

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

CAROLINA ISABEL MIÑO

**“GENÉTICA DE POPULAÇÕES E RELAÇÕES DE PARENTESCO EM
CICONIIFORMES (AVES)”**

SÃO CARLOS

2010

**“GENÉTICA DE POPULAÇÕES E RELAÇÕES DE PARENTESCO EM
CICONIIFORMES (AVES)”**

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

CAROLINA ISABEL MIÑO

**“GENÉTICA DE POPULAÇÕES E RELAÇÕES DE PARENTESCO EM
CICONIIFORMES (AVES)”**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Evolução, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências e Genética e Evolução.
*Orientação: Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama***

SÃO CARLOS

2010

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

M666gp

Miño, Carolina Isabel.

Genética de populações e relações de parentesco em Ciconiiformes (Aves) / Carolina Isabel Miño. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

177 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética de populações. 2. Ave aquática. 3. *Ardea alba*. 4. *Mycteria americana*. 5. *Platalea ajaja*. 6. Acasalamento de animais. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

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

**GENÉTICA DE POPULAÇÕES E RELAÇÕES DE PARENTESCO
EM CICONIIFORMES (AVES).**

Tese de Doutorado de **Carolina Isabel Miño**

Banca Examinadora

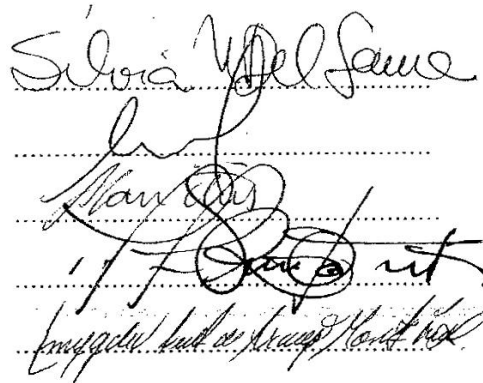
Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato

Profa. Dra. Alexandra Sanches

Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Prof. Dr. Emygdio Leite de Araújo Monteiro Filho


The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal dotted line. The signatures are: 1. Sílvia Nassif Del Lama, 2. Andrea Cristina Peripato, 3. Thales Renato Ochotorena de Freitas, and 4. Emygdio Leite de Araújo Monteiro Filho.

Dedico este trabalho, com amor, aos meus pais, Isabel e Hugo; à minha avó, Irma, e aos meus irmãos, Rocío e Manuel, por uma vida cheia de amor, apoio, companheirismo e construção.

Dedico este trabalho à memória da minha querida amiga Maria Cecilia Bernard, “Chuny”, eterna e bela colombina dos carnavais.

AGRADECIMENTOS

Acadêmicos e profissionais:

- À Professora Dra. Sílvia Nassif Del Lama, pela orientação durante esses vários anos de trabalho. Pelo seu carinho, apoio, dedicação e estímulo tanto na vida acadêmica quanto na pessoal;
- À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela oportunidade recebida de ser membro da sua excelente comunidade acadêmica e me enriquecer com as discussões e práticas científicas durante os anos de pósgraduação;
- Aos Professores membros da banca examinadora pelas sugestões recebidas, as que certamente contribuíram para a melhoria deste trabalho;
- Ao Professor Michael A. Russello (University of British Columbia – Okanagan, Canadá), pelo seu apoio e sua boa disposição em me receber no seu laboratório, pela ajuda com a análise e interpretação de dados e com a escrita de artigos científicos;
- Aos professores do PPG-GEv, muito especialmente ao Prof. