalmente relacionadas ou co-distribuídas (AVISE et al., 1987; HICKERSON et al., 2010).

As sequências de DNA mitocondrial têm sido escolhidas como regiões ideais para esse tipo de estudo pela sua suposta carência de recombinação, grande número de cópias por célula e rápida taxa de evolução (AVISE, 2009). Uma recente revisão em estudos filogeográficos de aves demonstra que o DNA mitocondrial fornece resultados mais precisos do que os dados pelos marcadores nucleares, em populações que passaram por curtos períodos de isolamento (ZINK; BARROWCLOUGH, 2008).

Uma das limitações do uso de DNAmít é a possibilidade de recombinação no genoma mitocondrial (ROKAS; LADOUKAKIS; ZOURO, 2003; TSAOUSIS et al., 2005). Outro problema ocorre quando regiões do genoma mitocondrial são inseridas no DNA nuclear (NUMTS). Um estudo no genoma completo de *Gallus gallus*, indicou entretanto, que esses eventos de inserção são muito raros e tem curto comprimento (PEREIRA; BAKER, 2004). Além disso, duplicações de genes do genoma mitocondrial poderiam causar ruído nos estudos de história populacional. Esse tipo de fenômenos tem sido reportado em espécies de aves (CHO et al., 2009; MORRIS-POCOCK et al., 2010). Uma outra limitação do uso desse marcador se deve ao fato que ele representa apenas a herança uniparental materna, não representa a história de toda a população (HARE, 2001).

Os marcadores nucleares possuem algumas desvantagens como sua menor taxa de evolução em comparação aos mitocondriais (BROWN, 1983). Apresentam, portanto uma menor resolução para determinar processos populacionais recentes (estruturação genética, flutuações demográficas) (ZINK; BARROWCLOUGH, 2008). No entanto, se é possível avaliar vários *loci*, a precisão da estimativa de parâmetros populacionais é aumentada (BRITO; EDWARDS, 2008). A recombinação é um fator que pode enviesar os resultados, mas a solução consiste em identificar e eliminar as regiões com presença de recombinação na análise. O problema de se determinar a fase alélica dos indivíduos heterozigotos pode ser resolvido com estratégias estatísticas usando também o programa PHASE (STEPHENS et al., 2001; STEPHENS; DONNELLY, 2003) ou com a clonagem dos genes gênicos nesses indivíduos.

Alguns exemplos que ilustram a utilidade das ferramentas genéticas nos estudos de invasões serão citados a seguir:

O primeiro deles teve como espécie alvo a *Rana catesbeiana*, originária da América do Norte que foi introduzido na Europa no século XIX. Ficetola, Bonin e Miaud (2008) compararam as distribuições geográficas da variação genética do gene mitocondrial da Citocromo oxidase b na região de origem e na colonizada recentemente. Os autores determinaram o número de indivíduos e de introduções, além das populações-fonte.

Um panorama um pouco distinto foi o apresentado por Fleischer e col. (2008) que estudaram *Corvus corax*, cujas populações sofreram um incremento rápido desde os anos 50, no deserto de Mojave (Califórnia e Nevada, USA). Com o intuito de determinar se o aumento populacional tinha sido gerado pela migração das populações das regiões vizinhas ou se era devido ao crescimento das populações do deserto. Eles estudaram a dinâmica do fluxo gênico nessas áreas, usando a região controle do DNAmít e oito *loci* microsátélites. Embora os resultados fornecidos por ambos os marcadores foram de diferentes magnitudes, as tendências de fluxo gênico entre o oeste e o noroeste do deserto (Califórnia) se mantiveram. O estudo concluiu que o incremento demográfico foi gerado pela invasão das populações vizinhas da costa sul de Califórnia.

Rollins e col. (2011) estudaram a espécie *Sturnus vulgaris*, introduzida aproximadamente há 60 anos na Austrália. O estudo consistiu em avaliar os padrões geográficos da diversidade genética entre as populações do sudeste (registrada como a primeira introdução), do leste (recente colonização) da Austrália, e da Grã Bretanha (população de origem) para procurar de vestígios de eventos demográficos deixados no genoma. Eles usaram a região controle do DNA mitocondrial de amostras recentes e de museu. Os autores conseguiram determinar padrões de expansão espacial e de miscigenação antes da introdução. Comparando esses resultados da região controladora e de microsátélites num estudo prévio (ROLLINGS et al., 2009) concluíram que a região controladora do DNAmít oferece maior informação para estudar processos de invasão.

Pelos exemplos expostos está justificada a utilização do DNA mitocondrial no estudo dos processos de invasão. A inclusão do marcador nuclear permitirá reforçar ou refutar algumas conclusões obtidas pelos marcadores mitocondriais, sobretudo na determinação das prováveis populações de origem.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Compreender o histórico da invasão e a colonização do continente sul americano, em especial do território brasileiro pela espécie *B. ibis* pela abordagem genética.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar como a diversidade genética das populações de garça-vaqueira está distribuída no Brasil e nas regiões de distribuição geográfica original na África.
- Determinar pela análise filogeográfica qual a origem africana das populações sul americanas e estabelecer uma provável rota de chegada ao continente americano
- Detectar possíveis eventos demográficos históricos que possam ter influenciado o padrão de distribuição da diversidade genética atual do ardeídeo em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra

Amostras de sangue e pena de *B. ibis* foram coletadas em quatro regiões do Brasil (norte, nordeste, sudeste e sul) e em sete países da África (Cabo Verde, Senegal, Guiné Bissau, Gana, Nigéria, Quênia e África do Sul.) (Tabela 1, Figuras 5 e 6). Todas as amostras foram provenientes de colônias reprodutivas, com exceção da amostra da cidade de Praia (Cabo Verde), constituída de penas coletadas de um pouso, e da amostra de Fernando de Noronha, constituída de amostras de sangue, coletada de adultos capturados em locais de forrageamento. Ambas as amostras são de ilhas posicionadas entre a costa africana e a brasileira. Essas duas amostras foram incorporadas unicamente à análise do processo de colonização. O gene da região controle do DNAmIt de todas as amostras de penas e das amostras de sangue de Fernando de Noronha, Pernambuco, São Paulo e Rio Grande do Sul foram amplificadas e sequenciadas por Moralez – Silva, 2013 e foram incluídas nas análises desse estudo.

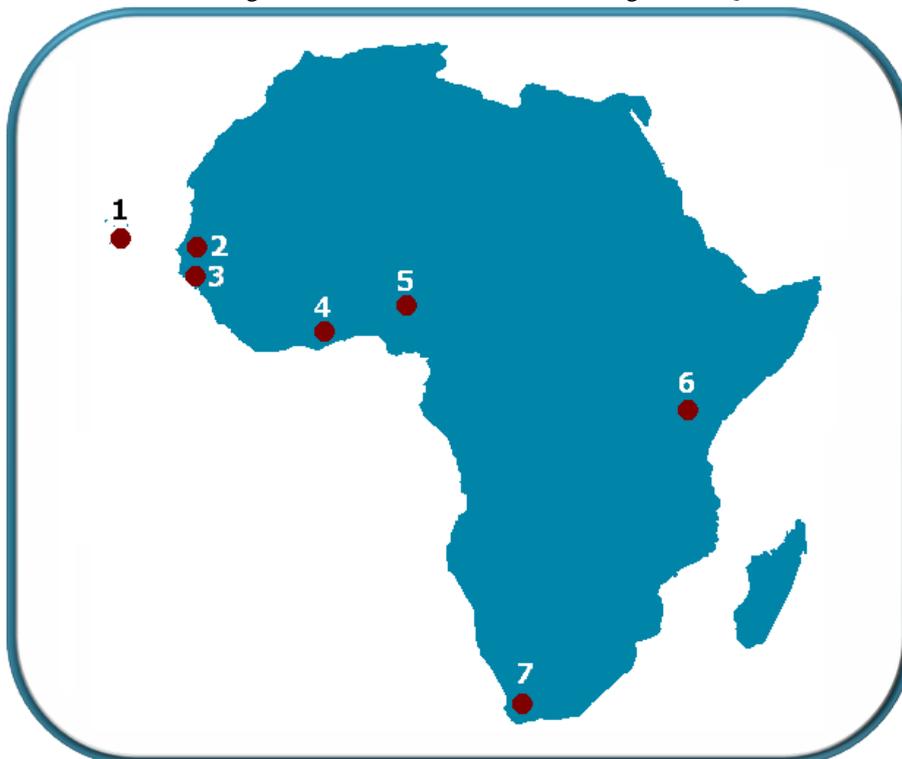
Tabela 1. Descrição geográfica dos locais de coleta.

Pais	Colônia	Abreviatura	Latitude	Longitude	Tipo de tecido
Guiné Bissau	Ilha de Bandim	IB GB	N 12°07'10.92"	O 015°40'12.84"	Sangue
Guiné Bissau	Atanque	AT GB	N 12°25'47.64"	O 016°05'25.98"	Sangue
Guiné Bissau	Ilha do Patrão	IP GB	N 11°15'49.62"	O 015°46'28.80"	Sangue
Senegal	Zoo – Dakar	ZOO SE	N 14°43'39.18"	O 017°25'53.70"	Sangue
Senegal	Parc Somone	PS SE	N 14°29'51.66"	O 017°04'55.86"	Sangue
Senegal	Thies	TH SE	N 14°47'47.34"	O 016°55'52.98"	Sangue
Gana	Korle Lagoon	KL GN	N 05°32'17.51"	O 000°13'12.14"	Sangue - Pena
Gana	Bansom Colony	BC GN	N 05°06'28.50"	O 001°54'12.60"	Sangue
Nigéria	Fobour Kasa	FK NG	N 09°51'51.62"	E 009°02'44.95"	Sangue
Nigéria	Kurra Falls	KF NG	N 09°25'53.51"	E 009°00'02.27"	Sangue
Nigéria	Fusa	FU NG	N 09°52'47.68"	E 008°58'15.49"	Sangue
Nigéria	Toro	TO NG	N 10°02'04.99"	E 009°02'19.10"	Sangue
África do Sul	Paarl	PA AS	S 33°41'03.06"	E 018°59'01.86"	Sangue
África do Sul	Boschenmeer Golf State	BG AS	S 33°45'00.00"	E 018°59'00.00"	Sangue
África do Sul	Rondevlei	RO AS	S 34°03'45.54"	E 018°29'43.5"	Sangue
Quênia	Nairobi	NA Q	S 01°19'00.00"	E 036°51'00.00"	Pena
Cabo Verde	Praia	CV	S 14°56'00.00"	E 23°31'00.00"	Pena
Brasil	Pará	PA N-BR	S 00°30'19.50"	O 049°13'46.08"	Sangue
Brasil	Rio Grande do Norte	RN NE-BR	S 05°37'27.72"	O 036°52'33.6"	Sangue
Brasil	Fernando de Noronha	FN NE-BR	S 3°52'00.00"	O 032°26'00.00"	Sangue
Brasil	Pernambuco	PE NE-BR	S 8°52'00.00"	O 036°28'00.00"	Sangue
Brasil	São Paulo	SP SE-BR	S 22°30'00.00"	O 047°35'00.00"	Sangue
Brasil	Rio Grande do Sul	RS S-BR	S 30°01'00.00"	O 051°31'00.00"	Sangue

Figura 5. Mapa do Brasil mostrando os locais coletados, cada ponto representa uma colônia reprodutiva. 1. Pará. 2. Rio Grande do Norte. 3. Ilha de Fernando de Noronha. 4. Pernambuco. 5. São Paulo. 6. Rio Grande do Sul.



Figura 6. Mapa da África mostrando os países coletados. Cada ponto representa duas-três colônias reprodutivas amostradas em cada país, com exceção de Cabo Verde que é uma amostra de um pouso (ver Tabela 1) 1. Cabo Verde. 2. Senegal. 3. Guiné Bissau. 4. Gana. 5. Nigéria. 6. Quênia. 7. África do Sul.



3.2. Métodos

3.2.1. Extração do DNA

O DNA das amostras de sangue da garça-vaqueira foi extraído utilizando-se um protocolo modificado de Sambrook e Russell (2001). Misturou-se 30µl de papa hemácias com 220µl de tampão de lise (Tris-HCl 10mM, pH 8.5 e KCl 50mM) e 20µl de proteinase K (20mg/ml). A mistura foi incubada em banho-maria por aproximadamente 12 horas à uma temperatura de 55°C. Posteriormente, as amostras foram extraídas por separação de fase e centrifugadas três vezes (12000rpm por 10' cada uma): após a mistura e agitação suave com 250µl de fenol, com 250µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e com 250µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após cada separação, foi resgatada a fase aquosa. O DNA foi precipitado com adição de acetato de sódio 3M (10% do volume) e etanol absoluto gelado (250% do volume da solução aquosa contendo o DNA) e permanência a -18°C (por no mínimo 60'). Após a precipitação, foram realizadas duas lavagens do DNA com 750µl de álcool 70%. Após a primeira foi feita uma centrifugação a 12000rpm por 30' e após a segunda, outra à 12000rpm por 10', descartando-se sempre o sobrenadante. Após o descarte do etanol, os tubos foram deixados abertos por 12 horas à temperatura ambiente para que o restante de álcool se evaporasse. O DNA foi ressuscitado em 50µl, 75µl ou 100µl de água milliQ autoclavada, o volume foi estimado de forma proporcional ao tamanho do *pellet*. Cada solução de DNA estoque foi quantificada aplicando-se 2µl no NanoVue Spectrophotometer (GE) e em seguida diluída com água para 20ng/µl.

3.2.2. Amplificação do DNA

3.2.2.1. RC do DNAmít

Um gene de aproximadamente 700pb da região 5' da região controladora do DNAmít (RC), foi amplificado usando-se os *primers* Ardea L3: CACCTAACACAAAACACAAAC e Ardea H1: CGTCTGTATGCTCACGTCTTC, desenvolvidos por Corrêa, T. C. (2009). Cada reação continha 20ng de DNA genômico, tampão da Taq Polimerase (Tris-HCl 80mM e (NH₄)₂SO₄ 20mM), 2mM de MgCl₂, 0.75U de Taq Polimerase, 200µM de cada desoxinucleotídeo, 0.4µM de cada iniciador e água estéril para completar o volume final de 12.5µl. As condições do programa de PCR *touchdown* foram seguidas segundo o protocolo de Corrêa, T. C. (2009): desnaturação inicial de 96°C por 5'; 5 ciclos de 94°C por 30'', 60°C por 30'', 72°C por 60''; seguido de 21 ciclos de 94°C por 30'', 58°C por 30''(diminuindo 0.1°C a cada ciclo), 72°C por

60''; e um passo de extensão final à 72 °C por 10' no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® ou no Applied Biosystems Veriti™.

3.2.2.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít

A região completa das ATPases 6 e 8 do DNAmít com 815pb foi amplificada usando-se os *primers* L-Lys: 5'- CTATGTAACAGCGCTAGCCTT - 3' e H-COIII: 5'- GTGGTAGGAGTGTGCTTGGT- 3', desenvolvidos neste estudo. Esses oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências dos genomas mitocondrias completos de *Egretta eulophotes* (Ciconiiformes: Ardeidae) (NC_009736), *Ardea novaehollandiae* (Ciconiiformes: Ardeidae) (DQ780878), *Nycticorax nycticorax* (Ciconiiformes: Ardeidae) (JN018412), *Ixobrychus cinnamomeus* (Ciconiiformes: Ardeidae) (HQ690247) e *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae) (AB104902.1). Cada reação de PCR com volume final de 12.5µl continha: 20ng de DNA genômico, tampão da Taq Polimerase (Tris-HCl 80mM e (NH₄)₂SO₄ 20mM), 2mM de MgCl₂, 0.75U de Taq Polimerase, 200µM de cada desoxinucleotídeo, 0.4 µM de cada iniciador e água estéril. As condições de cada reação foram as seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 5', seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30'', 62°C por 30'', 72°C por 1' e uma extensão final de 72°C por 10' no termociclador Applied Biosystems Veriti™.

3.2.2.3. Íntron 5 do gene nuclear *Transforming growth factor beta-2*

Foi amplificado o íntron 5 do gene *Transforming growth factor beta-2* (TGFB2), usando-se os *primers* E4: GAAGCGTGCTCTAGATGCTG e E6: AGGCAGCAATTATCCTGCAC, com um tamanho esperado de aproximadamente 540pb (PRIMMER *et al.*, 2002). Cada reação de PCR com o volume final de 12.5µl continha: 20ng de DNA genômico, tampão da Taq Polimerase (Tris-HCl 80mM e (NH₄)₂SO₄ 20mM), 2mM de MgCl₂, 0.75U de Taq Polimerase, 200µM de cada desoxinucleotídeo, 0.4 µM de cada *primer* e água estéril. As condições de cada reação foram: desnaturação inicial de 95°C por 1', seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30'', 62°C por 30'', 72°C por 45'' e uma extensão final de 72°C por 10' nos termocicladores Eppendorf Mastercycler Gradient® ou Applied Biosystems Veriti™.

3.2.3. Avaliação da amplificação por PCR

Os produtos de PCR foram separados após eletroforese horizontal a 80V por 30' em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e foram visualizados num transiluminador. O tamanho dos genes amplificados foi verificado comparando-se sua migração com a do padrão de peso molecular 100pb (DNA Ladder, Fermentas).

3.2.4. Purificação dos produtos de PCR

Os genes amplificados foram purificados com a adição de enzimas segundo o protocolo: a 8µl de produto de PCR foram adicionados 10U de EXO I (Exonuclaease I, GE®) e 1U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE®). Essa mistura foi incubada à 37°C por 60', seguida de incubação à 80°C por 15' no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® ou Applied Biosystems Veriti™. A qualidade e a quantidade do DNA foram avaliadas após eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.5. Sequenciamento do DNA

As amostras purificadas foram diluídas para uma concentração de 50ng/µl. Foram realizadas reações de sequenciamento usando-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) . A 1µl de DNA do produto de PCR purificado (50ng/µl), foram misturados 1µl de Big-Dye, 1µM de iniciador, tampão Tris-HCl 60mM pH 9.0, contendo 1.5mM MgCl₂ e água milli-Q até se completar 10µl de volume final. As reações foram realizadas segundo os protocolos de amplificação já descritas, no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® ou Applied Biosystems Veriti™. Os eletroferogramas foram gerados utilizando-se o sequenciador capilar automático ABI Prism 3730, do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

3.2.6. Análise dos dados

3.2.6.1. Análise das sequências de DNA

3.2.6.1.1. Edição dos eletroferogramas

O programa Codon Code Aligner version 4.0 (CodonCode Corporation, Centerville MA, USA) foi utilizado na edição dos eletroferogramas obtidos após corrida em sequenciador capilar. As posições nas sequências analisadas com a presença de dois picos no íntron do gene nuclear TGFB2 foram consideradas em heterozigose.

3.2.6.1.2. Validação das sequências de DNA

Cada sequência foi comparada com a base de dados de sequências de DNA do GenBank com o algoritmo Megablast (ZHANG *et al.*, 2000; MORGULIS *et al.*, 2008), para se descartar o uso de sequências decorrentes de amplificações cruzadas ou de produtos inespecíficos. Sequências de DNA que não produzissem nenhum *hit* com as do GenBank, que apresentassem maior semelhança com espécies diferentes as da Classe Aves ou com regiões genéticas diferentes a esperada, seriam descartadas da análise.

3.2.6.1.3. Alinhamento das sequências

As sequências de DNA de cada marcador foram alinhadas com o uso do programa Clustal X2 (LARKIN *et al.*, 2007). Cada alinhamento foi checado visualmente usando-se o programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011).

3.2.6.1.4. Análise de possíveis homoplasias da RC do DNAmít

Para evidenciar se ocorreu saturação mutacional foi traçado um gráfico do número de mutações em relação à distância genética, usando-se o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P) no programa DAMBE (XIA; XIE, 2001). Caso ocorra saturação mutacional nas transições ou transversões, as curvas atingirão um *plateau*. Foi construído ainda um gráfico da diversidade nucleotídica encontrada nos genes de 20pb ao longo da sequência estudada, usando-se o programa DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Esse gráfico permitiu evidenciar as regiões com maior variabilidade, onde podem ocorrer os sítios homoplásticos. Além disso, realizou-se o teste de quatro gametas de Hudson e Kaplan (1985) para se determinar os pares de sítios que podem formar quatro tipos de gametas. O teste foi desenvolvido originalmente para se determinar o menor número de eventos de recombinação nas amostras de DNA, mas, nesse estudo foi utilizado para evidenciar possíveis sítios com homoplasias.

3.2.6.1.5. Resolução da fase gamética dos alelos do TGFB2

O programa PHASE v2.1.1 (STEPHENS *et al.*, 2001; STEPHENS; DONNELLY, 2003) inserido no DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi utilizado para fornecer a combinação dos alelos mais prováveis de cada sequência, isto é a sua fase gamética. As posições que foram resolvidas com uma probabilidade menor do que 0.90 foram

tratadas como *missing data* e as restantes foram nomeadas segundo a nomenclatura IUPAC.

3.2.6.1.6. Teste de Recombinação

Com o intuito de se investigar se eventos de recombinação explicavam a variação encontrada nos genes gênicos estudados foram realizados três diferentes testes no programa RDP3 (MARTIN et al., 2010). Os métodos analisados foram RDP (MARTIN; RYBICKI, 2000), GENECONV (PADIDAM; SAWYER; FAUQUET, 1999; SAWYER, 1989), MAXCHI (SMITH, 1992; POSADA; CRANDALL, 2001).

3.2.6.2. Estimativas dos parâmetros populacionais

Nas análises com populações africanas, a amostra de Cabo Verde não foi incluída porque por ser proveniente de um pouso e poderia envolver indivíduos de outras regiões. Essa amostra foi, entretanto, incluída nas análises feitas com amostras do Brasil e África.

3.2.6.2.1. Diversidade Genética

Pelo programa DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foram determinados o número de sítios segregantes (S), o número de haplótipos (H), os índices de diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) e as duas estimativas do parâmetro θ ($\theta_{(\pi)}$ e $\theta_{(s)}$) para cada população. Foi calculado para cada índice o desvio padrão pressupondo a não ocorrência de recombinação. A diversidade haplotípica é a probabilidade de dois haplótipos escolhidos aleatoriamente serem diferentes na amostra (NEI, 1987). A diversidade nucleotídica é a média do número de diferenças das sequências comparadas par a par, ponderada pelo número de sítios de nucleotídeos do *locus* (NEI, 1987). O parâmetro θ é definido como sendo igual a $4N_e\mu$ para um gene autossômico de um organismo diplóide, onde N_e é o tamanho efetivo e μ é a taxa de mutação por sítio por geração. O $\theta_{(\pi)}$ é calculado no equilíbrio de sítios infinitos, sendo igual à média do número de diferenças das sequências comparadas par a par (TAJIMA, 1983). $\theta_{(s)}$ é estimado no equilíbrio de sítios infinitos a partir do número de sítios segregantes (S) e do tamanho amostral (WATTERSON, 1975; TAJIMA, 1993). Os valores dos índices de diversidade genética achados nas populações africanas e brasileiras foram comparados estatisticamente mediante o teste de Mann-Whitney.

3.2.6.2.2. Testes de neutralidade

Foram aplicados os testes de neutralidade de Tajima (D), de Fu (Fs) e de Ramos-Onsins e Rozas (R2), pelo programa DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). O D de Tajima (TAJIMA, 1989) compara as estimativas de θ ($\theta_{(\pi)}$ e $\theta_{(s)}$) usando um modelo de sítios infinitos sem recombinação. O Fs de Fu (FU, 1997) avalia a probabilidade de se observar uma amostra neutral aleatória com um número de alelos similar ou menor do que o observado, usando-se o $\theta_{(\pi)}$ como estimador de θ . O Fs está baseado também em um modelo de sítios infinitos sem recombinação. O R2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002) está baseado na diferença entre o número de mutações em um *locus* de um único indivíduo (*singleton*) e a média do número de diferenças das sequências comparadas par a par. Dos testes anteriores, o Fs e R2 são os mais potentes na detecção dos desvios demográficos (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002). A significância estatística dos testes de neutralidade foi calculada usando-se 1000 réplicas de simulações de coalescência e mantendo-se fixo o número de sítios segregantes. As simulações foram computadas usando-se o modelo neutro de sítios infinitos e pressupondo-se a estabilidade demográfica de uma população de tamanho grande (HUDSON, 1990). Os valores de significância estatística dos testes de neutralidade foram corrigidos com a metodologia descrita por Benjamini e Hochberg (1995) no programa SGoF+ (CARVAJAL-RODRIGUEZ; DE UÑA-ALVAREZ, 2011).

3.2.6.2.3. Distribuição das diferenças pareadas nucleotídicas dos haplótipos (*mismatch distribution*)

As *mismatch distributions* foram obtidas para cada *locus* e população estudados pelo programa DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). É esperado que a *mismatch distribution* apresente forma multimodal em populações em equilíbrio demográfico e forma unimodal em populações que sofreram expansão populacional recente (ROGERS; HARPENDING, 1992). Para avaliar se ocorreu crescimento-diminuição da população (ROGERS; HARPENDING, 1992) foi também calculado o parâmetro estatístico *raggedness* (rg) (HARPENDING, 1994). Valores altos de rg são esperados nas distribuições multimodais (estabilidade demográfica) e valores baixos de rg em distribuições com forma unimodal (expansão demográfica). A significância estatística foi calculada usando-se simulações de coalescência. O modelo de crescimento-diminuição populacional apresenta três parâmetros: tempo em unidades de tempo mutacional desde o crescimento-diminuição demográfico (τ) ($\tau = 2ut$; sendo “u” a taxa

de mutação por *locus* e geração e “t” o tempo em gerações) e os valores de θ antes (inicial) e após (final) o crescimento-diminuição populacional. Os valores de θ inicial e τ foram estimados, fixando-se o θ final como infinito (ROGERS, 1995). Também foi calculada a soma das diferenças entre o observado e esperado para o modelo de expansão demográfica ao quadrado (SSD), usando-se o programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Com esse mesmo programa foi estimada a significância com teste de 10000 permutações. Os valores de significância estatística do τ e SSD foram corrigidos, segundo a metodologia descrita por Benjamini e Hochberg (1995) no programa SGoF+ (CARVAJAL-RODRIGUEZ; DE UÑA-ALVAREZ, 2011).

3.2.6.2.4. Mudanças ao longo do tempo dos tamanhos efetivos populacionais

A metodologia do *Bayesian Skyline Plot* (DRUMMOND et al., 2005) foi aplicada para se investigar sobre a história demográfica das populações africanas de *B. ibis*, usando-se o programa Beast 1.7.4 (DRUMMOND et al., 2012). Essa abordagem permite analisar as flutuações dos tamanhos efetivos ao longo do tempo, além de calcular os intervalos com 95% de confiança da tendência demográfica. O programa Beast realiza uma análise estimando as genealogias com uma abordagem bayesiana. O *Bayesian Skyline Plot* foi obtido usando-se o modelo HKY. Foi utilizada uma taxa de mutação igual 1×10^{-8} substituições/sítio/ano para a região ATPase 6 e 8, pressupondo-se um relógio molecular reportado para aves como 2% de divergência por milhão de anos (WEIR; SCHLUTER, 2008). Dado que a RC do DNAmít possui uma variação maior do que resto do genoma mitocondrial não pode ser usada a mesma taxa de substituição das ATPases 6 e 8. Usar uma taxa de substituição reportada na literatura também seria incorreto por que foram retiradas algumas posições da análise. A taxa de mutação reportada por Weir e Schluter (2008) foi corrigida para a RC do DNAmít. Essa correção consistiu em usar o princípio de que as taxas de mutação dos genes deveriam ser proporcionais às divergências intraespecíficas. As distâncias genéticas intraespecíficas estimadas usando-se o modelo Kimura 2 parâmetros e o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) foram 0.0013 e 0.0008 para RC e ATPase 6 e 8, respectivamente. A taxa de substituição da RC do DNAmít corrigida foi $1 \times 10^{-8} \times 0.0013/0.0008 = 1.63 \times 10^{-8}$ substituições/sítio/ano. A taxa de mutação utilizada para o íntron nuclear foi 1.35×10^{-9} (ELLEGREN, 2007; SLY et al., 2011). As corridas foram realizadas pressupondo um relógio molecular estrito. Cada corrida consistiu de uma cadeia de MCMC de tamanho igual a 100 000 000, amostrando as genealogias e parâmetros a cada 1000 passos.

3.2.6.2.5. Estruturação populacional

No programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foram calculados os valores de F_{ST} par a par entre as populações estudadas. A significância estatística foi estimada, usando-se o valor de p crítico de 0.05 e realizando-se um teste de 10000 permutações. Os valores de significância estatística foram corrigidos, segundo a metodologia descrita por Benjamini e Hochberg (1995) no programa SGoF+ (CARVAJAL-RODRIGUEZ; DE UÑA-ALVAREZ, 2011). Essa correção evita o erro tipo I (falso positivo), produto das comparações múltiplas. Para se verificar se as populações estão geneticamente estruturadas foi também utilizada a AMOVA (Análise MOlecular de VAriância) segundo a metodologia proposta por Excoffier e col. (1992). A AMOVA permitiu verificar como a variância total está distribuída entre os níveis hierárquicos. Foram feitas duas comparações para cada marcador: 1) Os níveis hierárquicos das colônias e da população total da África. 2) Os níveis hierárquicos das colônias, das colônias agrupadas em países da África e da população total da África. Para cada nível hierárquico foi calculada uma covariância, a qual foi utilizada para se estimar os índices de fixação de Wright (1951, 1965) e a porcentagem de variação explicada pela divisão da população em cada nível hierárquico. Além disso, foi testado o modelo de isolamento por distância realizando-se o teste de Mantel no mesmo programa. Esse teste foi usado para verificar se havia correlação significativa entre as matrizes de distância genética e de distância geográfica. Para corroborar essa correlação as análises foram feitas com dois conjuntos de dados: 1) Todas as colônias da África, 2) todas as colônias da África exceto as da África do Sul. Esse último teste foi rodado para verificar se não existia nenhum viés causado pelas populações geograficamente mais afastadas. As distâncias geográficas foram estimadas em quilômetros usando-se a ferramenta de medição no programa Google Earth.

3.2.6.2.6. Rede de haplótipos

Foram construídas redes de haplótipos com a aplicação do programa Networks 4.6 e usando-se a metodologia *median joining* (BANDELT et al., 1999). Na rede, cada haplótipo foi representado de forma circular, cujo diâmetro é proporcional à ocorrência dele na amostra. Além disso, cada haplótipo teve sua ocorrência dividida proporcionalmente à presença dele nas populações amostradas, cada uma delas representada por uma cor. Foram construídas duas redes para cada gene uma com apenas as amostras africanas e a outra que compara as amostras africanas e brasileiras.

4. RESULTADOS

4.1. Análise das sequências e alinhamento múltiplo

4.1.1. Validação das sequências de DNA

4.1.1.1. RC do DNAmít

A comparação das sequências obtidas de *B. ibis* com as depositadas no GenBank revelaram que os 10 primeiros *hits* corresponderam à RC do DNAmít de ardeídeos com uma cobertura entre 50 e 75%, com *e-value* entre 9.10^{-73} e 10^{-96} e a máxima identidade entre 80 e 85%. Esses resultados são evidências de que as sequências de DNA obtidas nesse estudo não são produtos de contaminação.

4.1.1.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít

Os 10 primeiros *hits* com o Genbank corresponderam aos genes das ATPases 6 e 8 de aves. Entre esses, cinco pertenceram à família Ardeidae, três à Pelicanidae, uma à Gruidae, uma à Gaviidae, com uma cobertura entre 80 e 99%, com *e-value* de zero e máxima identidade entre 83 e 91%. Esses dados corroboram que a região sequenciada do DNA corresponde à esperada.

4.1.1.3. TGFB2 do DNA nuclear

Os 10 primeiros *hits* com o Genbank corresponderam ao íntron 2 do gene TGFB2 de aves. Das sequências com maiores *scores* duas pertenciam à família Ardeidae, uma à Ciconiidae, uma à Spheniscidae, duas à Accipitridae, duas à Hydrobatidae, uma à Balaenicipitidae e uma à Phoenicopteridae. A porcentagem de cobertura encontrada variou de 97 a 100%, o *e-value* foi zero e a máxima identidade variou entre 92 e 99%.

4.1.2. Análise de homoplasias e características do alinhamento da RC

Um fragmento de 616pb da RC do DNA foi analisado para um conjunto de 609 indivíduos de garça-vaqueira (432 da África e 177 do Brasil). Desse total de sequências de *B. ibis* analisadas, um conjunto de 161 (46 africanas e 115 brasileiras) foi obtido por Moralez-Silva E. N. (2013) e analisado conjuntamente com os dados produzidos nesse estudo. Foi encontrada variação em 7.06% dos sítios de nucleotídeos e a presença de duas posições com *indels*. Dada a alta variação encontrada na região não-codificante do DNAmít, é razoável supor que algumas posições apresentem homoplasias. O gráfico do número de transições e transversões versus a distância genética mostrou que nem as

transversões ou transições alcançaram o *plateau* característico da saturação mutacional (Figura 7). Por outro lado, o gráfico de diversidade nucleotídica ao longo da sequência do fragmento evidenciou que existem algumas regiões que mostram maior variação quando comparadas às outras do mesmo fragmento estudado (entre os sítios 150-250 e 300-320) (Figura 8).

Figura 7. Gráfico do número de transições e transversões versus a distância genética par a par, calculada segundo o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P).

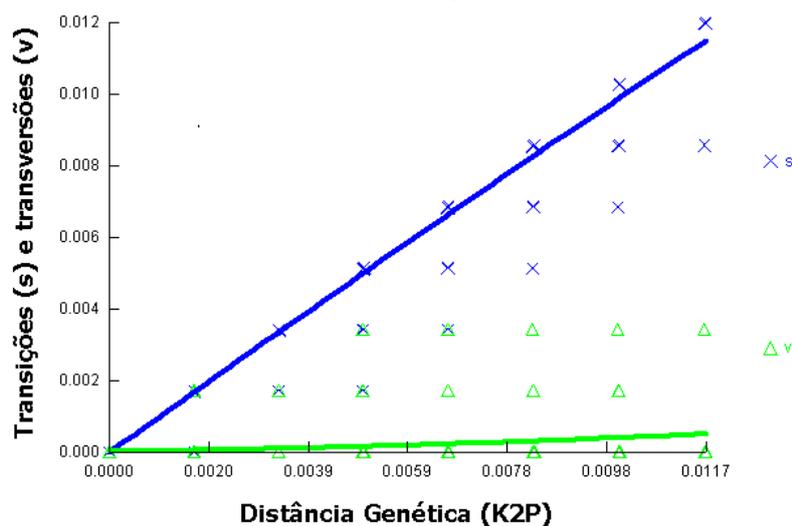
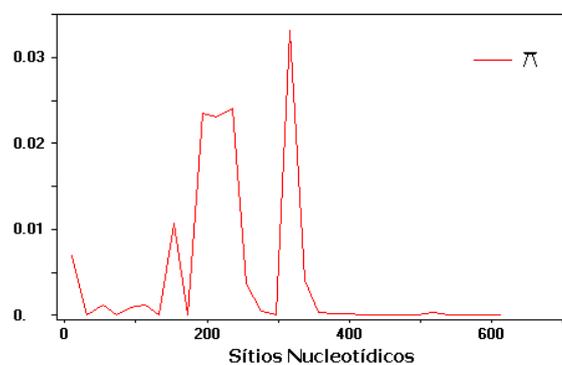


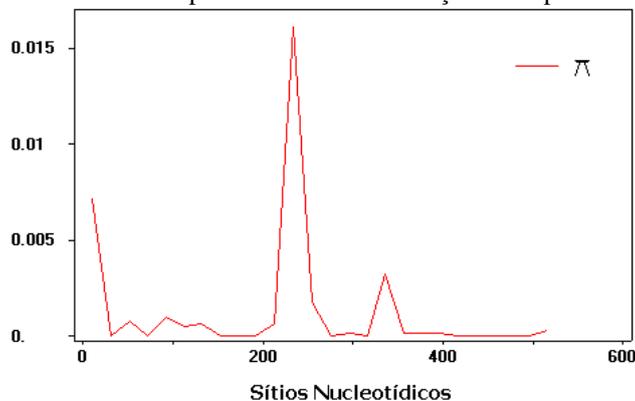
Figura 8. Diversidade nucleotídica da RC do DNAmít de *B. ibis* encontrada ao longo do gene analisado.



O teste de recombinação de Hudson e Kaplan (1985) mostrou 55 pares de sítios com quatro tipos de gametas. Esses pares de sítios envolviam as posições 9, 14, 54, 56, 157, 184, 220, 232, 258, 259, 315, 317, 320, 337, 339 e 347. Os sítios localizados nas regiões de variabilidade alta do fragmento (Figura 8) e que formaram quatro tipos de gametas com pelo menos outros dois sítios foram retirados das análises posteriores. As posições que preenchem esses dois requisitos foram: 157, 184, 220, 232, 258, 315, 317, 320 e 337. O gráfico da diversidade nucleotídica após a retirada destes sítios, mostrou apenas um pico de variação (entre as posições 200-250), mas com a metade da altura máxima

achada anteriormente (Figuras 8 e 9). Após esse expurgo, o teste de Hudson e Kaplan (1985) não detectou nenhum par de sítios envolvendo quatro tipos de gametas.

Figura 9. Diversidade nucleotídica da RC do DNAmít de *B. ibis* avaliada a cada 20 nucleotídeos no gene da RC, após a retirada dos sítios com suspeita de conter informação homoplástica.



Além da retirada dos sítios com suspeita de conter informação homoplástica foi também retirada das análises posteriores uma região com 81 bases não-variáveis na porção 3' do gene. Após esse tratamento, o alinhamento da RC do DNAmít apresentou 526pb e 33 posições variáveis.

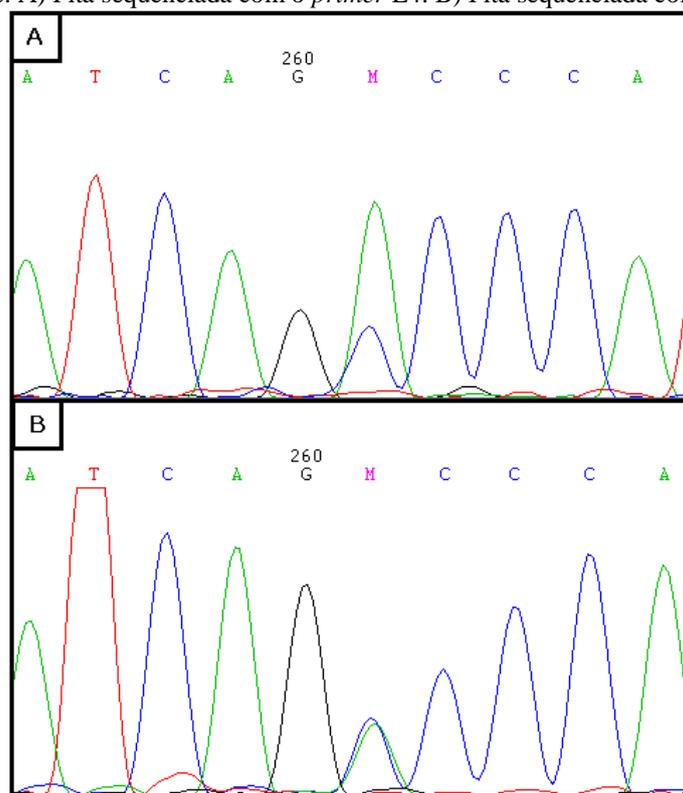
4.1.3. Características do alinhamento das ATPases 6 e 8

Um gene dos genes ATPase 6 e 8 foi seqüenciado para 157 indivíduos de garça vaqueira (108 africanos e 49 brasileiros) e a análise conjunta produziu um alinhamento de 815pb, sem presença de *indels* (deleções ou inserções). Apenas 1.84% dos sítios estudados apresentaram alguma substituição.

4.1.4. Resolução da fase gamética e características do alinhamento de TGFB2

Um fragmento do íntron nuclear TGFB2 de 480 pb foi amplificado e seqüenciado com sucesso em 144 indivíduos (94 da África e 50 do Brasil). Nove sítios (1.87% do total) foram variáveis e todos apresentaram pelo menos um indivíduo em heterozigose (Figura 10). Quatro deles foram representados por apenas um indivíduo amostrado. O algoritmo do programa PHASE resolveu a fase gamética nos cinco sítios restantes (1.04% do total de sítios), com todos os indivíduos com uma probabilidade maior do que 0.9.

Figura 10. Eletroferograma do íntron TGFB2 de um indivíduo africano de *B. ibis* mostrando a posição 261 em heterozigose. A) Fita sequenciada com o *primer* E4. B) Fita sequenciada com o *primer* E5.



4.1.5. Recombinação

Nenhum dos três testes utilizados evidenciou presença de eventos de recombinação nas sequências das três regiões gênicas estudadas.

4.2. Índices de diversidade genética das populações africanas (área nativa) de *B. ibis*

Índices de diversidade foram estimados para conjuntos diferentes e a partir das sequências geradas para os três genes. Foi avaliada a diversidade nas colônias, consideradas unidades populacionais básicas, nos países onde as colônias foram amostradas e nas regiões que incluíam os países de uma mesma região geográfica. Os desvios padrões encontrados foram altos para $\theta(\pi)$ e $\theta(S)$, produzindo assim intervalos de confiança grandes. Como o tamanho amostral das colônias africanas foi pequeno nas análises das sequências do TGFB2 e ATPases 6 e 8 os valores das diversidades genéticas estimados nesse nível podem ter sido enviesados. Os valores dos índices foram, entretanto, comparados para se determinar se existe alguma tendência de se apresentar valores altos ou baixos de diversidade nos locais amostrados.

4.2.1. RC do DNAmít

As amostras da população de Praia (Cabo Verde) foram de penas coletadas em um pouso e não provenientes de local de nidificação, como as demais amostras africanas. Como não há nidificação nas ilhas desse país, as amostras cabo-verdianas correspondem a indivíduos migrantes, não residentes no local. Os índices de diversidade determinados para Cabo Verde não diferiram dos determinados para as colônias africanas continentais (Tabela 2).

Encontrou-se que a amostra de Senegal apresentou o maior valor em todos os índices de diversidade ao nível de país (Tabela 2). Quando se detalha essa diversidade ao nível de colônias percebe-se que essa diversidade alta é explicada pela encontrada na colônia localizada dentro do Zoológico de Senegal, a mais diversa também quando comparada a todas outras amostradas. As amostras de Senegal e Guiné Bissau quando juntadas numa região mostraram que essa região é a que detém valores de diversidade mais altos. Outro ponto a destacar foi que a África do Sul apresentou os menores valores de diversidade.

Tabela 2. Índices de diversidade genética da RC do DNAmít nas populações africanas de *B. ibis*. N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP - π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$.

	N	S	H	Hd	DP - Hd	π	DP - π	$\theta(\pi)$	DP- $\theta(\pi)$	$\theta(S)$	DP- $\theta(S)$
IB-GB	24	4	4	0.308	0.118	0.00078	0.0004	0.409	0.390	1.071	0.613
AT-GB	31	8	9	0.690	0.087	0.00185	0.0003	0.968	0.677	2.003	0.907
IP-GB	6	3	4	0.800	0.172	0.00191	0.0006	1.000	0.775	1.314	0.910
GB	61	9	10	0.561	0.074	0.00143	0.0003	0.748	0.560	1.923	0.799
ZOO-SE	42	11	11	0.779	0.054	0.00219	0.0003	1.150	0.759	2.556	1.035
PS-SE	20	4	5	0.442	0.133	0.00093	0.0003	0.489	0.438	1.127	0.652
TH-SE	35	8	9	0.682	0.078	0.00163	0.0003	0.854	0.619	1.943	0.871
SE	97	15	15	0.688	0.048	0.00174	0.0002	0.912	0.638	2.914	1.013
GB - SE	158	18	19	0.641	0.041	0.00161	0.0002	0.846	0.604	3.193	1.019
PR-CV	20	5	6	0.658	0.096	0.00152	0.0003	0.795	0.600	1.409	0.759
KL-GN	38	6	8	0.589	0.088	0.00176	0.0004	0.920	0.650	1.428	0.695
BC-GN	22	4	5	0.528	0.118	0.00115	0.0003	0.602	0.498	1.097	0.631
GN	60	9	11	0.571	0.075	0.00158	0.0003	0.826	0.599	1.930	0.803
FK-NG	27	6	8	0.678	0.092	0.00182	0.0004	0.952	0.672	1.557	0.775
KF-NG	25	8	8	0.710	0.088	0.00187	0.0004	0.980	0.687	2.119	0.979

FU-NG	25	8	7	0.590	0.112	0.00164	0.0004	0.860	0.628	2.119	0.979
TO-NG	24	4	5	0.438	0.121	0.00093	0.0003	0.486	0.434	1.071	0.613
NG	101	15	15	0.611	0.055	0.00159	0.0002	0.833	0.599	2.892	1.002
NA-QE	14	3	4	0.396	0.159	0.00082	0.0004	0.429	0.411	0.943	0.613
PA-AS	25	4	5	0.577	0.105	0.00140	0.0003	0.733	0.564	1.059	0.605
BG-AS	28	6	6	0.529	0.105	0.00165	0.0004	0.860	0.625	1.542	0.766
RO-AS	26	7	8	0.665	0.101	0.00193	0.0004	1.009	0.701	1.834	0.876
AS	79	8	9	0.489	0.068	0.00112	0.0002	0.582	0.474	1.619	0.687
África	412	25	25	0.491	0.030	0.00113	0.0001	0.586	0.472	3.790	1.037

4.2.2. ATPases 6 e 8 do DNAmIt

As amostras de Guiné Bissau apresentaram os valores mais altos de Hd e π e a Nigéria apresentou os segundos valores mais altos para esses mesmos índices e o valor mais alto de $\theta(S)$ (Tabela 3). Esses valores altos encontrados para Nigéria se devem principalmente aos valores de diversidade achados em Fusa (Nigéria), os quais estão acima da média das outras colônias. Como nos resultados baseados na RC, a África do Sul apresentou os menores valores de Hd e π . Na colônia de Rondevlei (África do Sul), por exemplo, foi achado apenas um haplótipo.

Tabela 3. Índices de diversidade das ATPases 6 e 8 do DNAmIt nas populações africanas de *B. ibis*. N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP - π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$.

	N	S	H	Hd	DP - Hd	π	DP - π	$\theta(\pi)$	DP- $\theta(\pi)$	$\theta(S)$	DP- $\theta(S)$
IB-GB	10	2	3	0.511	0.1643	0.00068	0.00025	0.556	0.494	0.707	0.539
AT-GB	8	3	3	0.607	0.1640	0.00162	0.00044	1.321	0.915	1.157	0.781
IP-GB	3	1	2	0.667	0.3140	0.00082	0.00102	0.667	0.666	0.667	0.666
GB	21	4	5	0.548	0.1187	0.00108	0.00029	0.876	0.640	1.112	0.641
ZOO-SE	12	2	3	0.318	0.1637	0.00058	0.00032	0.470	0.439	0.662	0.501
PS-SE	5	2	3	0.302	0.1640	0.00123	0.00034	1.000	0.796	0.960	0.758
TH-SE	5	1	2	0.400	0.2373	0.00049	0.00029	0.400	0.435	0.480	0.480
SE	22	4	5	0.468	0.1228	0.00079	0.00024	0.641	0.519	1.097	0.631
GB - SE	43	6	7	0.498	0.0865	0.00090	0.00020	0.749	0.564	1.387	0.669
KL-GN	9	2	2	0.389	0.1644	0.00095	0.00040	0.778	0.622	0.736	0.563
BC-GN	8	2	3	0.464	0.0400	0.00062	0.00029	0.500	0.471	0.771	0.593
GN	17	3	4	0.419	0.1413	0.00077	0.00030	0.647	0.527	0.887	0.571
FK-NG	7	1	2	0.286	0.1964	0.00035	0.00040	0.286	0.622	0.408	0.563

KF-NG	6	2	2	0.333	0.2152	0.00082	0.00053	0.667	0.587	0.876	0.684
FU-NG	7	5	5	0.905	0.1033	0.00245	0.00042	2.000	1.276	2.041	1.223
TO-NG	7	1	2	0.286	0.1964	0.00035	0.00024	0.286	0.341	0.408	0.409
NG	27	6	7	0.507	0.1149	0.00103	0.00028	0.860	0.626	1.557	0.775
PA-AS	6	3	4	0.800	0.1721	0.00125	0.00038	1.000	0.775	1.314	0.910
BG-AS	8	2	2	0.250	0.1802	0.00061	0.00044	0.500	0.471	0.771	0.593
RO-AS	7	0	1	0.000	0.0000	0.00000	0.00000	0.000	0.000	0.000	0.000
AS	21	4	5	0.352	0.1314	0.00057	0.00025	0.467	0.424	1.112	0.641
África	108	12	13	0.455	0.0581	0.00085	0.00013	0.703	0.535	2.284	0.838

4.2.3. TGFB2 do DNA nuclear

Os valores dos índices de diversidade calculados ao nível de pais ou região foram bastante homogêneos (Tabela 4). Ao nível das colônias os valores de Hd e π se diferenciam um pouco mais, mas alguns tamanhos amostrais foram pequenos como o da Ilha do Patrão (IP- GB), o que pode ter introduzido um viés nessas comparações.

Tabela 4. Índices de diversidade do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas de *B. ibis*. N: tamanho amostral em número de cópias do íntron, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP - π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$.

	N	S	H	Hd	DP - Hd	π	DP - π	$\theta(\pi)$	DP- $\theta(\pi)$	$\theta(S)$	DP- $\theta(S)$
IB-GB	18	4	5	0.712	0.074	0.0022	0.0004	1.039	0.725	1.163	0.677
AT-GB	16	4	6	0.742	0.084	0.0023	0.0005	1.125	0.772	1.125	0.707
IP-GB	4	3	3	0.833	0.222	0.0035	0.0013	1.667	1.216	1.636	1.186
GB	38	4	6	0.703	0.051	0.0023	0.0003	1.084	0.729	0.952	0.533
ZOO-SE	24	4	5	0.754	0.048	0.0024	0.0003	1.163	0.777	1.071	0.613
PS-SE	8	2	3	0.679	0.122	0.0017	0.0004	0.821	0.653	0.771	0.593
TH-SE	10	2	3	0.711	0.086	0.0019	0.0004	0.889	0.675	0.707	0.841
SE	42	4	5	0.717	0.041	0.0022	0.0003	1.048	0.711	0.930	0.518
GB - SE	80	4	6	0.703	0.032	0.0022	0.0002	1.054	0.707	0.808	0.440
KL-GN	14	3	4	0.582	0.137	0.0023	0.0007	1.121	0.775	0.943	0.613
BC-GN	14	3	4	0.736	0.075	0.0022	0.0003	1.033	0.732	0.943	0.613
GN	28	4	5	0.664	0.076	0.0022	0.0004	1.074	0.730	1.028	0.583
FK-NG	14	5	6	0.813	0.074	0.0028	0.0005	1.363	0.894	1.572	0.872
KF-NG	8	2	3	0.679	0.122	0.0016	0.0004	0.786	0.633	0.771	0.593
FU-NG	14	3	5	0.791	0.067	0.0027	0.0004	1.286	0.857	0.943	0.613
TO-NG	10	4	5	0.800	0.100	0.0026	0.0006	1.222	0.846	1.414	0.861
NG	46	5	7	0.744	0.037	0.0024	0.0003	1.161	0.763	1.138	0.582

PA-AS	16	3	4	0.750	0.073	0.0024	0.0004	1.150	0.784	0.904	0.584
BG-AS	12	5	5	0.667	0.141	0.0023	0.0007	1.106	0.776	1.656	0.932
RO-AS	6	3	3	0.733	0.155	0.0026	0.0010	1.267	0.919	1.314	0.910
AS	34	5	6	0.713	0.058	0.0024	0.0003	1.148	0.762	1.223	0.636
África	188	5	8	0.714	0.019	0.0023	0.0001	1.107	0.728	0.860	0.418

4.3. Estruturação populacional das populações africanas (área nativa) de *B. ibis*

4.3.1. RC do DNAmIt

A AMOVA foi desenvolvida considerando-se diferentes níveis hierárquicos. Na primeira análise foi feita uma análise global das colônias africanas que revelou que 2.22% da variação total foram explicados pela variância entre colônias e o valor de Φ_{ST} , apesar de baixo, foi significativo ($p \leq 0.05$) (Tabela 5). Na segunda análise da AMOVA, foram incluídos dois níveis hierárquicos, o das colônias e o dos países (Tabela 6). Quando as colônias foram agrupadas em países, apenas 1.27% da variação foi explicada pela variância entre os países (e Φ_{CT} não significativo $p > 0.05$), 1.12% da variância explicava as diferenças encontradas entre as colônias dentro de um país (Φ_{SC} não significativo) enquanto que porém a variância entre os indivíduos dentro das populações foi significativa, Φ_{ST} ($p \leq 0.05$) (Tabela 6). O F_{ST} par a par foi calculado considerando as colônias africanas da garça-vaqueira como unidades populacionais e alguns pares apresentaram valores significativos, especialmente nas comparações envolvendo duas colônias da África do Sul (BG e RO) (Tabela 7). Entretanto, esses valores resultaram não significativos após a correção estatística de Benjamini-Hochberg (Tabela 7).

No geral, os resultados da AMOVA e F_{ST} par a par mostraram uma baixa diferenciação ou completa ausência de diferenciação populacional entre colônias. Esse resultado justifica as análises posteriores com o agrupamento de colônias em regiões. Como as populações amostradas no Senegal e Guiné Bissau estavam separadas por aproximadamente 300 km e não foi encontrado nenhum valor de F_{ST} significativo entre suas colônias, esses dois países foram agrupados e tratados como uma única região nas análises subsequentes.

Tabela 5. AMOVA global das populações africanas de *B. ibis* usando como marcador a RC do DNAmIt. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação
Entre as colônias	15	11.154	0.01068	2.22

Dentro das colônias	396	186.332	0.47053	97.78
Total	411	197.485	0.48121	
Φ_{ST} : 0.02219 (p=0.00000)				
G.L.: Graus de liberdade				

Tabela 6. AMOVA global das populações africanas de *B. ibis* agrupadas por países usando como marcador a RC do DNAmIt. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação	Índices de fixação	Valores de P
Entre os países amostrados	5	5.08	0.00612	1.27	Φ_{CT} : 0.01269	0.05059
Entre colônias dentro dos países amostrados	10	6.074	0.0054	1.12	Φ_{SC} : 0.01134	0.06911
Dentro das colônias	396	186.332	0.47053	97.61	Φ_{ST} : 0.02389	0.00010
Total	411	197.485	0.48205			

G.L.: Graus de liberdade

A análise de F_{ST} par a par foi repetida considerando-se as cinco regiões africanas como unidades populacionais: Guiné Bissau-Senegal, Gana, Nigéria, África do Sul e Quênia (Tabela 8). Essa análise revelou diferenciação significativa entre África do Sul em relação às outras regiões, exceto com Quênia. A diferenciação detectada com a região de Gana não foi significativa após a correção pela metodologia de Benjamini e Hochberg (1995).

O teste de Mantel mostrou uma correlação significativa entre a matriz de distância genética ($F_{ST} / 1 - F_{ST}$) e a matriz de distância geográfica ($p = 0.008$) entre as regiões amostradas (Figura 11). Essa correlação significativa não se manteve, entretanto, quando foram retiradas da análise as colônias da África do Sul ($p = 0.2584$).

Figura 11. Teste de Mantel entre as matrizes de distância genética da RC do DNAmIt e a distância geográfica das colônias africanas de *B. ibis*.

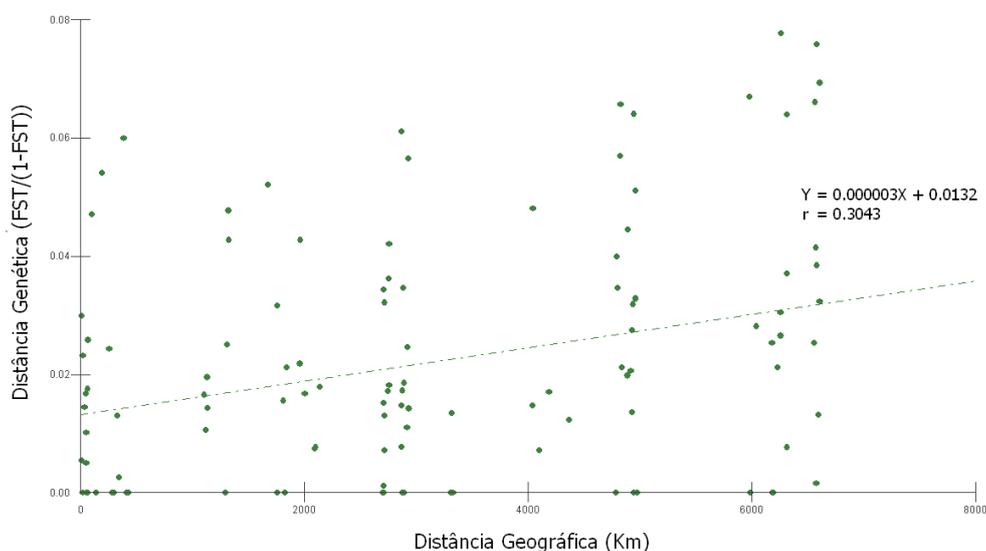


Tabela 7. F_{ST} par a par entre as colônias africanas de *B. ibis* usando como marcador a RC do DNAmIt. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	IB GB	AT GB	IP GB	ZOO SE	PS SE	TH SE	KL GN	BC GN	FK NG	KF NG	FUNG	TO NG	NA QE	PA AS	BG AS	RO AS
IB GB	-															
AT GB	0.0172	-														
IP GB	0.0450	-0.0877	-													
ZOO SE	0.0025	-0.0006	-0.0496	-												
PS SE	-0.0074	0.0237	0.0565	0.0164	-											
TH SE	0.0129	-0.0036	-0.0485	-0.0063	0.0142	-										
KL GN	0.0207	0.0152	-0.0286	0.0176	0.0073	0.0075	-									
BC GN	-0.0155	0.0306	0.0495	0.0164	0.0214	0.0409	0.0514	-								
FK NG	0.0331	0.0404	0.0128	0.0534	0.0182	0.0576	0.0191	0.0455	-							
KF NG	-0.0088	0.0178	0.0071	0.0140	-0.0046	0.0335	0.0162	-0.0052	0.0100	-						
FU NG	0.0000	0.0168	0.0011	0.0109	-0.0155	0.0076	0.0104	0.0244	0.0053	0.0050	-					
TO NG	0.0149	0.0349	0.0311	0.0240	0.0169	0.0145	0.0141	0.0410	0.0226	0.0252	-0.0046	-				
NA QE	-0.0071	0.0274	0.0627	0.0207	-0.0213	0.0247	0.0167	0.0122	0.0132	-0.0106	-0.0203	-0.0120	-			
PA AS	0.0296	0.0075	-0.0455	0.0129	0.0247	0.0015	-0.0112	0.0538	0.0267	0.0194	0.0134	-0.0151	0.0145	-		
BG AS	0.0721	0.0601	-0.0111	0.0648	0.0619	0.0705	0.0383	0.0616	0.0308	0.0426	0.0602	0.0486	0.0459	0.0290	-	
RO AS	0.0258	0.0357	-0.0275	0.0313	0.0398	0.0370	0.0334	0.0207	0.0318	0.0202	0.0316	-0.0022	0.0071	-0.0008	-0.0061	-

Tabela 8. F_{ST} par a par entre as regiões africanas de *B. ibis* usando como marcador a RC do DNAmIt. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

	Guiné Bissau- Senegal	Gana	Nigéria	Quênia	África do Sul
Guiné Bissau- Senegal	-				
Gana	0.0036	-			
Nigéria	0.0192*	0.0024	-		
Quênia	0.0075	-0.0045	-0.0176	-	
África do Sul	0.0359*	0.0155	0.0230*	0.0087	-

4.3.2. ATPases 6 e 8 do DNAmIt

A AMOVA feita considerando-se as colônias africanas como unidades populacionais mostrou que 3.36% da variância total foram explicados pela diferenciação entre colônias, mas o valor de Φ_{ST} não foi significativo ($p > 0.05$) (Tabela 9). Quando a AMOVA foi realizada considerando-se os dois níveis hierárquicos, agrupando-se as colônias em países (Tabela 10), o resultado revelou que o agrupamento em países não explica a variância encontrada. Nenhum dos índices de fixação mostrou valores significativos nessa análise.

Tabela 9. AMOVA global das populações africanas de *B. ibis* usando como marcador as ATPases 6 e 8 do DNAmIt. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação
Entre as colônias	14	5.953	0.01184	3.36
Dentro das colônias	93	31.667	0.34051	96.64
Total	107	37.620	0.35235	

Φ_{ST} : 0.03360 ($p = 0.14624$)

G.L.: Graus de liberdade

Tabela 10. AMOVA global das populações africanas de *B. ibis* agrupadas por países usando como marcador as ATPases 6 e 8 do DNAmIt. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação	Índices de fixação	Valores de P
Entre os países amostrados	4	1.103	-0.01078	-3.07	Φ_{CT} : -0.03073	0.84683
Entre colônias dentro dos países amostrados	10	4.85	0.02109	6.01	Φ_{SC} : 0.05832	0.08297
Dentro das colônias	93	31.667	0.34051	97.06	Φ_{ST} : 0.02938	0.14238
Total	107	37.62	0.35081			

G.L.: Graus de liberdade

Na análise dos F_{ST} par a par entre as colônias da África (Tabela 11) apenas dois pares de colônias foram significativamente diferentes entre si (ZOO-SE e FU-NG; PS-SE e RO-AS). Após a correção com a metodologia de Benjamini e Hochberg (1995) essa diferenciação resultou não significativa. Quando se analisaram os F_{ST} par a par entre as regiões, os valores foram baixos e não diferiram significativamente entre si (Tabela 12).

O teste de Mantel revelou que não existe correlação entre a matriz de distância genética ($F_{ST} / 1 - F_{ST}$) e a matriz de distância geográfica ($r = 0.1143$) (Figura 12). Esse resultado se manteve quando foi realizada a análise sem considerar as colônias da África do Sul ($p = 0.4885$).

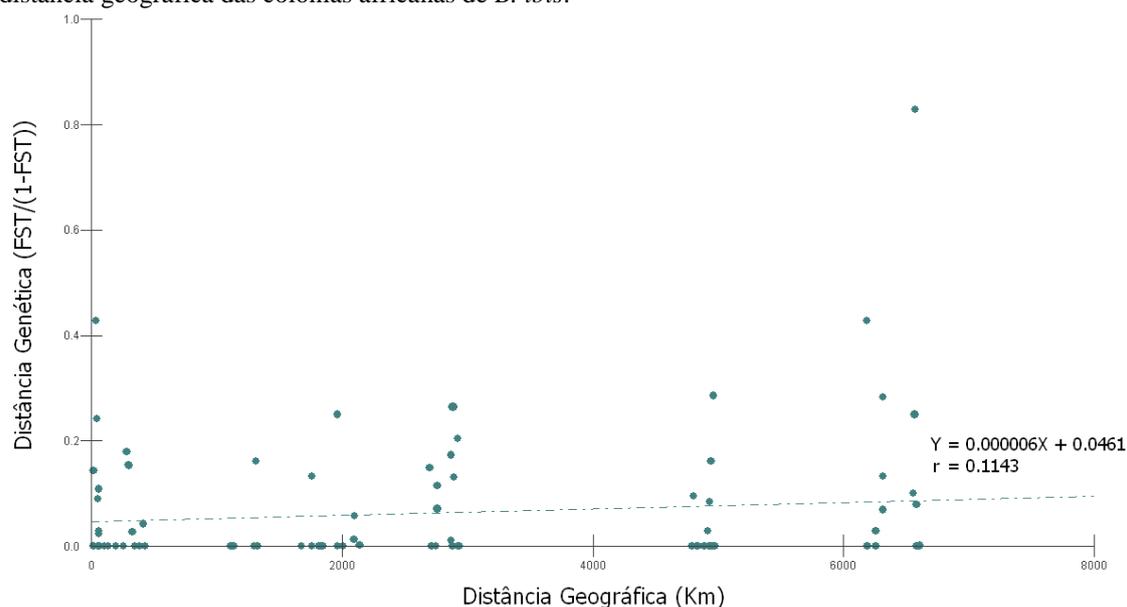
Tabela 11. F_{ST} par a par entre as colônias africanas de *B. ibis* usando como marcador as ATPases 6 e 8 do DNAmIt. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	IL GB	AT GB	IP GB	ZOO SE	PS SE	TH SE	KL GN	BC GN	FK NG	KF NG	FUNG	TO NG	PA AS	BG AS	RO AS
IL GB	-														
AT GB	0.0979	-													
IP GB	-0.2025	-0.1048	-												
ZOO SE	-0.0595	0.1333	-0.1613	-											
PS SE	0.1330	-0.0894	-0.1651	0.1951	-										
TH SE	0.0266	0.1519	0.0407	0.0234	0.3000	-									
KL GN	-0.0151	-0.0612	-0.1635	0.0019	0.0124	0.0542	-								
BC GN	-0.0567	0.1169	-0.1354	-0.0567	0.2000	-0.0089	-0.0032	-							
FK NG	-0.1011	0.1033	-0.1667	-0.1044	0.2090	0.0107	-0.0296	-0.1040	-						
KF NG	-0.0730	0.0663	-0.2000	-0.1260	0.1153	-0.0091	-0.0306	-0.0713	-0.1025	-					
FUNG	0.1301	-0.0910	-0.0938	0.1696	-0.0895	0.1476	-0.0147	0.1393	0.1250	0.0826	-				
TO NG	-0.1011	0.1033	-0.1667	-0.1044	0.2090	0.0107	-0.0296	-0.1040	-0.1667	-0.1025	0.1250	-			
PA AS	-0.0417	0.0646	-0.1875	-0.0274	0.0909	-0.0154	-0.0139	-0.1132	-0.0670	-0.0714	0.0775	-0.0670	-		
BG AS	-0.0567	0.1169	-0.1354	-0.0567	0.2000	-0.0089	-0.0032	-0.0667	-0.1040	-0.0713	0.1393	-0.1040	-0.0448	-	
RO AS	0.0278	0.2208	0.3000	0.0012	0.4531	0.0729	0.0870	-0.0182	0.0000	0.0278	0.2222	0.0000	0.0278	-0.0182	-

Tabela 12. F_{ST} par a par entre as regiões africanas de *B. ibis* usando como marcador as ATPases 6 e 8 do DNAmIt. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$.

	Guiné Bissau- Senegal	Gana	Nigéria	África do Sul
Guiné Bissau- Senegal	-			
Gana	-0.02423	-		
Nigéria	-0.02126	-0.03488	-	
África do Sul	0.02965	-0.00737	0.01653	-

Figura 12. Teste de Mantel entre as matrizes de distância genética das ATPases 6 e 8 do DNAmIt e a distância geográfica das colônias africanas de *B. ibis*.



4.3.3. TGFB2 do DNA nuclear

Os resultados da AMOVA considerando as colônias como unidades populacionais mostraram que a variação não é explicada pela diferenciação entre as colônias pois o Φ_{ST} foi negativo e não significativo (Tabela 13). A AMOVA com dois níveis hierárquicos, agrupando as colônias em países, revelou que apenas 1.37% da variância total são explicados pela diferenciação entre os países amostrados, porém os valores dos índices de fixação não foram significativos (Tabela 14).

Na análise dos F_{ST} par a par entre as colônias africanas foi detectada diferenciação significativa apenas entre PS-SE e PA-AS (Tabela 15). Os F_{ST} par a par calculados entre as regiões africanas mostrou haver diferenciação significativa entre África do Sul e Guiné Bissau – Senegal (Tabela 16). Após correção de Benjamini e Hochberg (1995), nenhum dos valores de F_{ST} de ambas as tabelas foram significativos (Tabelas 15 e 16).

Tabela 13. AMOVA global das populações africanas de *B. ibis* usando como marcador o íntron nuclear TGFB2. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação
Entre as colônias	14	6.182	-0.00978	-1.77
Dentro das colônias	173	97.36	0.56278	101.77
Total	187	103.543	0.553	

Φ_{ST} : -0.01768 ($p = 0.81267$)

G.L.: Graus de liberdade

Tabela 14. AMOVA global das populações africanas de *B. ibis* agrupadas por países usando como marcador o íntron nuclear TGFB2. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos e ressaltados em negrito.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação	Índices de fixação	Valores de P
Entre os países amostrados	4	2.442	0.00758	1.37	Φ_{CT} : 0.01368	0.17871
Entre colônias dentro dos países amostrados	10	3.74	-0.0163	-2.94	Φ_{SC} : -0.02983	0.90980
Dentro das colônias	173	97.36	0.56278	101.57	Φ_{ST} : -0.01574	0.81366
Total	187	103.543	0.55406			

G.L.: Graus de liberdade

O teste de Mantel mostrou haver correlação significativa entre as matrizes de distâncias genéticas entre as colônias e as distâncias geográficas entre elas ($p = 0.0057$). Apesar disso, o valor do coeficiente de correlação entre as matrizes foi baixo ($r = 0.3265$) (Figura 13). Entretanto, a correlação foi não significativa quando foi realizada essa análise sem considerar as colônias da África do Sul ($p = 0.1837$).

Figura 13. Teste de Mantel entre as matrizes de distância genética do íntron do TGFB2 do DNA nuclear e a distância geográfica entre as colônias africanas de *B. ibis*.

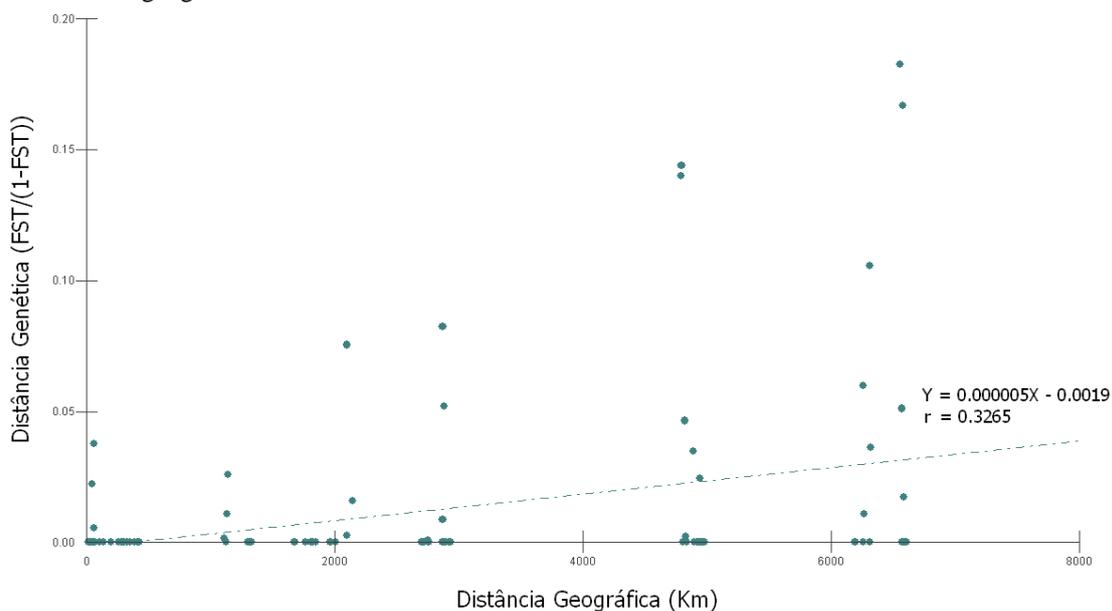


Tabela 15. F_{ST} par a par entre as colônias africanas de *B. ibis* usando como marcador o íntron nuclear TGFB2. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	IL - GB	AT - GB	IP - GB	ZOO-SE	PS-SE	TH-SE	KL-GN	BC-GN	FK-NG	KF-NG	FU-NG	TO-NG	PA-AS	BG-AS	RO-AS
IL - GB	-														
AT - GB	-0.0527	-													
IP - GB	-0.1209	-0.1131	-												
ZOO-SE	-0.0302	-0.0079	-0.1204	-											
PS-SE	-0.0239	-0.0497	-0.0137	0.0362	-										
TH-SE	-0.0532	-0.0808	-0.0601	0.0219	-0.1041	-									
KL-GN	-0.0150	-0.0225	-0.1542	0.0155	0.0701	0.0025	-								
BC-GN	-0.0614	-0.0511	-0.1068	-0.0434	-0.0212	-0.0439	-0.0051	-							
FK-NG	-0.0420	-0.0236	-0.1310	-0.0541	0.0085	-0.0001	0.0106	-0.0575	-						
KF-NG	-0.0835	-0.0629	-0.1089	-0.0520	-0.0480	-0.0714	0.0016	-0.0886	-0.0667	-					
FU-NG	-0.0228	0.0006	-0.1628	-0.0485	0.0761	0.0494	-0.0166	-0.0329	-0.0550	-0.0296	-				
TO-NG	-0.0574	-0.0419	-0.1348	-0.0591	-0.0349	-0.0266	0.0251	-0.0649	-0.0781	-0.0896	-0.0456	-			
PA-AS	0.0566	0.0957	-0.0655	-0.0049	0.1429	0.1545	0.1228	0.0443	-0.0189	0.0335	-0.0175	-0.0304	-		
BG-AS	0.0108	0.0350	-0.0378	-0.0034	0.0169	0.0486	0.1258	0.0022	-0.0379	-0.0384	0.0237	-0.0740	-0.0125	-	
RO-AS	-0.1039	-0.0992	-0.2477	-0.0757	-0.0312	-0.0813	-0.1099	-0.0898	-0.0855	-0.1112	-0.0944	-0.0971	0.0054	-0.0110	-

Tabela 16. F_{ST} par a par entre as regiões africanas de *B. ibis* usando como marcador as íntron nuclear TGFB2. Os valores em negrito são significativos para $p \leq 0.05$. Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	Guiné Bissau-Senegal	Gana	Nigéria	África do Sul
Guiné Bissau-Senegal	-			
Gana	-0.0100	-		
Nigéria	-0.0013	-0.0017	-	
África do Sul	0.0357	0.0536	-0.0067	-

4.4. Histórico Demográfico das populações africanas (área nativa) de *B. ibis*

Os testes de neutralidade foram aplicados supondo que os efeitos da seleção sobre as regiões genéticas estudadas não são suficientemente para produzir desvios significativos nos testes avaliados. Caso ocorram, podem ser atribuídos ao efeito da variação no tamanho populacional.

4.4.1. RC do DNAmIt

Os resultados revelaram que as populações das regiões africanas provavelmente passaram por expansão populacional (Tabela 17). Os testes F_s de Fu, o D de Tajima e o R_2 de Ramos-Onsins e Rozas apresentaram desvios significativos para todas as regiões. Os gráficos unimodais obtidos nas curvas de *mismatch distribution* e os valores não significativos do índice de *raggedness* reforçam a hipótese de não equilíbrio demográfico (Figura 14). No entanto, o valor de SSD para a África do Sul foi significativo ($p \leq 0.05$) após a correção de Benjamini-Hochberg (1995). Esse resultado indica que a curva de *mismatch distribution* observada para essa população não está de acordo com a esperada segundo o modelo de expansão demográfica.

Tabela 17. Testes de neutralidade e estatísticos para as curvas de *mismatch distribution* baseados na RC do DNAmIt nas populações africanas de *B. ibis*. F_s (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) e rg (Harpending *et al.*, 1993) e SSD. Em negrito os valores significativos ($p \leq 0.05$). * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

Região	F_s	D	R_2	R_g	SSD
Guiné Bissau-Senegal	-17.834*	-1.98400*	0.0249*	0.1165	0.00827
Gana	-7.6230*	-1.54955*	0.0467*	0.0930	0.00448
Nigéria	-12.537*	-1.96790*	0.0317*	0.0878	0.00302
Quênia	-2.2880*	-1.67053	0.1368	0.1682	0.00527
África do Sul	-6.1700*	-1.61230*	0.0397*	0.1199	0.08946*
África	-32.312*	-2.19045*	0.0124*	0.1191	0.0029

A reconstrução das histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* foi feita usando-se o *Bayesian Skyline Plot* e revelou estabilidade demográfica em Gana e Nigéria. Se houve crescimento populacional nessas populações ele ocorreu em Guiné Bissau - Senegal e África do Sul os quais apresentaram alguns sinais, mas muito fracos (Figura 15). Quando todas as populações africanas foram agrupadas ficou mais evidente um aumento no tamanho efetivo, ocorrido há 15 000 anos atrás.

Figura 14. Gráficos de *mismatch distribution* determinados a partir da variação encontrada nas seqüências da RC do DNAmít para populações africanas de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) Quênia; E) África do Sul e F) África (total).

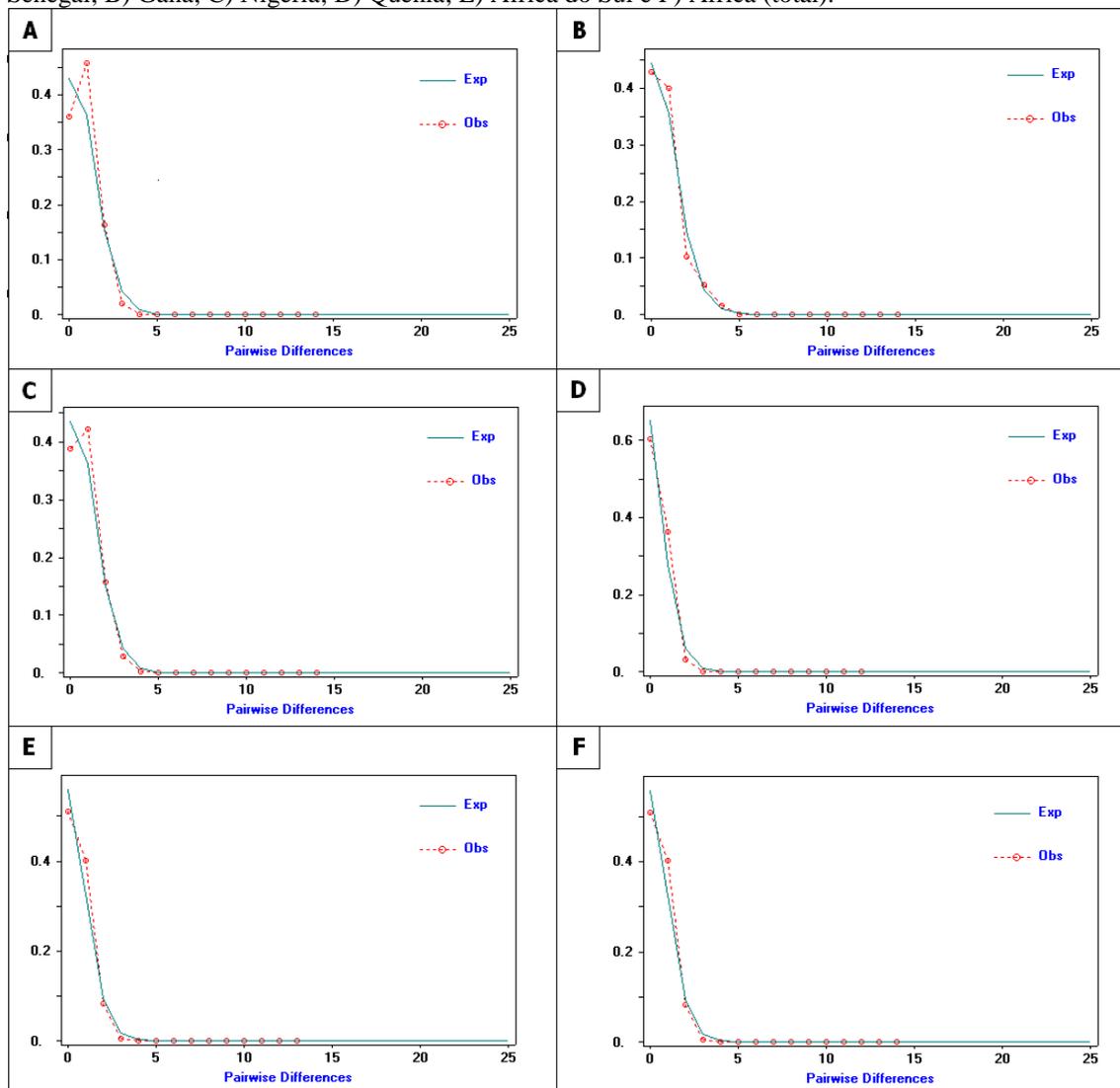
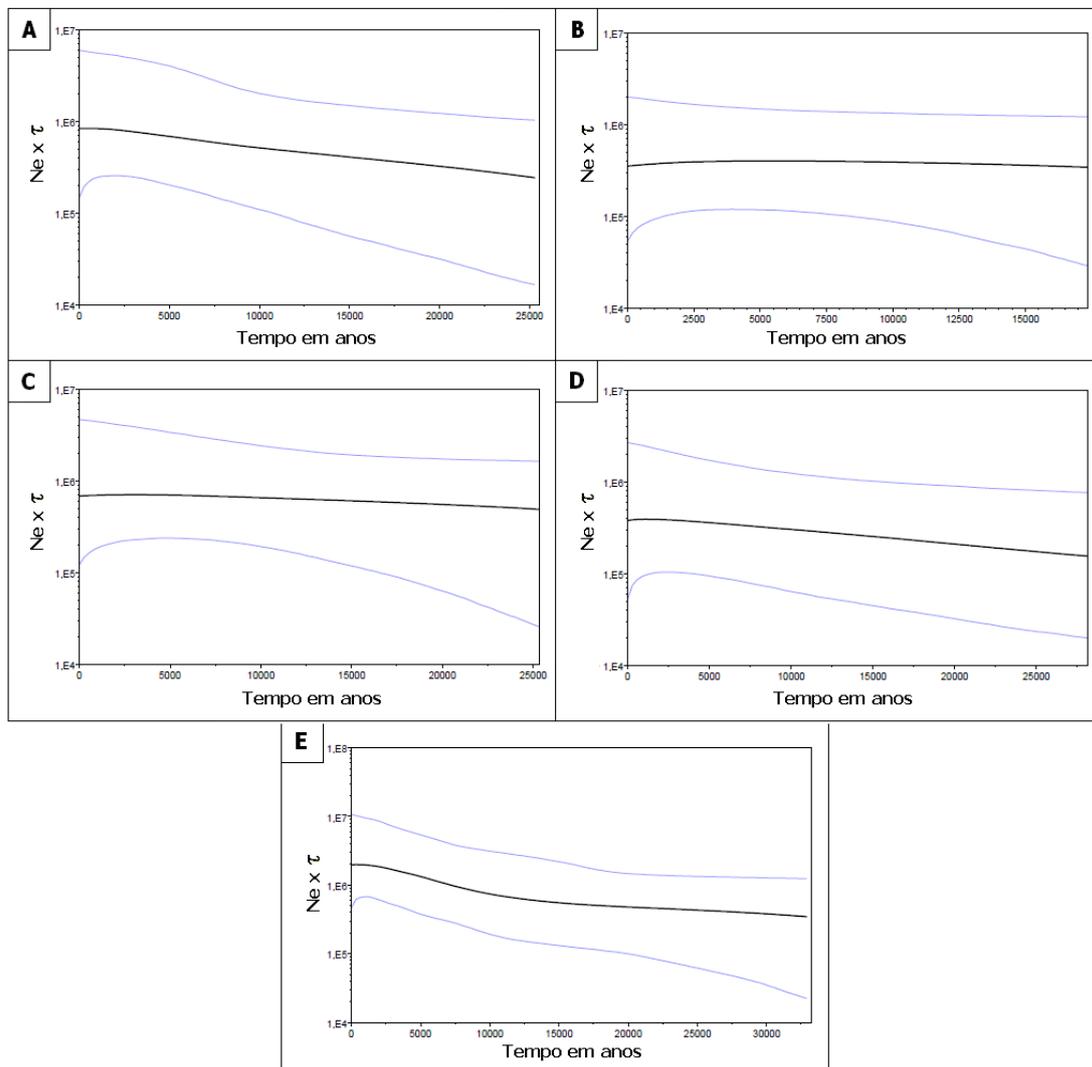


Figura 15. Histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* baseadas na RC do DNAmIt, usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot*. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e F) África (total).



4.4.2. ATPases 6 e 8 do DNAmIt

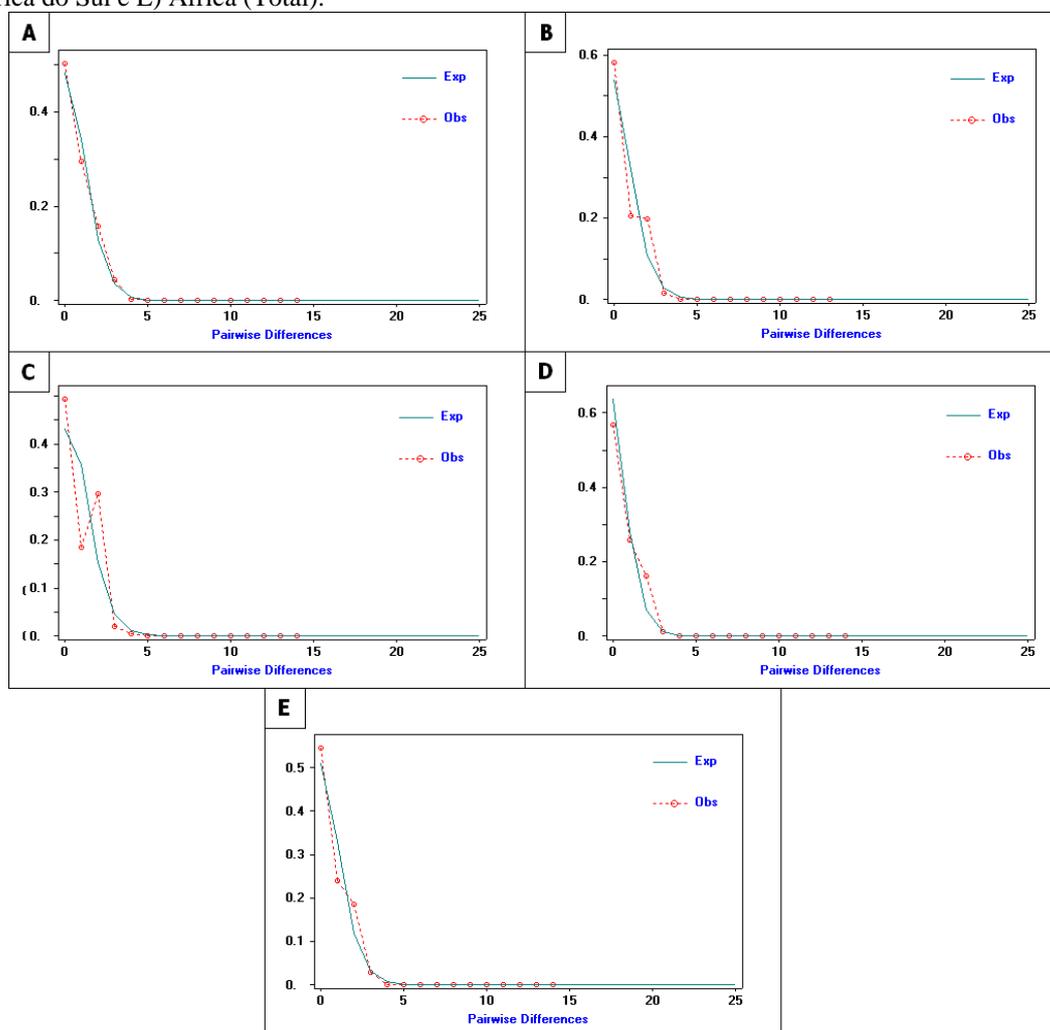
O teste de Fu resultou em valores negativos e significativos de F_s para as regiões de Senegal-Guiné Bissau, Nigéria, África do Sul e África total (Tabela 18), porém apenas Nigéria, África do Sul e África total permaneceram significativos após correção de comparações múltiplas de Benjamini-Hocheberg (1995). O parâmetro D de Tajima foi significativo para a África do Sul, porém esse valor resultou não significativo após a correção de comparações múltiplas de Benjamini-Hocheberg (1995). O teste R2 foi significativo para a Nigéria, África do Sul e África total, mas os valores não permaneceram significativos para Nigéria e África do Sul, após a correção estatística. A curva de *mismatch distribution* da Nigéria foi diferente das outras e aproximou-se da

forma bimodal. O SSD mostrou que as curvas de Guiné Bissau-Senegal, África do Sul e África total não diferem do modelo unimodal (Figura 16).

Tabela 18. Testes de neutralidade e estatísticos para as curvas de *mismatch distribution* baseado nos dados dos genes das ATPases 6 e 8 do DNAmít, nas populações africanas de *B. ibis*. Fs (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending *et al.*, 1993) e SSD. Em negrito mostram-se os valores significativos ($p \leq 0.05$). * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

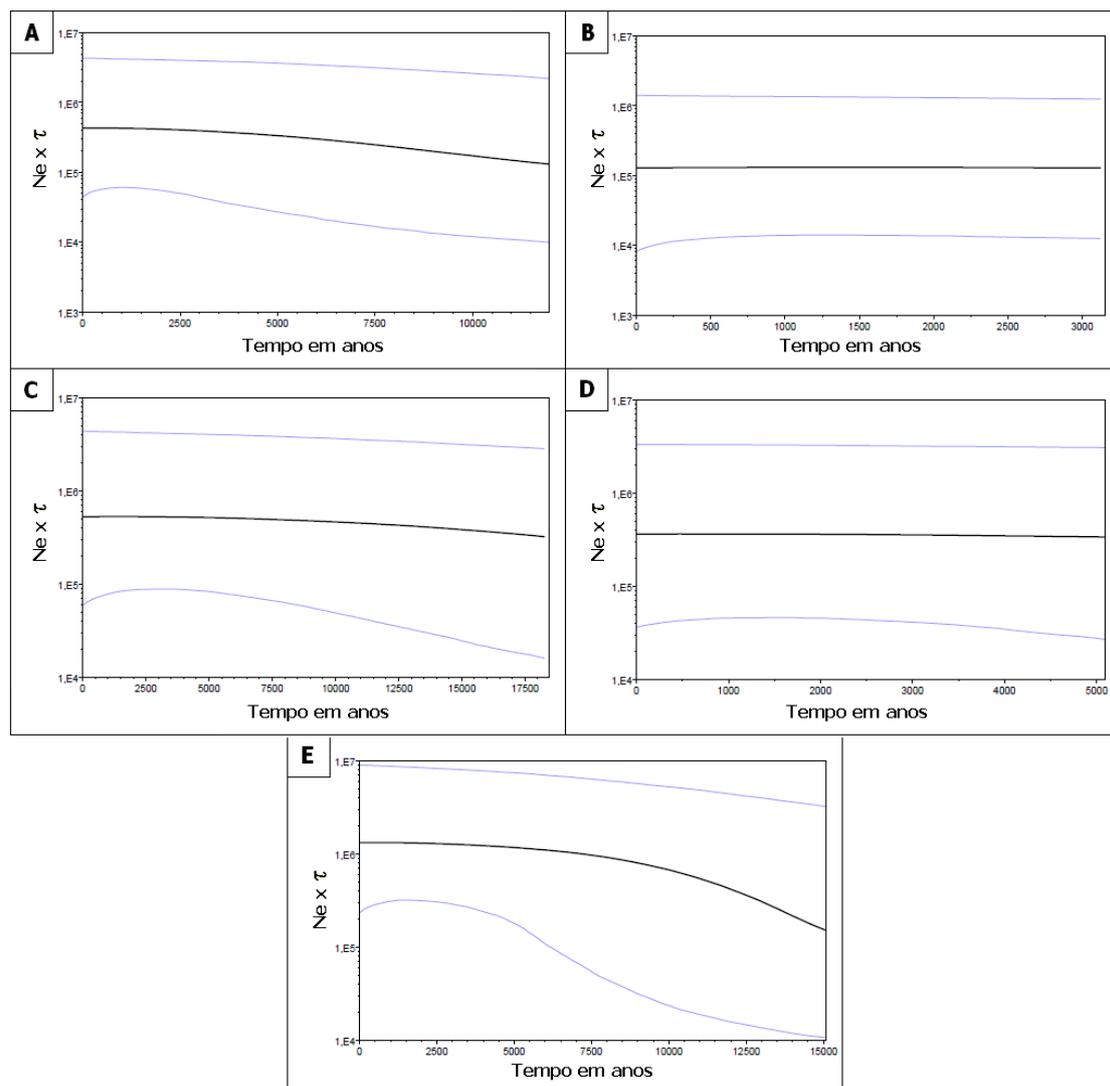
Região	Fs	D	R2	rg	SSD
Guiné Bissau - Senegal	-3.253	-1.20882	0.0674	0.0763	0.0006
Gana	-1.153	-0.76702	0.1180	0.1747	0.2577*
Nigéria	-3.495*	-1.31089	0.0756	0.1836	0.3797*
África do Sul	-3.127*	-1.65358	0.0904	0.1907	0.0009
África	-10.508*	-1.81851*	0.0318*	0.1218	0.00537

Figura 16. Gráficos das curvas de *mismatch distribution* baseadas nos genes das ATPases 6 e 8 nas populações africanas de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em equilíbrio demográfico. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e E) África (Total).



Pela análise do *Bayesian Skyline Plot* verificou-se que há estabilidade demográfica nas regiões africanas, com uma variação muito pequena na região de Guiné Bissau-Senegal (Figura 17). Porém, para a população da África total o resultado foi diferente: houve um crescimento populacional desde a coalescência (15 000 anos atrás) até 5 000 anos atrás.

Figura 17. Histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot* baseada nas ATPases 6 e 8 do DNAmít. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul; F) África (total).



4.4.3. TGFB2 do DNA nuclear

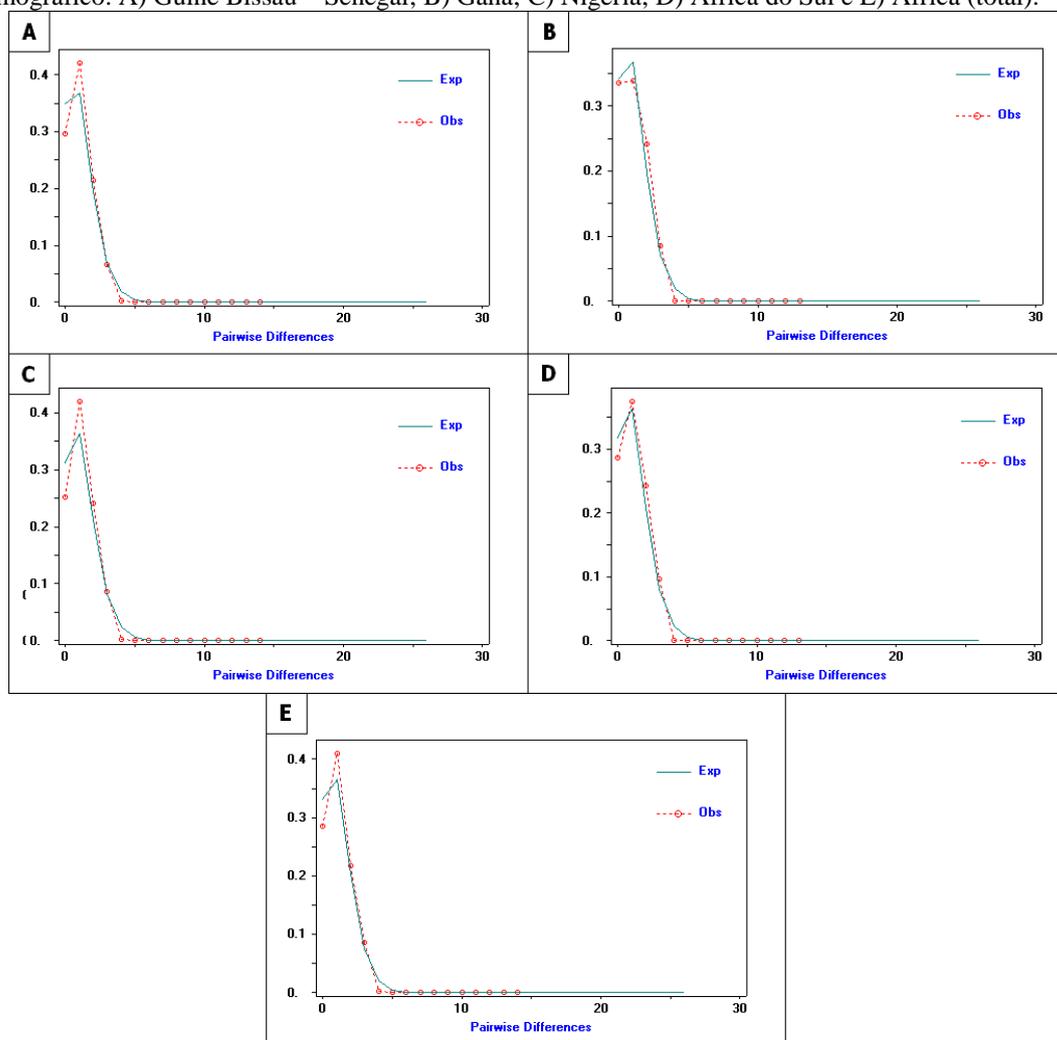
Não foram detectados desvios significativos da neutralidade ou desequilíbrio demográfico com os dados do marcador nuclear (TGFB2) (Tabela 19). Apesar disso, os valores de F_s de F_u foram todos negativos. Os valores de *ruggedness* foram pequenos, condição essa comumente achada em populações com *mismatch distribution* unimodal. Os valores de SSD observados foram baixos e mais de 5% dos valores de SSD

simulados para expansão demográfica foram menores do que os observados. Além disso, os gráficos observados foram semelhantes aos esperados para populações em crescimento ou diminuição demográfico (Figura 18).

Tabela 19. Testes de neutralidade e estatísticos das curvas de *mismatch distribution* do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas de *B. ibis*. Fs (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending *et al.*, 1993) e SSD. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$.

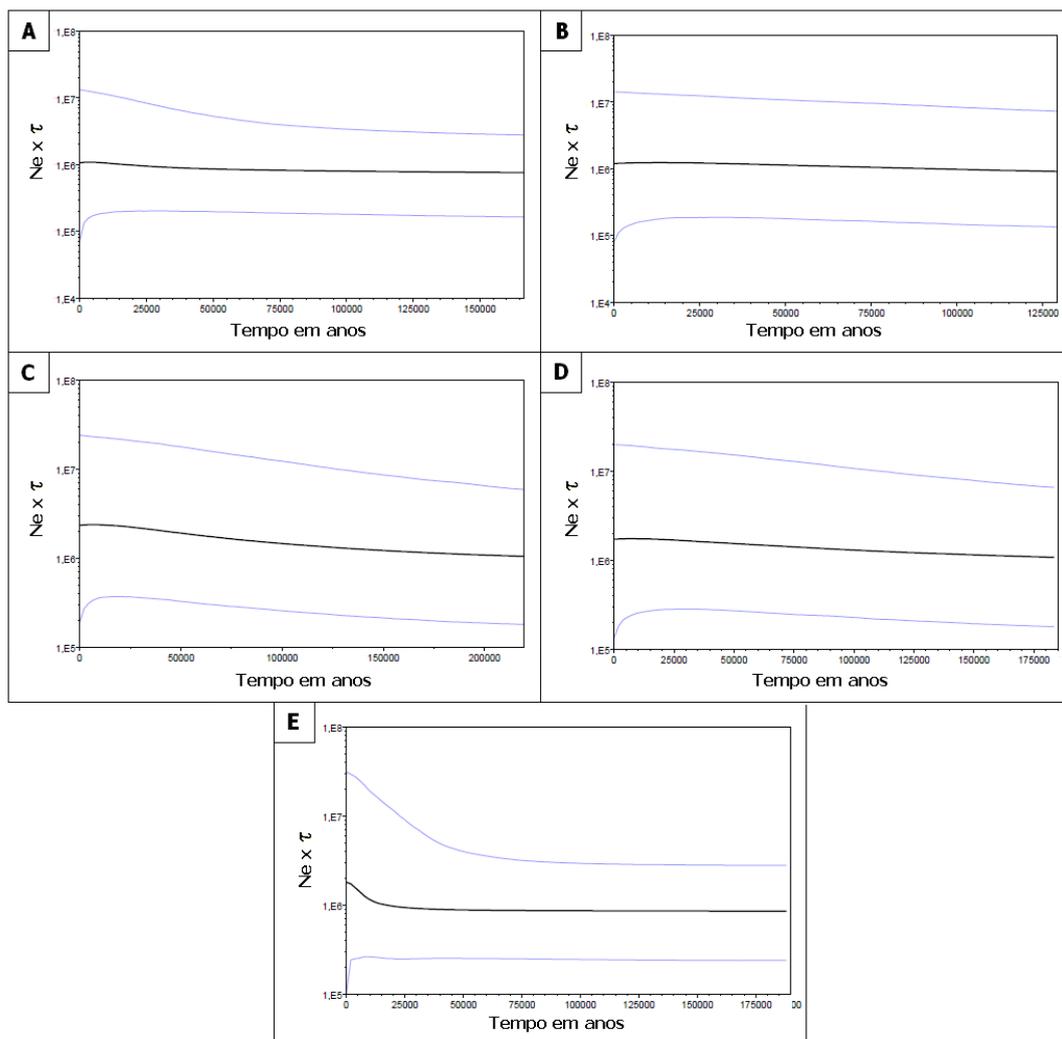
Região	Fs	D	R2	rg	SSD
Guiné Bissau-Senegal	-0.408	0.63081	0.1318	0.0836	0.00422
Gana	-0.520	0.11755	0.1336	0.0411	0.00185
Nigéria	-1.577	0.05135	0.1155	0.0877	0.00060
África do Sul	-1.074	-0.16195	0.1133	0.0557	0.00526
África	-1.015	0.5552	0.1107	0.0763	0.00311

Figura 18. Gráficos de *mismatch distributions* do íntron TGFB2 das populações africanas de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e E) África (total).



A reconstrução das histórias populacionais revelou estabilidade demográfica nas regiões africanas (Figura 19). Houve um leve crescimento desde a coalescência na população da Nigéria. A população da África total mostrou um pequeno aumento demográfico nos últimos 15 000 anos aproximadamente.

Figura 19. Histórias demográficas das populações africanas de *B. ibis* baseadas nos dados do íntron do TGFB2 do DNA nuclear, usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot*. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade. A) Guiné Bissau – Senegal; B) Gana; C) Nigéria; D) África do Sul e F) África (total).



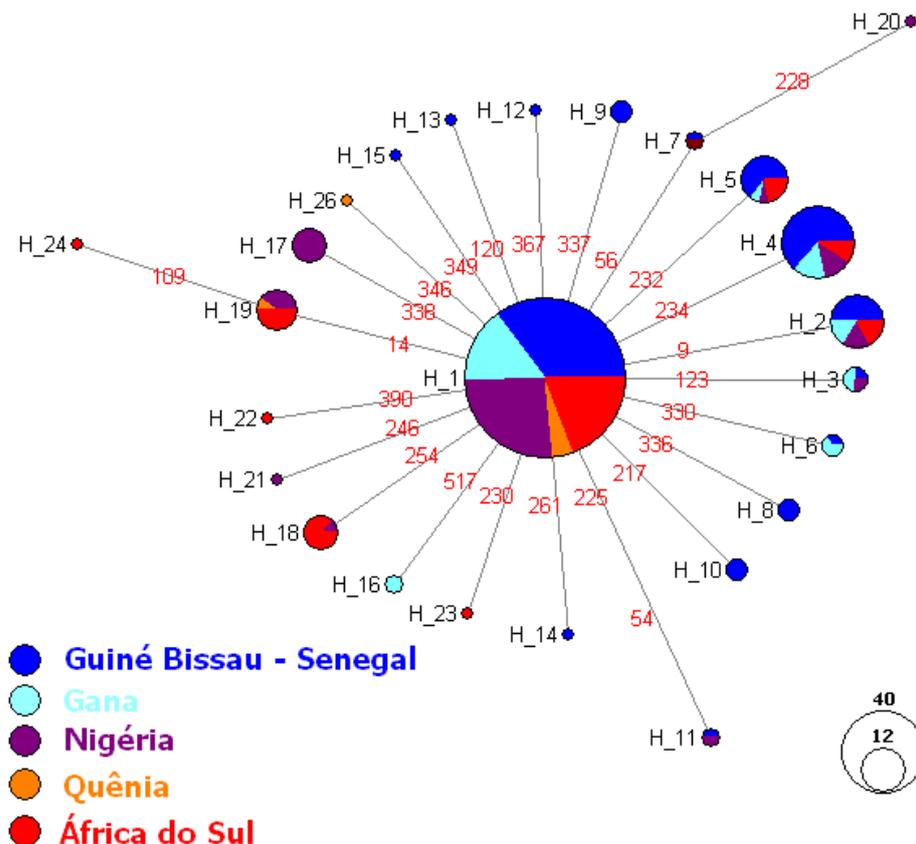
4.5. Rede de Haplótipos da população nativa de *B. ibis*

4.5.1. RC do DNAmít

A rede de haplótipos da RC do DNAmít apresenta-se em forma de estrela. Esse padrão é esperado quando a população passou por expansão populacional (Figura 20). O haplótipo H1 encontra-se no meio da rede e foi o haplótipo com a maior ocorrência, presente em todas as localidades. Nem sempre o haplótipo mais comum é o ancestral, mas nesse conjunto de dados há maior probabilidade que seja porque além da

ocorrência ele está posicionado na parte central da rede. Alguns haplótipos encontrados nas extremidades dos ramos da rede se apresentaram em frequência alta e estão bem distribuídos (H2, H4 e H5).

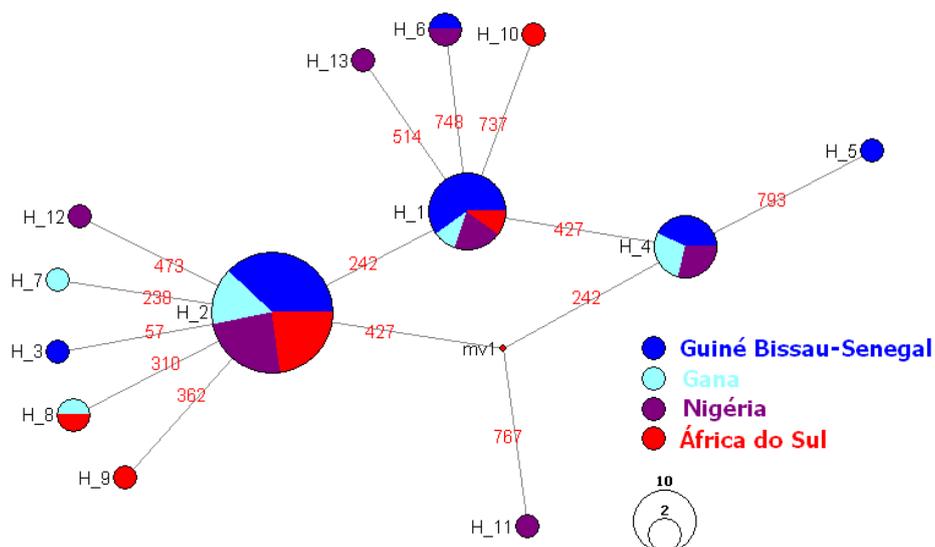
Figura 20. Rede de haplótipos baseada na variação da RC do DNAmIt nas populações africanas de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior está a legenda com a cor de cada população e a escala. Os números em vermelho indicam a posição do sítio onde ocorreu a substituição dentro do gene estudado.



4.5.2. ATPases 6 e 8 do DNAmIt

A rede traçada com os dados desse marcador mostra ausência de estruturação da diversidade genética (Figura 21). A presença de vários haplótipos em baixa frequência, separados por uma única substituição entre haplótipos frequentes, e bem distribuídos geograficamente é esperada quando ocorre desequilíbrio demográfico recente. Além disso, a rede apresenta dois sítios com duas substituições que formam uma reticulação (sítios 242 e 427), pois as duas mutações ocupam as mesmas posições em haplótipos diferentes.

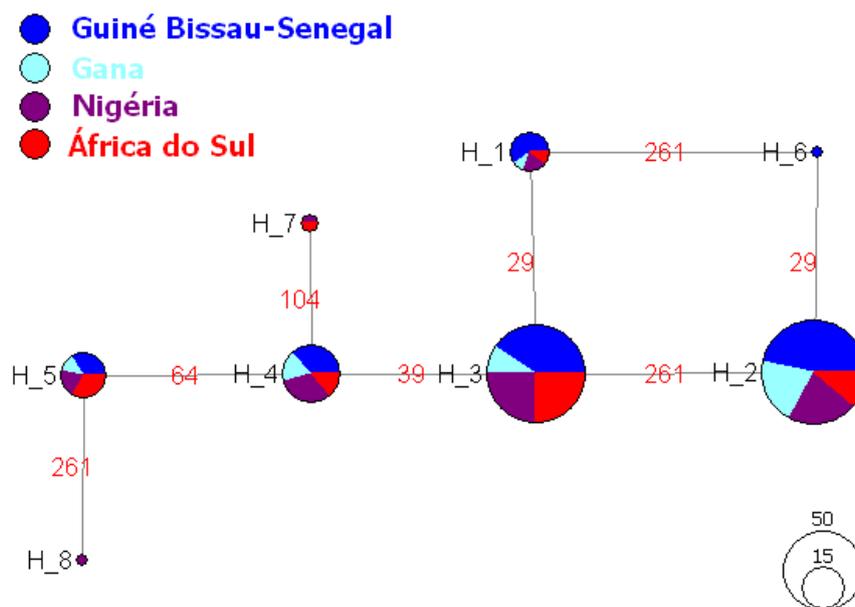
Figura 21. Rede de haplótipos baseada na variação do gene das ATPases 6 e 8 do DNAmít nas populações africanas de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está a legenda com a cor de cada população e a escala. Os números em vermelho indicam a posição dentro do gene do sítio onde ocorreu a substituição.



4.5.3. TGFB2 do DNA nuclear

Como no caso anterior a rede baseada nos dados desse marcador nuclear mostra ausência de estruturação genética (Figura 22). Cinco (H1, H2, H3, H4 e H5) dos oito haplótipos encontrados estão presentes em todas as localidades amostradas. Os outros três haplótipos (H6, H7 e H8) ocorreram em baixa frequência. Como no caso anterior, foi também observada presença de reticulação (sítios 261 e 29) na rede.

Figura 22. Rede de haplótipos baseado na variação do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está a escala e na superior à esquerda a legenda das cores. Os números em vermelho indicam a posição dentro do gene do sítio onde ocorreu a substituição.



4.6. Parâmetros genéticos nas populações brasileiras (área colonizada) de *B. ibis*

4.6.1. Diversidade genética das populações brasileiras de *B. ibis*

4.6.1.1. RC do DNAmIt

A população de Pernambuco apresentou os maiores índices de variabilidade em comparação as das outras populações brasileiras (Tabela 20). Fernando de Noronha apresentou o menor valor de Hd. O menor valor de $\theta(\pi)$ foi encontrado na colônia paraense. A população menos diversa avaliada pelo $\theta(S)$ e a segunda menos diversa em termos de π foi a de Fernando de Noronha.

Tabela 20. Índices de diversidade da RC do DNAmIt nas populações brasileiras de *B. ibis*. N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – Hd: desvio padrão de Hd, π : diversidade nucleotídica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$.

	N	S	H	Hd	DP – Hd	π	DP - π	$\theta(\pi)$	DP- $\theta(\pi)$	$\theta(S)$	DP- $\theta(S)$
PA N-BR	30	5	6	0.538	0.099	0.00118	0.0003	0.616	0.500	1.262	0.661
RN NE-BR	32	5	6	0.633	0.065	0.00175	0.0003	0.915	0.650	1.242	0.648
FN NE-BR	32	4	5	0.532	0.087	0.00121	0.0003	0.633	0.508	0.993	0.560
PE NE-BR	22	6	6	0.797	0.052	0.00255	0.0004	1.338	0.863	1.646	0.833
SP SE-BR	31	4	4	0.568	0.078	0.00167	0.0004	0.877	0.632	1.001	0.566
RS S-BR	30	5	5	0.536	0.097	0.00141	0.0004	0.740	0.564	1.262	0.661
Brasil	177	10	11	0.595	0.035	0.00160	0.0002	0.839	0.600	1.739	0.657

4.6.1.2. ATPases 6 e 8 do DNAmIt

A população mais diversa pelo Hd foi a de Pernambuco e pelos outros índices foi a do Rio Grande do Sul (Tabela 21), A população amostrada no Pará apresentou apenas um haplótipo para esse marcador e seus índices de diversidades foram igual zero (Tabela 21).

Tabela 21. Índices de diversidade das ATPases 6 e 8 do DNAmIt nas populações brasileiras de *B. ibis*. N: tamanho amostral, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – Hd: desvio padrão de Hd, π : diversidade nucleotídica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$.

	N	S	H	Hd	DP - Hd	π	DP - π	$\theta(\pi)$	DP- $\theta(\pi)$	$\theta(S)$	DP- $\theta(S)$
PA N-BR	10	0	1	0.000	0.0000	0.00000	0.00000	0.000	0.000	0.000	0.000
RN NE-BR	10	1	2	0.356	0.1590	0.00045	0.00020	0.356	0.375	0.353	0.354
FN NE-BR	7	1	2	0.286	0.1960	0.00035	0.00024	0.286	0.341	0.408	0.409
PE NE-BR	7	2	3	0.714	0.1270	0.00106	0.00027	0.857	0.682	0.816	0.632
SP SE-BR	7	2	3	0.524	0.2090	0.00073	0.00033	0.571	0.521	0.816	0.632
RS S-BR	8	3	3	0.464	0.2000	0.00115	0.00060	0.929	0.710	1.157	0.781
Brasil	49	5	6	0.389	0.0840	0.00062	0.00015	0.481	0.423	1.121	0.572

4.6.1.3. TGFB2 do DNA nuclear

Pernambuco mostrou o maior valor de Hd e de π entre todas as colônias amostradas (incluindo as da África) (Tabelas 22). Essa população também mostrou os mais altos valores registrados no Brasil em termos de $\theta(\pi)$ e $\theta(S)$. A população menos variável segundo esses parâmetros foi a do Rio Grande do Norte.

Tabela 22. Índices de diversidade do TGFB2 do DNA nuclear nas brasileiras de *B. ibis*. N: tamanho amostral em número de cópias do íntron, S: número de sítios segregantes, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, DP – Hd: desvio padrão de Hd, π : diversidade nucleotídica, DP – π : desvio padrão de π , $\theta(\pi)$: parâmetro theta baseado em π , DP - $\theta(\pi)$: desvio padrão de $\theta(\pi)$, $\theta(s)$: parâmetro theta baseado em S e DP - $\theta(S)$: desvio padrão de $\theta(S)$.

	N	S	H	Hd	DP – Hd	π	DP - π	$\theta(\pi)$	DP- $\theta(\pi)$	$\theta(S)$	DP- $\theta(S)$
PA N-BR	12	4	4	0.788	0.090	0.0029	0.0005	1.409	0.926	1.325	0.794
RN NE-BR	8	1	2	0.536	0.123	0.0011	0.0003	0.536	0.493	0.386	0.386
FN NE-BR	22	4	4	0.641	0.082	0.0022	0.0005	1.039	0.719	1.097	0.631
PE NE-BR	16	5	6	0.858	0.054	0.0035	0.0004	1.683	1.040	1.507	0.826
SP SE-BR	22	5	6	0.745	0.064	0.0027	0.0005	1.312	0.850	1.372	0.733
RS S-BR	20	3	4	0.647	0.072	0.0017	0.0003	0.816	0.611	0.846	0.540
Brasil	100	5	6	0.71	0.031	0.0024	0.0002	1.171	0.760	0.966	0.479

As populações amostradas nas regiões brasileiras mostraram que a população de Pernambuco apresenta os maiores níveis de diversidade segundo todos os índices usados e dados da RC do DNAmít e do íntron do TGFB2. Em contraste o Rio Grande do Sul apresentou as mais altas diversidades (π , $\theta(\pi)$ e $\theta(S)$) pelos dados dos genes das ATPases 6 e 8. Dependendo do índice e do marcador analisado, as populações do Pará, Rio Grande do Norte e Fernando de Noronha apresentaram os menores valores de diversidade genética.

4.6.2. Diferenciação genética entre as populações brasileiras (área colonizada) de *B. ibis*

4.6.2.1. RC do DNAmít

Os valores do F_{ST} par a par entre as colônias brasileiras foram baixos e, na sua maioria, não significativos (Tabela 23). Após a correção estatística, a diferenciação detectada entre os pares de populações Pernambuco e Pará, Pernambuco e Rio Grande do Sul não foram significantes.

Tabela 23. F_{ST} par a par entre as populações brasileiras de *B. ibis* usando o gene da RC do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	PA N-BR	RN NE-BR	FN NE-BR	PE NE-BR	SP SE-BR	RS S-BR
--	---------	----------	----------	----------	----------	---------

PA N-BR	-					
RN NE-BR	0.0122	-				
FN NE-BR	-0.0029	-0.0057	-			
PE NE-BR	0.0492	0.0116	0.0163	-		
SP SE-BR	0.0020	-0.0251	0.0054	0.0275	-	
RS S-BR	-0.0130	0.0154	0.0208	0.0523	-0.0065	-

4.6.2.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít

Os F_{ST} par a par entre as populações brasileiras mostraram diferenciação significativa entre os pares Pernambuco e Pará, Pernambuco e São Paulo, mas após a correção de comparações múltiplas nenhum valor permaneceu significativo (Tabela 24).

Tabela 24. F_{ST} par a par entre as populações brasileiras de *B. ibis* usando o gene das ATPases 6 e 8 do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	PA N-BR	RN NE-BR	FN NE-BR	PE NE-BR	SP SE-BR	RS S-BR
PA N-BR	-					
RN NE-BR	0.11111	-				
FN NE-BR	0.05405	0.05923	-			
PE NE-BR	0.47103	0.14038	0.33333	-		
SP SE-BR	0.09091	0.06667	0.01067	0.26878	-	
RS S-BR	0.10576	-0.06025	0.04465	-0.02114	0.03509	-

4.6.2.3. TGFB2 do DNA nuclear

Nenhum dos valores de F_{ST} par a par entre as populações brasileiras foram significantes e, no geral, foram muito baixos (Tabela 25).

Tabela 25. F_{ST} par a par entre as populações brasileiras de *B. ibis* usando o gene do íntron do TGFB2 do DNA nuclear. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$.

	PA N-BR	RN NE-BR	FN NE-BR	PE NE-BR	SP SE-BR	RS S-BR
PA N-BR	-					
RN NE-BR	-0.0118	-				
FN NE-BR	0.0019	0.0826	-			
PE NE-BR	-0.0106	-0.0270	0.0852	-		
SP SE-BR	-0.0249	-0.0218	-0.0117	-0.0051	-	
RS S-BR	-0.0103	-0.0521	0.0900	-0.0360	-0.0097	-

4.6.3. Histórico Demográfico das populações brasileiras (área colonizada) de *B. ibis*

Os testes de neutralidade e as estatísticas da *mismatch distribution* foram calculados considerando-se o total dos indivíduos do Brasil para os dados dos genes da ATPase 6 e 8 e do íntron do TGFB2, pois o tamanho amostral foi muito pequeno para cada subpopulação brasileira. Nos dados da RC de DNAmít, essa análise foi detalhada a nível subpopulacional.

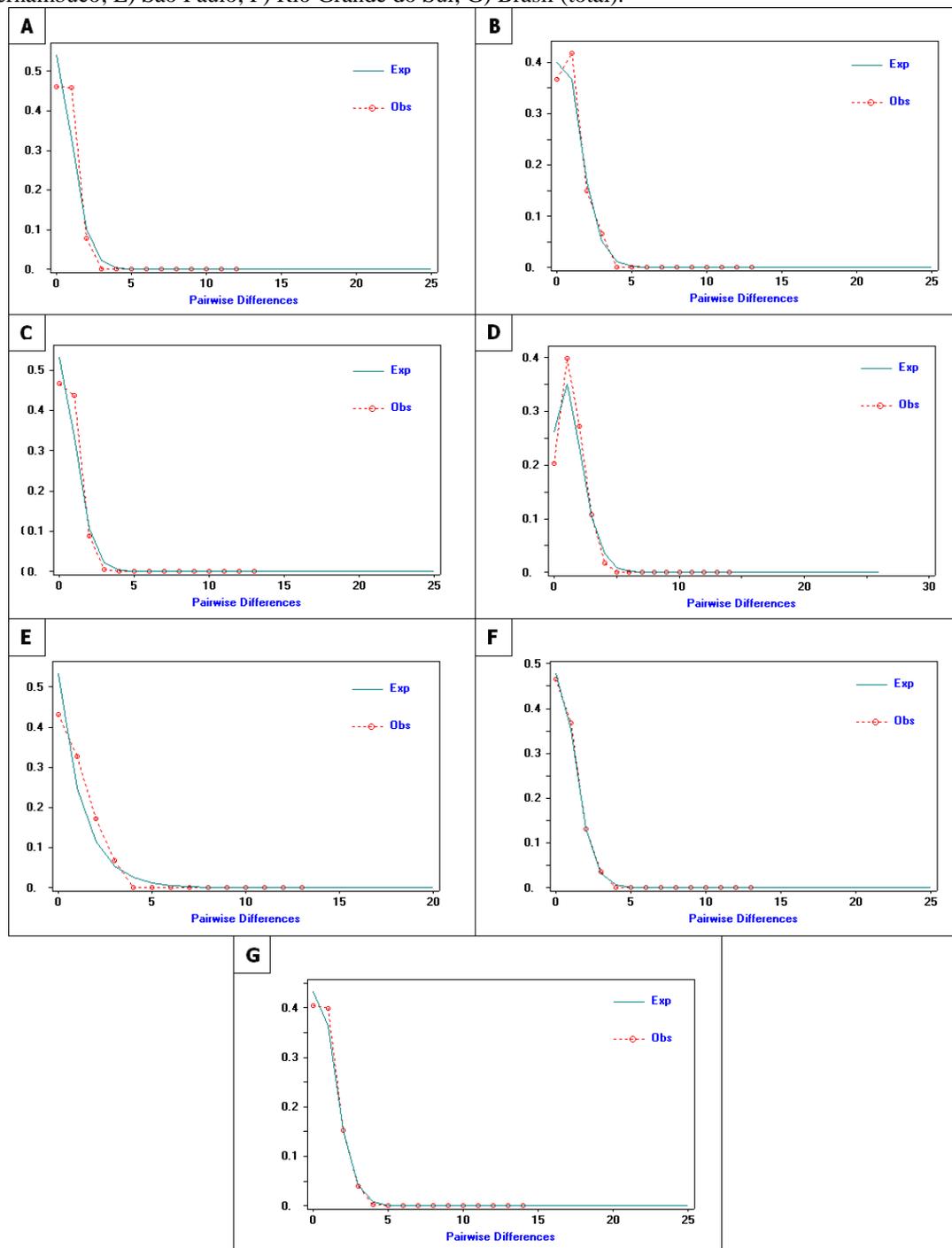
4.6.3.1. RC do DNAmIt

Desvios significativos da neutralidade não foram detectados para a maioria das populações brasileiras (Tabela 26). Apenas a população do Pará mostrou uma diferença significativa em relação ao modelo neutro pelo teste Fs, porém essa diferença não foi suportada após a correção estatística. Por outro lado, as curvas da *mismatch distribution* e os valores não significativos de SSD encontrados para quase todas as populações brasileiras (exceto para São Paulo) não permitiram rejeitar a hipótese de expansão populacional (Tabela 26 e Figura 23). O *Bayesian Skyline Plot* revelou estabilidade demográfica (Figura 24).

Tabela 26. Testes de neutralidade e os estatísticos da *mismatch distribution* da RC do DNAmIt nas populações brasileiras de *B. ibis*. Fs (FU, 1997), D (TAJIMA, 1989), R2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002), rg (HARPENDING et al., 1993) e SSD. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). * Indicam os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

	Fs	D	R2	Rg	SSD
PA N-BR	-3.200	-1.39642	0.0730	0.1517	0.02153
RN NE-BR	-1.832	-0.70521	0.0927	0.0857	0.01098
FN NE-BR	-1.776	-0.91529	0.0877	0.1294	0.01482
PE NE-BR	-1.243	-0.58041	0.1169	0.0893	0.00746
SP SE-BR	0.116	-0.3148	-0.3148	0.0505	0.27012*
RS S-BR	-1.423	-1.12808	0.0763	0.0756	0.01290
Brasil	-5.177	-1.2251	0.0422	0.0743	0.00608

Figura 23. Curvas de *mismatch distributions* baseadas nos dados da RC do DNAmIt nas populações brasileiras de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico. A) Pará; B) Rio Grande do Norte; C) Fernando de Noronha; D) Pernambuco; E) São Paulo; F) Rio Grande do Sul; G) Brasil (total).



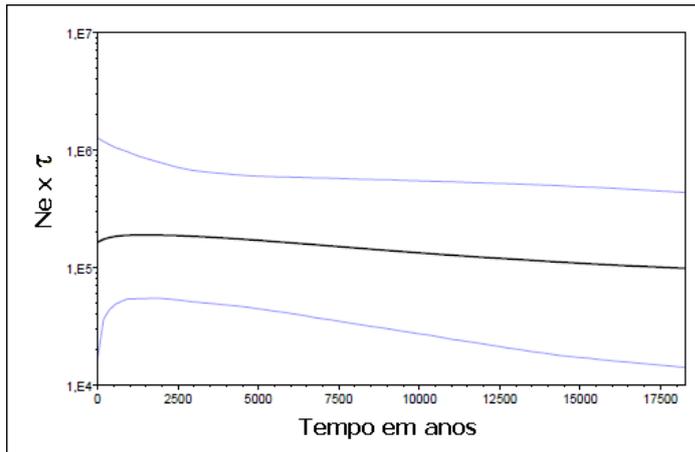


Figura 24. História demográfica da população brasileira de *B. ibis* usando a metodologia *Bayesian Skyline Plot* baseada na RC do DNAmIt. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade.

4.6.3.2. ATPases 6 e 8 do DNAmIt

O valor significativo de F_s de F_u e o valor de SSD não significativo para a *mismatch distribution*, obtidos para os dados com esse marcador na população brasileira indicam que pode ter ocorrido desequilíbrio demográfico num passado recente (Tabela 27 e Figura 25). Por outro lado, a reconstrução da história demográfica pelo *Bayesian Skyline Plot* mostrou estabilidade demográfica na população brasileira de *B. ibis*.

Tabela 27. Testes de neutralidade e os estatísticos da *mismatch distribution* das ATPases 6 e 8 do DNAmIt na população brasileira de *B. ibis*. F_s (FU, 1997), D (TAJIMA, 1989), R2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002), r_g (HARPENDING et al., 1993) e SSD. Os valores em negrito são significativos ($p < 0.05$).

	F_s	D	R2	R_g	SSD
Brasil	-3.425	-1.38918	0.0599	0.1501	0.00089

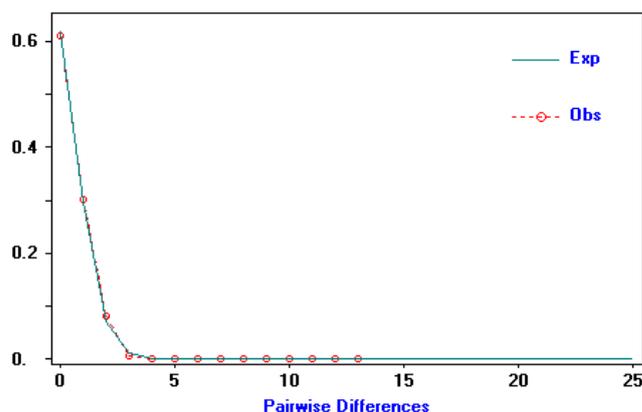


Figura 25. Curva de *mismatch distribution* baseada nos dados dos genes das ATPases 6 e 8 do DNAmIt da população brasileira de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico.

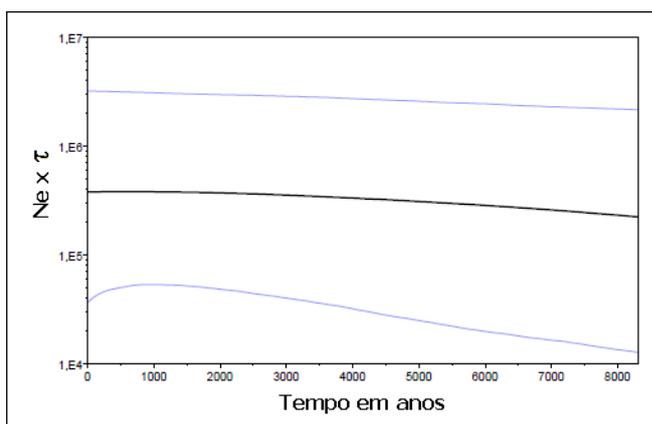


Figura 26. História demográfica da população brasileira de *B. ibis* usando-se a metodologia *Bayesian Skyline Plot* baseada nos genes ATPases 6 e 8 do DNAmít. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade.

4.6.3.3. TGFB2 do DNA nuclear

Os testes de neutralidade não resultaram em valores significativos, mas o valor do SSD foi baixo e não significativo, resultado que não descarta a forma unimodal da *mismatch distribution*, esperada para uma condição de não-equilíbrio demográfico (Tabela 28 e Figura 27). A história demográfica da população brasileira pela metodologia do *Bayesian Skyline Plot* mostrou uma tendência à estabilidade demográfica com uma leve tendência a diminuição do tamanho populacional, nos últimos 20 000 anos (Figura 28).

Tabela 28. Testes de neutralidade e os estatísticos da *mismatch distribution* do íntron nuclear TGFB2 na população brasileira de *B. ibis*. Fs (Fu, 1997), D (Tajima, 1989), R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), rg (Harpending *et al.*, 1993) e SSD. Nenhum valor foi significativo para $p \leq 0.05$.

	Fs	D	R2	rg	SSD
Brasil	0.127	0.45325	0.1171	0.052	0.0007

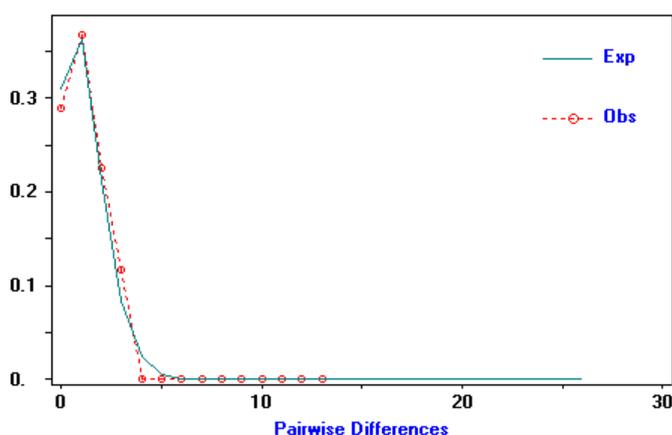


Figura 27. Gráfico da *Mismatch distribution* do íntron nuclear do TGFB2 da população brasileira de *B. ibis*. Em vermelho mostra-se a distribuição observada e em verde a esperada para uma população em desequilíbrio demográfico.

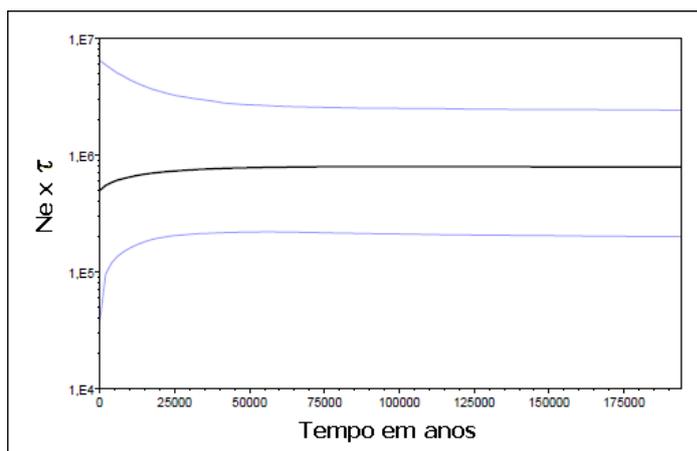


Figura 28. História demográfica da população brasileira de *B. ibis* usando a metodologia *Bayesian Skyline Plot* baseada no íntron do TGFB2 do DNA nuclear. A linha preta é a mediana estimada e as duas linhas azuis mostram o limite inferior e superior a 95% de credibilidade.

4.7. Análise comparativa entre as populações brasileiras e africanas de *B. ibis*

4.7.1. Diversidade Genética

Um achado interessante foi que a população de Pernambuco mostrou índices maiores de variabilidade (π na RC do DNAmít, Hd e $\theta(\pi)$ no íntron do TGFB2), em comparação com as outras populações. No entanto, o teste de Mann-Whitney mostrou que não existem diferenças significativas entre os valores de todo os índices de diversidade genética achados nas populações africanas e brasileiras (para os três fragmentos gênicos analisados).

4.7.2. Diferenciação genética entre as populações africanas e brasileiras de *B. ibis*

4.7.2.1. RC do DNAmít

Verificou-se que existe uma diferenciação genética significativa para a maioria dos valores de F_{ST} par a par determinados para os pares de populações formados por um integrante brasileiro e um africano (Tabela 29). As exceções são para as populações do Pará e do Rio Grande do Sul que não diferiram significativamente das de Guiné Bissau-Senegal, Gana e Quênia. Além disso, Cabo Verde não se diferenciou significativamente de nenhuma das populações brasileiras.

Tabela 29. F_{ST} par a par entre populações das regiões africanas e as brasileiras de *B. ibis* usando o gene da RC do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). * Indica os valores significativos após a correção de Benjamini-Hochberg.

	Guiné Bissau – Senegal	Gana	Nigéria	Quênia	África do Sul	Cabo Verde
PA N-BR	-0.0095	0.0180	0.0342*	0.0350	0.0468*	-0.0066
RN NE-BR	0.0416*	0.0804*	0.1099*	0.1067*	0.1056*	0.0222
FN NE-BR	0.0248*	0.0629*	0.0834*	0.0937*	0.0818*	0.0185
PE NE-BR	0.0786*	0.1065*	0.1383*	0.1211*	0.1329*	0.0172
SP SE-BR	0.0223	0.0526*	0.0787*	0.0782*	0.0822*	0.0111
RS S-BR	-0.0016	0.0183	0.0354*	0.0278	0.0499*	0.0003

4.7.2.2. ATPases 6 e 8 do DNA mitocondrial

Comparando-se os valores de F_{ST} par a par entre populações brasileiras e as africanas observá-se diferenciação significativa entre a África do Sul e Pernambuco, mas essa diferenciação não se manteve após a correção de Benjamini-Hochberg (1995) (Tabela 30). As amostras do Rio Grande do Norte e do Rio Grande do Sul foram as que mostraram os níveis mais baixos de diferenciação, quando comparadas com as regiões da África.

Tabela 30. F_{ST} par a par entre as regiões africanas e as brasileiras de *B. ibis* usando o gene das ATPases 6 e 8 do DNAmít. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	Guiné Bissau-Senegal	Gana	Nigéria	África do Sul
PA N-BR	0.0584	0.0362	0.0354	-0.0251
RN NE-BR	-0.0429	-0.0487	-0.0454	-0.0338
FN NE-BR	0.0538	0.0241	0.0258	-0.0100
PE NE-BR	0.0471	0.1123	0.0561	0.2652
SP SE-BR	0.0768	0.0447	0.0442	0.0327
RS S-BR	-0.0608	-0.0620	-0.0591	0.0191

4.7.2.3. TGFB2 do DNA nuclear

Os valores de F_{ST} par a par baseados nesse marcador entre as populações da África e do Brasil revelaram uma baixa diferenciação genética. Foi encontrada diferenciação significativa apenas entre a África do Sul e Pernambuco, África do Sul e Rio Grande do Sul, porém essa diferenciação não se manteve significativa após correção estatística (Tabela 31).

Tabela 31. F_{ST} par a par entre as regiões africanas e as brasileiras de *B. ibis* usando o gene do íntron TGFB2 do DNA nuclear. Os valores em negrito são significativos ($p \leq 0.05$). Nenhum valor foi significativo após a correção de Benjamini-Hochberg.

	Guiné Bissau - Senegal	Gana	Nigéria	África do Sul
PA N-BR	-0.0236	-0.0062	-0.0078	0.0223
RN NE-BR	-0.0282	0.0008	-0.0010	0.0304
FN NE-BR	0.0563	0.0463	-0.0009	-0.0045
PE NE-BR	-0.0014	-0.0107	0.0317	0.0936
SP SE-BR	-0.0149	-0.0198	-0.0282	-0.0054
RS S-BR	-0.0186	-0.0231	0.0121	0.0718

4.7.3. Rede de haplótipos

4.7.3.1. RC do DNAmít

A topologia da rede de haplótipos envolvendo as populações brasileiras e africanas se apresentou em forma de estrela (Figura 29). Destacam-se três haplótipos nos extremos da rede, encontrados unicamente nas populações brasileiras (H_27, H_28 e H_29)

H_14	1			1				1
H_15	1							
H_16		2						
H_17			7					
H_18			1		6			
H_19			4	1	5			
H_20			1					
H_21			1					
H_22							1	
H_23							1	
H_24							1	
H_25	1							
H_26				1				
H_27						1		
H_28							1	1
H_29							2	2

4.7.3.2. ATPases 6 e 8 do DNAmít

A rede de haplótipos desse marcador mostra haplótipos em alta frequência, separados por poucas substituições de haplótipos que ocorreram em baixa frequência (Figura 30). Foram encontrados três haplótipos exclusivos do Brasil, posicionados nos extremos da rede (H_14, H_15 e H_16) (Tabela 33 e Figura 30). Além disso, foram achados quatro haplótipos compartilhados entre a população africana nativa e a colonizada brasileira (H_1, H_2, H_4 e H_5).

Figura 30. Rede de haplótipos baseada na variação das ATPases 6 e 8 do DNAmít nas populações africanas e brasileiras de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está escala e legenda. Os números em vermelho indicam a posição dentro do gene do sítio onde ocorreu a substituição.

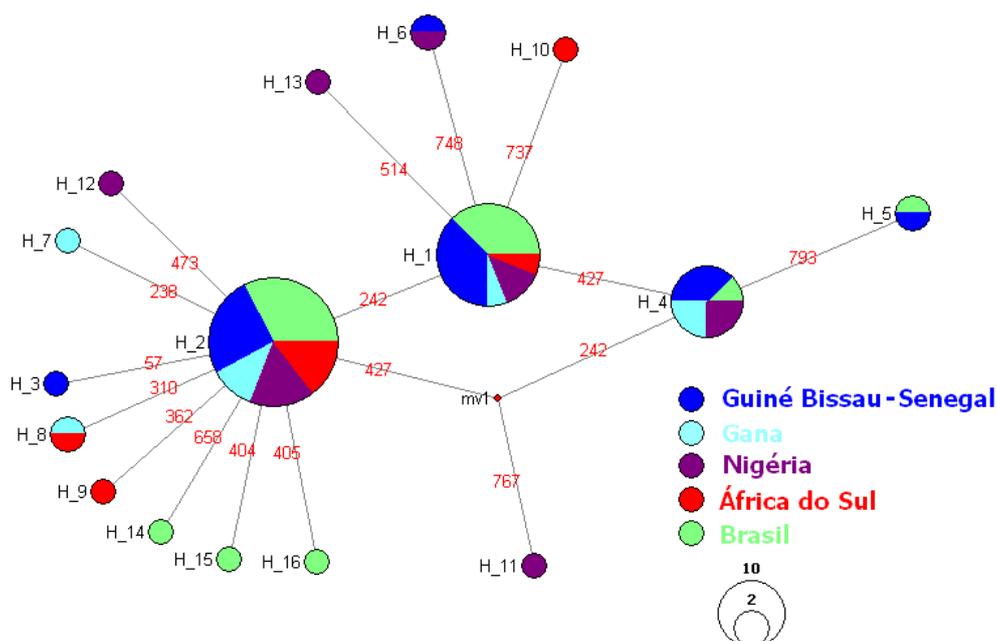


Tabela 33. Ocorrência dos haplótipos das ATPases 6 e 8 do DNAmít nas regiões amostradas de *B. ibis*.

	Guiné Bissau - Senegal	Gana	Nigéria	África do Sul	PA N-BR	RN NE-BR	FN NE-BR	PE NE-BR	SP SE-BR	RS S-BR
H_1	6	1	2	1		2		3		1
H_2	30	13	19	17	10	8	6	3	5	6
H_3	1									
H_4	3	2	2					1		
H_5	1									1
H_6	1		1							
H_7		1								
H_8		1		1						
H_9				1						
H_10				1						
H_11			1							
H_12			1							
H_13			1							
H_14							1			
H_15									1	
H_16									1	

4.7.3.3. TGFB2 do DNA nuclear

A rede dos haplótipos desse marcador apresentou seis haplótipos compartilhados entre os dois continentes (H_1, H_2, H_3, H_4, H_5 e H_7) (Tabela 34 e Figura 31). Não foi encontrado com esse marcador nenhum haplótipo exclusivo da região brasileira. Dois haplótipos ocorreram apenas nas populações africanas H_6 e H_8.

Figura 31. Rede de haplótipos baseada na variação do íntron nuclear TGFB2 nas populações africanas e brasileiras de *B. ibis*. Os haplótipos estão representados por circunferências cujo tamanho é proporcional à sua ocorrência. Na parte inferior à direita está escala e legenda. Os números em vermelho indicam a posição dentro do gene do sitio onde ocorreu a substituição.

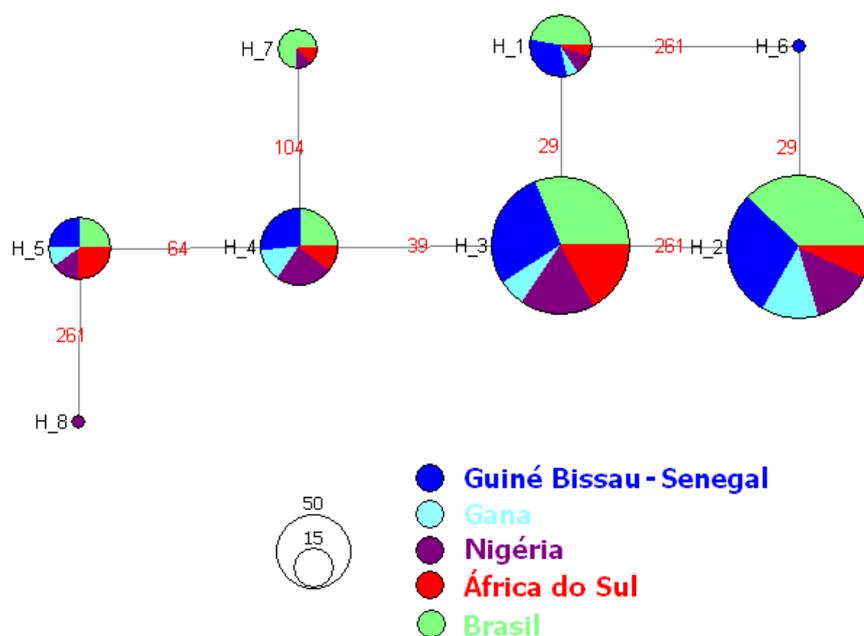


Tabela 34. Ocorrência dos haplótipos do íntron do TGFB2 do DNA nuclear nas regiões amostradas de *B. ibis*.

	Guiné Bissau- Senegal	Gana	Nigéria	África do Sul	PA N-BR	RN NE-BR	FN NE-BR	PE NE-BR	SP SE-BR	RS S-BR
H_1	6	1	2	1	3		2	2	1	1
H_2	34	15	16	8	5	3	5	12	9	10
H_3	26	6	16	16	2	5	2	6	7	7
H_4	8	4	7	3	1		3		1	2
H_5	5	2	3	5	1		2		2	
H_6	1									
H_7			1	1			2	2	2	
H_8			1							

5. DISCUSSÃO

5.1. Homoplasias da RC do DNAmIt

Registro na literatura têm demonstrado que parte da variação encontrada na RC do DNAmIt em algumas populações é explicada pela presença de sítios homoplásticos (WAN; LIU; ZHANG, 2012). A inclusão dessas regiões homoplásticas em análises genéticas pode dificultar as interpretações dos sinais filogeográficos (AVISE, 2000). No presente trabalho foram adotados dois critérios que permitiram identificar os sítios homoplásticos para que fossem em seguida retirados das análises desenvolvidas. Foram descartados os sítios de nucleotídeos que pareados com pelo menos outros dois apresentaram quatro tipos de gametas, segundo o teste de Hudson e Kaplan (1985) e sítios que se encontravam em regiões com altos valores de π . Segundo esses critérios, foram identificados e expurgados nove sítios homoplásticos no gene estudado da RC de *B. ibis*.

O padrão de variação achado na RC do DNAmIt pode ser explicado por vários eventos que são discutidos a seguir. A duplicação da região controladora do DNAmIt é um deles e tem sido reportada em várias espécies de aves, incluindo em um membro da família Threskiornithidae (filogeneticamente próxima a Ardeidae) (EBERHARD; WRIGHT; BERMINGHAM, 2001; ABBOTT et al., 2005; CHO et al., 2009). Esses rearranjos gênicos criam a possibilidade de conversão gênica e evolução em concerto que dificultam o estudo dos padrões microevolutivos (TATARENKOV; AVISE, 2007). Eventos de recombinação tem sido reportados também no DNAmIt em vários taxa animais (PIGANEAU; GARDNER; EYRE-WALKER, 2004). A recombinação pode causar ambiguidade na resolução da história evolutiva de um haplótipo (TEMPLETON et al., 2000). No entanto, Berlin, Smith e Ellegren (2004) demonstraram em duas espécies de aves (*Parus caeruleus* e *Falco peregrinus*) que as homoplasias da RC do DNAmIt não foram originadas por recombinação. Em nosso estudo, os testes de recombinação RDP (MARTIN; RYBICKI, 2000), GENECONV (PADIDAM; SAWYER; FAUQUET, 1999; SAWYER, 1989) e MAXCHI (SMITH, 1992; POSADA; CRANDALL, 2001) não mostraram evidência de recombinação, mas pelo teste de Hudson e Kaplan (1985) (que pressupõe um modelo mutacional de sítios infinitos) foram encontrados sítios com mais de quatro tipos de gametas, considerados como recombinantes. A região controladora apresenta uma taxa de substituição

aproximadamente 7.5 vezes mais rápida do que o resto do genoma mitocondrial (QUINN'S, 1992; WENINK et al., 1996). Essa elevada taxa de mutação pode causar saturação mutacional, produzindo regiões homoplásticas. No entanto, a saturação geralmente é atingida quando a divergência do conjunto de dados estudados supera os 10% (RUOKONEN; KVIST, 2002), porém no nosso estudo essa divergência foi menor do que 1%. Além disso, o gráfico de transições e transversões versus distância genética não evidenciou saturação mutacional nos dados analisados. O fato de se estudar uma região tão variável que foge do modelo de sítios infinitos sugere que as homoplasias se devam a heterogeneidade das taxas de evolução entre os sítios. Após o expurgo desses sítios, a RC do DNAmít se manteve como a mais informativa, apresentando uma maior porcentagem de sítios polimórficos em comparação com os outros genes estudados.

5.2. Diversidade Genética nas populações africanas de *B. ibis*

Rollins e col. 2011 sugeriram o uso do $\theta(S)$ para se avaliar a diversidade genética de populações que tenham sofrido flutuações demográficas muito recentes, como no caso daquelas presentes em áreas recém colonizadas, após invasões. Verificamos nesse estudo (Tabelas 2, 3 e 4), entretanto, que os desvios padrão estimados para $\theta(S)$ e para o $\theta(\pi)$ foram muito altos, tornando as comparações desses valores pouco robustas.

A amostra de Senegal apresentou os maiores valores de diversidade genética com todos os índices estimados para a RC do DNAmít, o marcador mais variável analisado. Esse valor pode estar enviesado pelos valores altos encontrados na colônia localizada no Zoológico de Dakar. Os dados do fragmento das ATPases 6 e 8 revelaram pelo valor de $\theta(S)$ a Nigéria com uma diversidade 40% maior do que encontrada em Guiné Bissau. Esse alto valor da Nigéria de $\theta(S)$ seria explicado por um excesso de alelos raros nesse país, evidenciados também na rede de haplótipos (Figura 21). Esse valor pode ter sido enviesado pelos altos valores encontrados na população de Fusa. Assim, tanto para o Senegal (RC do DNAmít) como para a Nigéria (ATPases 6 e 8), os níveis altos de diversidades genéticas podem ser explicados pelos achados em única colônia (Zoológico-Senegal, Fusa-Nigéria). Observa-se que caso essas duas colônias sejam expurgadas da análise, a homogeneidade torna-se ainda maior entre essas regiões.

A população da África do Sul mostrou menores níveis de diversidade genética pelas duas regiões mitocondriais, um resultado que pode estar relacionado com as mudanças

climáticas ocorridas durante o Pleistoceno tardio. Durante esse período, ocorreu o último máximo glacial caracterizado por baixos níveis de precipitação e queda na temperatura da África. Essas mudanças foram mais drásticas na região sul da África do que na região equatorial (LEZINE et al., 2013). Na região tropical da África existiram áreas com melhores condições que poderiam ter servido de locais de refúgio (ANHUF et al., 2006). A região da África do Sul teria sido abandonada pelas populações durante o último máximo glacial e depois recolonizada após esse período de mudanças climáticas, explicando assim a menor variabilidade genética achada.

Dados de diversidade baseados no íntron nuclear revelaram valores semelhantes de diversidade genética entre as colônias e também entre os países africanos amostrados. Essa maior homogeneidade poderia ser explicada pela taxa de mutação mais baixa do genoma nuclear, pelo alto fluxo gênico e pelos mecanismos de herança dos genes autossômicos (VILLABLANCA; RODERICK; PALUMBI, 1998).

5.3. Estruturação populacional das populações africanas de *B. ibis*

As amostras foram coletadas em áreas geograficamente distantes e os resultados da AMOVA apontaram para uma baixa estruturação populacional. Os F_{ST} par a par entre as regiões africanas mostraram resultados semelhantes. Dos fragmentos dos três genes analisados, o mais variável (RC do DNAmIt) forneceu os maiores valores de diferenciação entre as regiões africanas. A África do Sul se diferenciou significativamente de duas regiões amostradas (de Guiné Bissau-Senegal e da Nigéria). O teste de Mantel foi significativo para o modelo de isolamento por distância, com os dados dos dois genes (RC do DNAmIt e TGFB2). Entretanto, essa correlação parece ser causada por um viés das colônias mais afastadas que são também as mais diferenciadas localizadas na África do Sul. Quando a amostra desse país foi retirada da análise, a correlação desapareceu.

As amostras dos países de Gana e Quênia foram menores e podem não ser representativas das diversidades populacionais desses dois países. Os valores de F_{ST} não significativos entre a África do Sul e esses dois países podem ser, portanto, explicados por uma limitação da amostragem e não por não-diferenciação real entre essas duas populações. Por outro lado, a diferenciação significativa entre a África do Sul e Guiné Bissau-Senegal e da Nigéria pode ser suportado pelas diferenças entre as condições

climáticas encontradas nessas áreas (KOTTEK et al., 2006), as quais podem fazer com que pressões de seleção locais modelem a distribuição da diversidade genética encontrada.

Como explicar a diferenciação entre a Nigéria, localizada mais no interior do continente e a região de Guiné Bissau – Senegal, localizada na costa noroeste africana? A região amostrada da Nigéria está posicionada no interior e apresenta um *pool* gênico diferente das populações encontradas na costa. As garças vaqueiras quando se dispersam seguem rotas de migração e uma das prováveis rotas deve ser a que acompanha a costa oeste do continente. Segundo essa hipótese, as populações do litoral noroeste da África migrariam e se utilizariam das linhas costeiras para se orientar, movimentando-se no sentido norte - sul, ao longo da costa (GILL, 2007). Segundo esse padrão, os migrantes da costa noroeste não trocariam integrantes de outras populações, localizadas mais no interior do continente, explicando essa diferenciação populacional.

Dados dos fragmentos das ATPases 6 e 8 e do íntron nuclear do TGFB2 apresentaram menor nível de variação e não resultaram em valores de F_{ST} par a par estatisticamente significativos entre si, porém os maiores valores encontrados envolveram a região da África do Sul.

A baixa estruturação encontrada entre as populações dos países africanos de *B. ibis* pode ser explicada pelo seu comportamento migratório sazonal e pelos deslocamentos erráticos dos indivíduos juvenis (KUSHLAN; HANCOCK, 2005; BROWDER, 1973). Diversos grupos de aves apresentam uma capacidade de dispersão alta o que promove o fluxo gênico entre populações e resulta numa baixa estruturação genética, reportada para diversas espécies (BURG; CROXALL, 2001; CADENA, 2011; CABANNE et al., 2012), apresentando algumas delas padrões sazonais migratórios (LIU; KELLER; HECKEL, 2011; KRAUS et al., 2013) e outros padrões para aves não-migratórias (KEKKONEN et al., 2011). A estruturação genética baixa encontrada entre populações de *B. ibis* é, portanto, um padrão esperado para espécies como a dessa garça que apresenta características migratórias e alta capacidade de dispersão.

As estimativas de subdivisão populacional de F_{ST} pressupõem que as populações estejam no equilíbrio deriva genética-migração (WRIGHT, 1931). O tempo para se

alcançar esse estado de equilíbrio pode demorar um número grande de gerações, dependendo da taxa de migração (m) e do tamanho efetivo (N_e) (CROW; AOKI, 1984). A equação estimada por Crow e Aoki (1984) mostra que quanto maior a m , menor o tempo para se alcançar o equilíbrio e se o m for muito pequeno esse tempo vai depender diretamente do N_e . Como a garça-vaqueira apresenta alta capacidade dispersora, ela terá uma taxa alta de migração (espera-se um alto m), logo, em poucas gerações as populações atingirão esse equilíbrio. Esse equilíbrio deriva-fluxo gênico será alcançado em um número menor de gerações para os genes mitocondriais do que para os genes nucleares (ZINK; BARROWCLOUGH, 2008). Essas previsões indicam que apesar de se terem passadas poucas gerações desde o início da colonização pela garça vaqueira de algumas regiões estudadas, os valores encontrados de F_{ST} foram calculados em uma condição de equilíbrio ou quase equilíbrio deriva-fluxo genético. Apesar das limitações, a estatística F tem sido usada para evidenciar diferenciação em estudos de populações invasoras de várias espécies (FLEISCHER et al., 2008; GHABOOLI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2010; WAN; LIU; ZHANG, 2012).

Os valores de F_{ST} podem ser enviesados pela taxa de mutação do gene estudado, pela seleção natural e/ou por eventos históricos (NEIGEL, 1997; TEMPLETON, 2006). Maiores valores de F_{ST} são esperados, por exemplo, quando calculados com base em regiões gênicas com taxa alta de substituição (EFREMOV, 2005). Os maiores níveis de diferenciação encontrados pela RC do DNAmít em relação aos determinados com os outros genes é esperado por essa diferença na taxa de mutação. Os valores de F_{ST} podem ser enviesados pela seleção. Valores baixos de F_{ST} são esperados quando os genes estudados estão sob efeito da seleção negativa ou balanceadora, enquanto que valores altos de F_{ST} são esperados sob o efeito da seleção positiva (NIELSEN, 2005; BARREIRO et al, 2008). Efeitos da seleção podem ser evidenciados num *locus* e nos *loci* ligados. Os resultados obtidos nesse estudo apontam baixos níveis de estruturação pelos dois sistemas analisados (DNA nuclear e mitocondrial), descartando que o efeito da seleção tenha influenciado o padrão encontrado. Outra condição que pode levar a um viés no F_{ST} é quando ocorre miscigenação entre populações geneticamente diferenciadas (TEMPLETON, 2006). Os resultados desse estudo mostraram uma baixa estruturação entre populações, logo, se ocorreu miscigenação, ela não resultou em algum sinal detectável.

5.4. Histórico demográfico das populações africanas de *B. ibis*

Os sinais de expansão variaram conforme a variabilidade do marcador. A RC do DNAmít foi a que mostrou resultados mais evidentes de sinais de expansão, enquanto que as evidências foram fracas ou inexistentes pelo genes das ATPases 6 e 8 e do íntron nuclear. Os dados dos fragmentos mitocondriais revelaram desvios da neutralidade ou não equilíbrio demográfico em várias populações africanas. No entanto, foram encontrados valores significativos de SSD para os dados de RC da África do Sul. As curvas de *mismatch distributions* baseadas na variação das ATPases 6 e 8 para Gana e Nigéria se apresentaram como bimodais. Provavelmente por esse motivo os SSD resultaram significativos também para esses dois países. Quando a *mismatch distribution* apresenta padrão bimodal, esse pode ser um sinal do resultado de miscigenação de linhagens divergentes (TAYLOR; KELLER, 2007). Apesar dos testes de neutralidade não serem significativos para a região nuclear, o análise de SSD não rejeitou a hipótese de expansão demográfica. Os íntrons nucleares possuem uma taxa de substituição aproximadamente 30 vezes menor do que a da RC (PETERS et al., 2008). O programa PHASE não conseguiu resolver as mutações raras, diminuindo os sítios variáveis do gene nuclear para quase metade da variação encontrada. Essa perda de informação pode ter enviesado as estimativas dos testes de neutralidade e estatísticos da *mismatch distribution* (GARRICK; SUNNUCKS; DYER, 2010). O sinal de expansão pouco intenso baseado no gene nuclear pode ser devido à sua baixa variação somada a impossibilidade do PHASE de resolver alelos raros em heterozigose, enviesando o resultado.

O Pleistoceno foi uma era geológica compreendida desde 1.8 milhões de anos até 12 milhares de anos atrás, caracterizada por mudanças climáticas drásticas (NILSSON, 1983; GIBBARD; VAN KOLFSCHOTEN, 2004). Um dos fenômenos climáticos importantes desse período foi último máximo glacial. O último máximo glacial é definido como a época em que o nível do mar e os mantos de gelo alcançaram o máximo, ocorrido aproximadamente há 20 milhares de anos antes do presente (CLARK et al., 2009). Durante esse período, a temperatura da África provavelmente foi 5°C em média menor do que a atual, assim como a precipitação foi entre 15 a 20% menor (MOREAU, 1963; PARTRIDGE; SCOTT; HAMILTON, 1999; GASSE, 2000). Essas condições criaram um ambiente desfavorável para as garças vaqueiras que dependem de áreas alagadas. Essas aves são gregárias e se reúnem em pousos à beira de corpos

d'água todos os dias fora do período de nidificação. Durante seu ciclo reprodutivo, essas aves se reúnem em colônias que geralmente estão posicionadas próximas à lagoas, represas, ou inseridas dentro do mangue. Como explicado no item 5.2. dessa discussão, regiões com essas características permaneceram disponíveis apenas nas regiões equatoriais durante o último máximo glacial. A suposição levantada partir dos dados de expansão foi que durante o último máximo glacial, as populações das garças dos locais onde as mudanças foram mais drásticas (latitudes maiores) migraram para regiões equatoriais e ali permaneceram até que as condições climáticas se restabeleceram nas regiões de maiores latitudes. O crescimento populacional detectado estaria ocorrendo após o final do último máximo glacial.

Desde o início do século XX indivíduos de *B. ibis* começaram a nidificar em novas regiões da África e as suas populações aumentaram em tamanho e na sua área de distribuição (SKEAD, 1952; TELFAIR, 2006; SI BACHIR et al., 2011). A expansão agrícola, a expansão da pecuária e as mudanças tecnológicas nos sistemas de irrigação na África promoveram esse rápido crescimento populacional (SKEAD, 1952; SIEGFRIED, 1965). A expansão do tamanho efetivo detectada nesse estudo foi datada pelo *Bayesian Skyline Plots* há 15000 anos no passado. Dado que essa metodologia é a mais robusta utilizada no nosso estudo para detectar flutuações demográficas, descartamos que os desvios dos testes de neutralidade detectados (Tabelas 17 e 18) pudessem ser atribuídos a expansão recente da população africana, registrada no século XX, mas são sinais do ocorrido em passado remoto.

Os *Bayesian Skyline Plots* das populações africanas individuais, construídos a partir dos dados dos três genes analisados, não mostraram desvios demográficos grandes. Esse fato seria explicado porque a intensidade do sinal demográfico pode variar segundo as espécies e inclusive populações (HO; SHAPIRO, 2011). Como as populações africanas de *B. ibis* apresentaram baixa estruturação, repetiu-se a análise com todas as amostras juntas. Nesse caso, na população da África total foram encontrados desvios demográficos maiores.

A expansão na população africana foi detectada baseando-se nos dados das três regiões gênicas pela metodologia *Bayesian Skyline Plot*. No entanto, o sinal foi mais evidente e robusto nas análises dos genes mitocondriais. Dado que o evento de expansão

populacional tem uma data recente (aproximadamente há 15000 anos), seria esperado que o sinal dos marcadores com maior taxa de substituição fosse o mais forte. Os *Bayesian Skyline Plots* da RC do DNAmít e do íntron do TGFB2 não mostraram variação demográfica antes do último máximo glacial. Em comparação o *Bayesian Skyline Plot* das ATPases 6 e 8 coalesceram há apenas 15 mil anos. Esses resultados se referem ao período do último máximo glacial até hoje porque a assinatura genética de contrações demográficas acontecidas antes desse último período glacial foi perdida, impossibilitando que eventos históricos mais antigos fossem detectados por essa metodologia (LARMUSEAU et al 2009; GRAN et al., 2012).

5.5. Rede de haplótipos das populações africanas de *B. ibis*

As redes de haplótipos baseadas nos genes mitocondriais mostraram topologias em forma de estrela, caracterizadas por um haplótipo comum em alta frequência e diversos haplótipos em frequências mais baixas. Esse padrão encontrado pode ser explicado supondo um gargalo populacional que eliminou parte da variação, seguido por um crescimento populacional (AVISE, 2000; HUANG; LIN, 2011). Outra explicação para esse padrão estaria baseada na suposição da ocorrência de uma forte seleção positiva sobre o haplótipo que se tornou o mais comum e sobre as regiões gênicas ligadas a ele devido ao efeito carona, eliminando-se parte da variação da população, relativa aos haplótipos não selecionados (ROGERS, 1997; KIM, 2006). Nesse caso, a seleção ocorreria numa das localidades e a variante selecionada seria transportada para o resto da população, via fluxo gênico, tendo sua frequência aumentada em diversas regiões. No entanto, os testes de neutralidade forneceram valores negativos e significativos, em especial os que apresentam um maior poder estatístico para detectar expansões (F_s de Fu e R_2 de Ramos-Onsins e Rozas) (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002), descartando assim a hipótese de que a seleção tivesse gerado esse padrão.

A disposição da rede baseada no íntron nuclear mostra estabilidade demográfica com forte fluxo gênico entre as populações africanas. O fato de não se ter achado topologia em formato estrela para o íntron do TGFB2 pode estar relacionado a não resolução de haplótipos pouco frequentes (ver item 5.4) ou à diferença entre os sinais filogeográficos. A literatura mostra um número grande de estudos em diferentes espécies onde os sinais encontrados pelos genes nucleares e mitocondriais não são totalmente coincidentes (GÓMEZ-ZURITA; VOGLER, 2003; MONSEN; BLOUIN, 2003; TOEWS;

BRELSFORD, 2012). Uma das possíveis causas para essa não concordância é a diferença entre os padrões de dispersão de cada sexo (PETERS; BOLENDER, PEARCE, 2012). Os resultados mostram que o 70% dos haplótipos encontrados no íntron nuclear estão distribuídos por todas as regiões amostradas. Em contraste, apenas 16% dos haplótipos da RC (sem incluir Quênia) e 15% dos haplótipos das ATPases 6 e 8 foram amostrados em todas as populações africanas. Esse resultado seria explicado supondo maior dispersão por parte dos machos do que pelas fêmeas. Essa hipótese não tem fundamentação científica porque esse padrão de dispersão não é o esperado para a maioria dos grupos de aves, incluindo os da ordem dos Pelecaniformes (GREENWOOD, 1980). Uma outra hipótese é a de que a seleção natural estaria eliminando parte da variação genética, tanto do genoma da mitocôndria quanto do nuclear, resultando em perda do sinal filogeográfico. Regiões intrônicas podem estar envolvidas com eventos de *splicing* alternativo e assim determinadas variantes desses íntrons podem influir diretamente no fenótipo e serem afetadas pela seleção natural (KE; ZHANG; CHASIN, 2008). No caso dos genes mitocondriais sob seleção, o expurgo dos alelos poderia estar sendo contrabalançado com a taxa alta de mutação, não afetando na detecção de padrões filogeográficos (ZINK; DROVETSKI; ROHWER, 2006).

5.6. Diversidade Genética das populações brasileiras e africanas de *B. ibis*

A população de Pernambuco foi a que apresentou uma maior diversidade dentre as regiões brasileiras. A colônia de Pernambuco pode ter sido formada por indivíduos pouco experientes provenientes de diversos locais. Indivíduos juvenis de garça-vaqueira dispersam erráticamente de colônias de alta densidade por falta de alimento (BROWDER, 1965). Quando vão se reproduzir os adultos experientes de aves coloniais emigram menos de locais com alta qualidade, mantendo uma alta densidade nelas (DANCHIN; BOULINIER; MASSOT, 1998), porém os migrantes juvenis podem não serem recrutados nas colônias de qualidade mais alta e, para se reproduzirem, migrarem para outros locais. Pernambuco reuniria assim indivíduos provenientes de outras regiões ou estaria recebendo migrantes novos vindos da costa africana.

Não foi detectada diferença significativa entre os valores dos índices de variabilidade genética entre as populações africanas e brasileiras, apesar dos valores não estarem completamente concordantes, considerando-se os marcadores e índices usados.

Populações invasoras podem apresentar valores altos de diversidade e inclusive maiores do que as populações nativas em dois cenários: quando existem várias populações-fonte diferenciadas geneticamente entre si ou quando ocorreram várias introduções. No caso de duas populações diferenciadas serem introduzidas num mesmo local, seria produzida uma população colonizada mista com maior diversidade (KOLBE et al., 2004). Como as populações africanas de *B. ibis* analisadas não mostraram subestruturação genética, eventos de miscigenação não explicariam a diversidade encontrada no Brasil. Para se analisar o segundo cenário é preciso avaliar-se os dados históricos. O primeiro registro da garça-vaqueira no continente americano foi no final do século XIX, porém sua expansão no continente foi documentada a partir da década de 1950 (TELFAIR II, 1983). Assumindo-se uma geração por ano, verifica-se que se passaram entre 75 e 100 gerações desde o início de sua colonização no Brasil. Como *B. ibis* desloca-se em pequenos bandos (entre 10 – 75 indivíduos) (TELFAIR II, 1983), não é provável que um número grande indivíduos tenha iniciado a população do Brasil. Se o tempo é insuficiente para que um grupo pequeno de indivíduos produzisse o grau de diversidade encontrado nas populações brasileiras, a hipótese mais provável para explicar essa diversidade encontrada no Brasil suporia diversas entradas que garantiriam a manutenção da diversidade.

5.7. Diferenciação populacional entre as populações brasileiras e africanas

Os maiores e significativos valores de diferenciação genética foram achados nos dados da RC do DNAmít do que pelos outros dois genes. Os valores de F_{ST} par a par foram significativos após a correção estatística de Benjamini-Hochberg (1995) para alguns pares na Tabela 29: i) Não há diferenciação genética significativa das populações de Guiné Bissau – Senegal, Gana e Quênia quando comparadas com as do Pará e Rio Grande do Sul, ii) Não há diferenciação entre todas as populações brasileiras e a de Cabo Verde. Existem duas hipóteses que podem explicar esse padrão: i) ocorrência de fluxo gênico alto entre as populações brasileiras e as populações nativas; ii) os cálculos de F_{ST} estariam enviesados pelo fato das populações não terem atingido o equilíbrio deriva-migração (FITZPATRICK et al., 2012).

Esse achado está de acordo com o registro histórico de colonização, pois o primeiro registro de uma colônia de garça vaqueira no Brasil foi na Ilha de Marajó (Pará) em 1964 (SICK, 1965) e 16 anos mais tarde a espécie foi reportada nidificando no Rio

Grande do Sul (BELTON, 1984). A amostra de Cabo Verde foi incluída nessa análise porque é um arquipélago localizado na costa africana, em posição geográfica estratégica, podendo funcionar como ponto de parada das garças migratórias, provenientes do sul europeu e pode ser um ponto atual intermediário de parada daquelas que continuam migrando e chegarão até o continente americano. Logo, o estudo do *pool* gênico da população dessa localidade pode contribuir para o estudo do processo de colonização do Brasil. Felicísimo, Muñoz e González-Solis (2008) mostraram que uma ave marinha (*Calonectris diomedea*) com padrão de migração entre África e América utiliza corredores de vento com menor custo de energia para realizar tal travessia. A “via de velocidade alta” usada pelo *Calonectris diomedea* sai da região ocidental da África e chega nas costas do nordeste, sudeste e até no sul do Brasil. Essa mesma rota poderia ter sido usada por *B. ibis* para chegar até litoral do Brasil. Em Cabo Verde não há registro de presença de colônias de nidificação de *B. ibis* e essas ilhas parecem funcionar como local de descanso dos indivíduos migratórios. Os achados nesse estudo indicam que essas ilhas parecem fazer parte da rota África-América do Sul. Registros da presença da garça-vaqueira em ilhas oceânicas como na de Santa Helena (1800 km de distância da África) e Tristão da Cunha (2800 km de distância da África), localizadas entre esses dois continentes são também indicativos dessa rota migratória (TELFAIR II, 2006). Valverde (2003) reportou que uma ave aninhada na Europa foi posteriormente encontrada na América Central, o fato que demonstra a migração de *B. ibis* usando os ventos alíseos.

5.8. Histórico demográfico das populações brasileiras de *B. ibis*.

A metodologia utilizada no nosso estudo pode detectar flutuações demográficas ocorridas após longos períodos temporais. Logo o esperado era que os testes de neutralidade, curvas e gráficos determinados fossem pouco sensíveis a um sinal da expansão recente ocorrida na população brasileira de garça vaqueira.

Não foram detectados sinais de flutuações do tamanho populacional no passado recente da espécie no Brasil, mesmo com o marcador de evolução mais rápida (RC). Eventos de expansão na escala de tempo das invasões biológicas (50 a 100 gerações) parecem não ser detectáveis por causa da escala de tempo com que acontecem as mutações (FITZPATRICK et al., 2012). Se flutuações demográficas tivessem sido detectadas nas populações introduzidas estariam mais relacionados aos processos históricos das

populações-fonte, por causa do polimorfismo ancestral, do que a eventos de pós-introdução. Registros de censo da espécie na América do Sul relatam que no ano 2002 existiam entre 11000 e 80000 pares de indivíduos na Venezuela e entre 33000 e 240000 na Argentina e Suriname (DELANY; SCOTT, 2002). DEVENISH e col. (Birdlife 2009) estimaram que na região Neotropical existem 3.250.000 espécimes de *Bubulcus ibis*. Como a espécie não existia na América do Sul até sua introdução (no final do século XIX), os censos demonstram um rápido aumento do tamanho populacional em poucas gerações.

5.9. Rede de haplótipos das populações africanas e brasileira de *B. ibis*

Haplótipos compartilhados entre a região nativa e a colonizada podem dar um indício de conectividade entre as duas regiões. Para se determinar a possível região-fonte foram analisados com especial atenção os haplótipos de pouca frequência na África. Cabe mencionar que todos os haplótipos compartilhados entre as populações africanas e brasileiras de *B. ibis* dos dois genes mitocondriais apresentaram pelo menos um indivíduo da região de Guiné Bissau – Senegal. 83% dos haplótipos compartilhados do íntron do TGFB2 apresentaram pelo menos um indivíduo da região de Guiné Bissau – Senegal. Analisando-se os genes mitocondriais verificou-se que existem três haplótipos (dois baseados nas RC do DNAmít e um na ATPases 6 e 8) com baixa ocorrência na África, restritos unicamente à região de Guiné Bissau – Senegal e compartilhados com populações brasileiras. Esse padrão não se repete nos haplótipos do TGFB2. Esses dados qualitativos apontam a região de Guiné Bissau – Senegal como uma possível população fonte, de onde saíram os indivíduos que migraram para o Brasil. Essa rota estaria de acordo com o mapa de ventos alísios (Figura 3) e com o corredor de ventos com mínimo custo de vôo (entre a costa ocidental da África e Brasil) (FELICÍSIMO; MUÑOZ; GONZÁLEZ-SOLIS, 2008).

Os dois genes de DNAmít apresentaram seis haplótipos restritos à população brasileira (3 no RC do DNAmít e 3 nas ATPases 6 e 8). Três explicações alternativas podem ser supostas para explicar a ocorrência restrita desses haplótipos. i) Eles apareceram de novo na população brasileira por mutação, ii) Eles tiveram origem numa população nativa não amostrada e/ou iii) Eles não foram amostrados nas populações africanas estudadas. As hipóteses mais prováveis sobre a origem desses haplótipos seriam as duas

últimas, pois poucas gerações ocorreram desde a chegada da garça-vaqueira no continente americano.

5.10. Considerações finais

Ferramentas genéticas fornecem informações valiosas que podem ser usadas para se desvendar os processos de invasão. Na literatura podemos encontrar diversos exemplos de como a genética, acoplada aos dados de registros históricos, contribui para o esclarecimento de rotas de colonização de populações invasoras (ESTOUP; GUILLEMAUD, 2010). É necessário, entretanto, ponderar que as metodologias atuais apresentam várias limitações devido às escalas de tempo nas quais os processos aconteceram (FITZPATRICK et al., 2012). Processos de colonização não causados pelo homem e em espécies com capacidade dispersora alta (envolvendo geralmente baixa estruturação populacional) são mais difíceis de serem estudados e o estabelecimento preciso das populações-fonte e das rotas de invasão nem sempre é determinado. O padrão de diversidade genética encontrado nas populações brasileiras, em comparação com as africanas nesse estudo apontou para várias introduções de garças africanas no Brasil e sugeriu uma provável rota de entrada.

6. CONCLUSÕES

Os níveis das diversidades genéticas das populações africanas de *B. ibis* são semelhantes entre si e estão concordantes com a capacidade dispersora da espécie. A única exceção foi a África do Sul que apresentou menores níveis de diversidade. Os resultados foram discutidos supondo que fenômenos climáticos que ocorreram durante o último máximo glacial explicariam essa menor diversidade da África do Sul. Durante o último glacial, as populações da África do Sul provavelmente migraram para as regiões equatoriais da África e após esse período, há aproximadamente 15 mil anos atrás, essas populações de garça-vaqueira se expandiram e recolonizaram as áreas originais.

Os resultados apontaram baixa estruturação entre as populações africanas. A diferenciação detectada entre a África do Sul e as outras populações foi explicada supondo que a população da África do Sul ocupa um ambiente com clima diferente em relação aos outros locais amostrados. A diferenciação encontrada entre Guiné Bissau-Senegal e Nigéria foi discutida considerando-se as rotas migratórias e diferenças entre grupos garças que ocupam regiões costeiras e no interior do continente nessa faixa tropical.

Níveis de diversidades genéticas semelhantes foram encontrados nas populações nativas e colonizadas de garça vaqueira, sugerindo que o processo de colonização do continente americano tenha envolvido múltiplas introduções. A baixa estruturação genética das populações de *B. ibis* dificultou o esclarecimento do processo de invasão. Nosso estudo mostrou, no entanto, que se juntando os dados históricos e os genéticos pode ser estabelecida uma provável rota de migração entre os dois continentes. Essa rota se inicia na costa noroeste da África, envolve paradas em ilhas oceânicas como as de Cabo Verde, e chega ao continente sul americano pelo norte e/ou sul do litoral brasileiro.

Dos três genes analisados, foi o da RC do DNAmIt que forneceu maior informação tanto para resolver sobre o histórico das populações das regiões nativas quanto para estabelecer possíveis rotas de migração (África-América). O uso desse marcador foi útil e permitiu reconstruir os processos que modelaram a distribuição das diversidades genéticas atuais de *B. ibis*, na escala de tempo em que estes eventos aconteceram.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C.L. et al. An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 11, p. 3605-3613, 2005.

ANHUF, D. et al. Paleo-environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 239, p. 510–527, 2006.

AVISE, J.C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 18, p. 489–522, 1987.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the History and Formation of Species**. London: Harvard University Press, 2000. 447 p.

AVISE J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3–15, 2009.

BALSAC, H.; MAYAUD, N. **Les oiseaux du Nord-ouest de l’Afrique**. Paris: Le chevalier, 1962. 486 p.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.

BARBOSA-FILHO, R.C. et al. A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis* Linnaeus, 1758) e o atobá-de-pé-vermelho (*Sula sula* Linnaeus, 1766) no Arquipélago de Fernando de Noronha: uma abordagem ecológica comparativa. **Ornithologia**, v. 3, n. 2, p. 101-114, 2009.

BARREIRO, L.B. et al. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. **Nature Genetics**, v. 40, n. 3, p. 340-345, 2008.

BELLA, S.D.; AZEVEDO-JUNIOR, S.M. Considerações sobre a ocorrência da garça-vaqueira, *Bulbucus ibis* (Linnaeus) (Aves, Ardeidae), em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 57-63, 2004.

- BELLA, S.D.; AZEVEDO-JÚNIOR, S.M. Composição da dieta da Garça-vaqueira, *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) (Ciconiiformes; Ardeidae) no Agreste Pernambucano, Nordeste do Brasil. **Ornithologia**, v. 2, n. 2, p. 65-71, 2007.
- BELTON, W. Birds of Rio Grande do Sul, Brazil. Part 1: Rheidae through Furnariidae. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 178, n. 4, p. 369-636, 1984.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BERLIN, S.; SMITH N.G.C.; ELLEGREN, H. Do Avian Mitochondria Recombine? **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, p. 163–167, 2004.
- BLACKBURN, T.M.; LOCKWOOD, J.L.; CASSEY, P. **Avian Invasions, The Ecology and evolution of Exotic Birds**. Oxford: Oxford University Press, 2009. 305 p.
- BRIDGMAN, H.A.; MADDOCK, M. Meteorological conditions and cattle egret migration: An update. **Notornis**, v. 41, p. 189-205, 1994.
- BRITO, P.H.; EDWARDS, S.V. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. **Genetica**, v. 135, n. 3, p. 439-455, 2008.
- BROWDER, J.A. Long-distance movements of Cattle Egrets. **Bird Banding**, v. 44, n. 3, p. 158-170, 1973.
- BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: NEI, M.; KOEHN, R. K. **Evolution of Genes and Proteins**. Massachusetts: Sinauer Associates. 1983. p. 62–88.
- BURG, T.M.; CROXALL, J.P. Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 10, p 2647-2660, 2001.
- BURGER, J. Competition between Cattle Egrets and Native North American Herons, Egrets, and Ibises. **Condor**, v. 80, p. 15-23, 1978.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. Age differences in cattle egrets *Bubulcus ibis*, foraging with wild ungulates in Kenya. **Ardea**, v. 77, n. 2, p. 201-204, 1989.
- CABANNE, G.S. et al. Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish

Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). **Journal of Ornithology**, v. 153, n. 4, p. 371-384, 2012.

CADENA, C.D. No population genetic structure in a widespread aquatic songbird from the Neotropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 58, n. 3, p. 540–545, 2011.

CARVAJAL-RODRIGUEZ, A.; DE UÑA-ALVAREZ, J. Assessing Significance in High-Throughput Experiments by Sequential Goodness of Fit and q-Value Estimation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9: e24700, p. 1-8, 2011.

CHAPIN, J.P. The birds of the Belgian Congo. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 65, p. 1-397, 1932.

CHO, H-J. et al. Tandem duplication of mitochondrial DNA in the black-faced spoonbill, *Platalea minor*. **Genes & Genetic Systems**, v. 84, n. 4, p. 297-305, 2009.

CLARK, P.U. The Last Glacial Maximum. **Science**, v. 325, p. 710-714, 2009.

CODON CODE ALIGNER VERSION 4.0 (CodonCode Corporation, Centerville MA, USA).

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO). **Listas das aves do Brasil**. 10. ed. Brasil, 2011. 36 p.

CORRÊA, T.C. **Histórico demográfico e filogeografia em populações brasileiras de *Ardea alba egretta***. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CRISLER, T.; JAMESON, C.; BROUWER, J. An updated overview of the birds of W National Park, southwest Niger. **Malimbus**, v. 25, n. 1, p. 4-30, 2003.

CROSBY, G.T. Spread of the Cattle Egret in the Western Hemisphere. **Bird Banding**, v. 43, n. 3, p. 205-212. 1972.

CROW, J.F.; AOKI, K. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 81, p. 6073–6077. 1984.

DAMI, L.; BENNETS, R.E.; HAFNER, H. Do Cattle Egrets Exclude Little Egrets from Settling at Higher Quality Sites within Mixed-species Colonies? **Waterbirds**, v. 29, n. 2, p. 154-162, 2006.

- DANCHIN, E.; BOULINIER, T.; MASSOT, M. Conspecific reproductive success and breeding habitat selection: implications for the study of coloniality. **Ecology**, v. 79, p. 2415–2428, 1998.
- DAVIS, M.A. **Invasion Biology**. Oxford: Oxford University Press, 2009. 243p.
- DELANY, S.; SCOTT, D. **Waterbirds population estimates**. 3. ed. Wageningen: Wetlands International, 2002. 226 p. (Wetlands International Global Series, 12).
- DEMEY, R. Notes on the birds of the coastal and Kindia area, Guinea. **Malimbus**, v. 17, n. 2, p. 85-99, 1995.
- DEVENISH, C. et al. **Important Bird Areas Americas - Priority sites for biodiversity conservation**. 2009. Quito, Ecuador: BirdLife International, 2009. (BirdLife Conservation Series No. 16).
- DRUMMOND, A. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, p. 1185–1192, 2005.
- DRUMMOND, A. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.
- EBERHARD, J.R.; WRIGHT, T.F.; BERMINGHAM, E. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1330–1342, 2001.
- EFREMOV, V.V. Equilibrium between genetic drift and migration at various mutation rates: simulation analysis. **Russian Journal of Genetics**, v. 41, n. 9, p. 1055–1058, 2005.
- ELLEGREN, H. Molecular evolutionary genomics of birds. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, p. 120–130, 2007.
- ESTOUP, A.; GUILLEMAUD, T. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? **Molecular Ecology**, v. 19, p. 4113–4130, 2010.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FELICÍSIMO, A.M.; MUÑOZ, J.; GONZÁLEZ-SOLIS, J. Ocean surface winds drive dynamics of transoceanic aerial movements. **PLoS ONE**, v.8, n. 3, p. e2928, 2008.

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

FITZPATRICK, B.M. et al. What can DNA tell us about biological invasions? **Biological Invasions**, v. 14, p. 245–253, 2012.

FLEISCHER, R.C. et al. As the raven flies: using genetic data to infer the history of invasive common raven (*Corvus corax*) populations in the Mojave Desert. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 464-474, 2008.

FOLK, T.H. et al. Food Habits of Cattle Egrets on St. Croix, U.S. Virgin Islands. **The Wilson Bulletin**, v. 112, n. 2, p. 268–271, 2000.

FU, Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

GARRICK, R.C.; SUNNUCKS P.; DYER R.J. Nuclear gene phylogeography using PHASE: dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 118, p. 1-17, 2010.

GASSE, F. Hydrological changes in the African tropics since the Last Glacial Maximum. **Quaternary Science Reviews**, v. 19, p. 189-211, 2000.

GHABOOLI, A., et al. Multiple introductions and invasion pathways for the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Eurásia. **Biological Invasions**, v. 13, p. 679–690, 2011.

GIBBARD, P.; VAN KOLFSCHOTEN, T. The Pleistocene and Holocene Epochs. In: GRADSTEIN, F. M.; OGG, J. G.; SMITH, A. G. Gilbert (Ed.). **A Geologic Time Scale 2004**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 610 p.

GILL, F.B. **Ornithology**. 3. Ed. New York. W. H. Freeman and Company, 2007. p. 758.

GÓMEZ-ZURITA, J.G.; VOGLER, A.P. Incongruent nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in the *Timarcha goettingensis* species complex (Coleoptera, Chrysomelidae). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 5, p. 833–843, 2003.

- GONÇALVES, A. et al. Genetic evidence for high propagule pressure and long-distance dispersal in monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) invasive populations. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3336–3350, 2010.
- GRAN, W.S. et al. Limits of Bayesian skyline plot analysis of mtDNA sequences to infer historical demographies in Pacific herring (and other species). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, p. 203–212, 2012.
- GREENWOOD, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 1140–1162, 1980.
- GRIMES, L.G. **The birds of Ghana. BOU Checklist**. London: British ornithologists' Union. 1987.
- HARE, M.P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, p. 700–706, 2001.
- HARPENDING, R.C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**, v. 66, p. 591-600, 1994.
- HEATWOLE, H. Some aspects of the association of Cattle Egrets with cattle. **Animal Behavior**, v. 13, p. 79–83, 1965.
- HELSENS, T. New information on birds in Ghana, April 1991 to October 1993. **Malimbus**, v. 18, n. 1, p: 1-9. 1996.
- HICKERSON, M.J. et al. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 291–301. 2010.
- HO, S.Y.W.; SHAPIRO, B. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 423–434, 2011.
- HUANG, J-P.; LIN, C-P. Lineage-specific late pleistocene expansion of an endemic subtropical gossamer-wing damselfly, *Euphaea formosa*, in Taiwan. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 94, p. 1-13, 2011.
- HUDSON, R.R. Gene genealogies and the coalescent process. In: FUTUYAMA D.; ANTONOVICS, J. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 1-44.

- HUDSON, R.R.; KAPLAN, N.L. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. **Genetics**, v. 111, p. 147–164, 1985.
- HUDSON, A.; BOUWMAN, H. New records of 45 bird species in the desert margins area of the North-West Province, South Africa. **Koedoe**, v. 49, n. 1, p. 91–98, 2006.
- KAMLER, J.F.; SUINYUY, T.N.; GOULDING, W. Cattle Egret and Common Ostrich associations in South Africa. **Ostrich**, v. 79, n. 1, p. 105–106, 2008.
- KE, S.; ZHANG, X.H-F.; CHASIN, L.A. Positive selection acting on splicing motifs reflects compensatory evolution. **Genome Research**, v. 18, n. 4, p. 533–543, 2008.
- KEKKONEN, J. et al. Low genetic differentiation in a sedentary bird: house sparrow population genetics in a contiguous landscape. **Heredity**, v. 106, p. 183–190, 2011.
- KIM, Y. Allele frequency distribution under recurrent selective sweeps. **Genetics**, v. 172, p. 1967–1978, 2006.
- KIZUNGU R.B. Birds of Irangi Forest, Albertine Rift, Democratic Republic of Congo. **Malimbus**, v. 23, n. 2, p. 77-86, 2001.
- KRAUS, R.H.S. et al. Global lack of flyway structure in a cosmopolitan bird revealed by a genome wide survey of single nucleotide polymorphisms. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 41–55, 2013.
- KOLBE, J.J. et al. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. **Nature**, v. 431, p. 177–181, 2004.
- KOTTEK, M. et al. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3, p. 259-263, 2006.
- KUSHLAN, J.A.; HAFNER, H. **Heron Conservation**. New York : Academic Press. 2000.
- KUSHLAN, J.A.; HANCOCK, J.A. **The herons**. Oxford : Oxford University Press, 2005.
- LARKIN, M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LARMUSEAU, M.H.D et al. Distributional and demographic consequences of Pleistocene climate fluctuations for a marine demersal fish in the north-eastern Atlantic. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 1138–1151, 2009.

LEZINE, A-M. et al. Towards an understanding of West African montane forest response to climate change. **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 1, p. 183–196, 2013.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIU, Y.; KELLER, I.; HECKEL, G. Range-wide genetic population structure of common pochard (*Aythya ferina*): a potentially important vector of highly pathogenic avian influenza viruses. **Ecology and Evolution**, v. 1, n. 4, p. 529–545, 2011.

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

MADDOCK, M.; BRIDGMAN, H. Cattle Egret migration and meteorological conditions. **Notornis**, v. 39, p. 73–86, 1992.

MARTIN, D.P.; RYBICKI, E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**, v. 16, p. 562-563, 2000.

MARTIN, D.P. et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2462-2463, 2010.

MONSEN, K.J.; BLOUIN, M.S. Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear–mitochondrial discordance. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3275–3286, 2003.

MOREAU, R.E. Vicissitudes of the African biomes in the Late Pleistocene. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 14, n. 2, p. 395-421, 1963.

MORGULIS, A. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1757-1764, 2008.

MORALEZ-SILVA, E. **Garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*): A diversidade genética no estudo do comportamento reprodutivo e na caracterização da população invasora brasileira**. 2013. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências e Genética e Evolução) –

Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MORRIS-POCOCK, J.A. et al. Concerted evolution of duplicated mitochondrial control regions in three related seabird species. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 14, p. 1-10, 2010.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 28, p. 105-128, 1997.

NIKOLAUS, N. The birds of the Parc National du Haut Niger, Guinea. **Malimbus**, v. 22, n. 1, p. 1-22, 2000.

NIELSEN, R. et al. Genomic scans for selective sweeps using SNP data. **Genome Research**, v. 15, p. 1566-1575, 2005.

NILSSON, T. **The Pleistocene: geology and life in the Quaternary ice age**. Stuttgart: D. Reidel Pub. Co., 1983. 651 p.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-225, 1999.

PARTRIDGE, T.C.; SCOTT L.; HAMILTON, J.E. Synthetic reconstructions of southern African environments during the Last Glacial Maximum (21-18 kyr) and the Holocene Altithermal (8-6 kyr). **Quaternary International**, v. 57-58, p. 207-214, 1999.

PEREIRA, S.L.; BAKER, A.J. Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (*Gallus gallus*) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 17, p. 1-8, 2004.

PETERS, J.L. et al. Multilocus phylogeography of a holarctic duck: colonization of North America from Eurasia by gadwall (*Anas strepera*). **Evolution**, v. 62, n. 6, p. 1469-1483, 2008.

PETERS, J.L.; BOLENDER, K.A.; PEARCE, J.M. Behavioural vs. molecular sources of conflict between nuclear and mitochondrial DNA: the role of male-biased dispersal in a Holarctic sea duck. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 14, p. 3562–3575, 2012.

PHILLIPS, R.B.; WIEDENFELD, D.A.; SNELL, H.L. Current status of alien vertebrates in the Galápagos Islands: invasion history, distribution, and potential impacts. **Biological Invasions**, v. 14, p. 461–480, 2012.

PIGANEAU, G.; GARDNER, M.; EYRE-WALKER, A. A Broad Survey of Recombination in Animal Mitochondria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 12, p. 2319-2325, 2004.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, p. 13757-13762, 2001.

PRIMMER, C.R. et al. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 603–612, 2002.

QUANTRILL, B.; QUANTRILL, R. The birds of the Parcours Vita, Yaoundé, Cameroon. **Malimbus**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 1998.

QUINN, T.W. The genetic legacy of Mother Goose phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. **Molecular Ecologist**, v. 1, p. 105–117, 1992.

RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS, J. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.

RAPPOLE, J.H.; DERRICKSON, S.R.; HUBÁLEK, Z. Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, p. 319-328, 2000.

RICHARDS, D. The birds of Conacry and Kakulima, Democratic Republic of Congo. **Malimbus**, v.4, n.2, p. 93-103, 1982.

ROGERS, A.R. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. **Evolution**, v. 49, p. 608-615, 1995.

ROGERS, A.R. Population Structure and Modern Human Origins. In: DONNELLY, P.; TAVARÉ, S. **Progress in population Genetics and Human Evolution**. (Ed.). New York: Springer-Verlag, 1997. p. 55-79.

ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 552-569, 1992.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOURO, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 8, p. 411-417, 2003.

ROLLINS, L.A. et al. Invasive species can't cover their tracks: using microsatellites to assist management of starling (*Sturnus vulgaris*) populations in Western Australia. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 1560–1573, 2009.

ROLLINS, L.A. et al. Mitochondrial DNA offers unique insights into invasion history of the common starling. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2307–2317, 2011.

RUOKONEN, M.; KVIST, L. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 3, p. 422-432, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSELL, D.W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SAUVAGE, A.; RODWELL, S.P. Notable observation of birds in Senegal (excluding Parc National des Oiseaux du Djoudj), 1984 – 1994. **Malimbus**, v.20, n.2, p. 75-122, 1998.

SAWYER, S. Statistical tests for detecting gene conversion. **Molecular Biology and Evolution**, v. 6, p. 526-538, 1989.

SCHOLTE, P.; DE KORT, S.; VAN WERRD, M. The birds of the Waza – Lagone area, far North Province, Cameroon. **Malimbus**, v. 21, n. 1, p. 16-50, 1999.

SEEDIKKOYA, K.; AZEEZ, P.A.; SHUKKUR, E.A.A. Cattle Egret *Bubulcus ibis* habitat use and association with cattle. **Forktail**, v. 21, p. 174-175, 2005.

SEKERCIOGLU, Ç.H.; RILEY, A. A brief survey of the birds in Kumbira Forest, Gabela, Angola. **Ostrich**, v. 76, n. 3-4, p. 111–117, 2005.

SHARAH, H.A., ALI, E.A., MOHAMMED, I.D. The Feeding Behavior of the Cattle Egrets, (*Bubulcus ibis* L.) in Northeastern Arid Zone of Nigeria. **Journal of Agriculture & Social Sciences**, v. 4, p. 6-12, 2008.

SI BACHIR, A. et al. Diet of the adult Cattle egret (*Bubulcus ibis* L.) in a new north african colony (Petite Kabylie, Algérie): taxonomic composition and variability. **Ardeola**, v. 48, n. 2, p. 217-223, 2001.

SI BACHIR, A. et al. Nest site selection and breeding success in an expanding species, the Cattle Egret *Bubulcus ibis*. **Ardea**, v. 96, n. 1, p. 99–107, 2008.

SI BACHIR, A. et al. The recent expansion of an avian invasive species (the Cattle Egret *Ardea ibis*) in Algeria. **Journal of Arid Environments**, v. 75, v. 11, p. 1232-1236, 2011.

SI BACHIR, A. et al. Cattle Egrets *Ardea ibis* use human-made habitat in a newly colonized area in northern Algeria. **Ostrich: Journal of African Ornithology**, v. 83, n. 1, p. 51-53, 2012a.

SI BACHIR, A. et al. Cattle Egrets *Ardea ibis* use human-made habitat in a newly colonised area in northern Algeria. **Ostrich** v. 83, n. 1, p. 51–53, 2012b.

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

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1997.

SIEGFRIED, W.R. The status of the Cattle Egret in the Cape Province. **The Ostrich**, v. 36, n. 3, p. 109-116, 1965.

SIEGFRIED, W. R. Feeding activity of the Cattle Egret. **Ardea**, v. 59, p. 38-46, 1971.

SIEGFRIED, W.R. Habitat and the modern range expansion of the Cattle Egret. In: Sprunt IV, A.; Ogden J. C.; Winckler, S. **Wading birds**, New York: Nad. Audubon Soc., 1978. p. 315-324.

SIEGFRIED, W.R. Aspects of the Feeding Ecology of Cattle Egrets (*Ardeola ibis*) in South Africa. **Journal of Animal Ecology**, v. 41, n. 1, p. 71-78, 1972.

SILVA-JR, J.M.; PERES-JR, A.K.; SAZIMA, I. *Euprepis atlanticus* (Noronha skink). Predation. **Herpetological Review**, v. 36, n. 1, p. 62-63, 2005.

- STEPHENS, M., SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 978-989, 2001.
- SKEAD, C.J. A study of the Black Crow *Corvus capensis*. **Ibis**, v. 94, p. 434-451, 1952.
- STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, p. 1162–1169, 2003.
- SIMBERLOFF, D. The role of propagule pressure in biological invasions. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 81–102, 2009.
- SLY, N.D. et al. Ancient islands and modern invasions: disparate phylogeographic histories among Hispaniola's endemic birds. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 23, p. 5012-5024, 2011.
- SMITH, J.M. Analyzing the mosaic structure of genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, p. 126-129, 1992.
- STONE, C.P.; ANDERSON, S.J. Introduced animals in Hawaii's natural areas. In: CRABB, A.C.; MARSH, R.E. **Proceedings of the thirteenth vertebrate pest conference University of California**. Lincoln: University of Nebraska. 1988. p. 134–140.
- STRANGE, I.J. Distribution of the Cattle Egrets to the Falkland Islands. **Gerfaut**, v. 69, p. 197-401, 1979.
- TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v. 105, p. 437-460, 1983.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p. 585-595, 1989.
- TAJIMA, F. Measurement of DNA polymorphism. In: TAKAHATA, N.; CLARK, A. G., Tokyo. **Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology**. Sunderland: Japan Scientific Societies Press Sinauer Associates, Inc., 1993. p. 37-59.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TATARENKOV, A.; AVISE, J.C. Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, p. 1795–1798, 2007.

TAYLOR, D.R.; KELLER, S.R. Historical range expansion determines the phylogenetic diversity introduced during contemporary species invasion. **Evolution**, v. 61, n. 2, p. 334–345, 2007.

TELFAIR II., R.C. **The Cattle Egret: a Texas focus and world view**. Texas: Texas A&M Univ. Press. 1983. 144 p.

TELFAIR II, R.C. **Cattle Egret (*Bubulcus ibis*)**, **The Birds of North America Online**. 2006. Disponível em: <<http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/113>>. Acesso em: abril de 2012.

TEMPLETON, A.R. **Population Genetics and Microevolutionary Theory**. New York: John Wiley & Sons. 2006, 705 p.

TEMPLETON, A.R. et al. Recombinational and mutational hotspots within the human Lipoprotein Lipase gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 66, p. 69-83, 2000.

TOEWS, D.P.L.; BRELSFORD, A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 3907–3930, 2012.

TSAOUSIS, A.D. et al. Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, p. 925–933, 2005.

UNDERHILL, L.G.; WHITTINGTON P.A.; CALF, K. M. Shoreline birds of Robben Island, Western Cape, South Africa. **Wader Study Group Bull**, v. 96, p. 37-39, 2001.

VALVERDE, J.A. **Memorias de un biólogo heterodoxo**. España: Quercus Ed., 2003.

VILLABLANCA, F.X.; RODERICK, G.K.; PALUMBI, S.R. Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 547-60, 1998.

WALSH, F. Records of birds seen North-Eastern Guinea in 1984-1985. **Malimbus**, v. 9, n. 2, p. 105-122, 1987.

- WAN, X.; LIU, Y.; ZHANG, B. Invasion history of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in the pacific-asia region: Two main invasion routes. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e36176, 2012.
- WATTERSON, G. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theoretical Population Biology**, v. 7, p. 256-276, 1975.
- WENINK, P.W. et al. Global mitochondrial DNA phylogeography of Holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). **Evolution**, v. 50, n. 1, p. 313-330, 1996.
- WEIR, J.T.; SCHLUTER, D. Calibrating the avian molecular clock. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2321–2328, 2008.
- WILSON, J.R.U. et al. Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 3, p. 136-144, 2009.
- WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-373, 2001.
- ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.
- ZINK, R.M.; DROVETSKI, S.V.; ROHWER, S. Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, p. 679–686, 2006.
- ZINK, R.M.; BARROWCLOUGH, G.F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2107–2121, 2008.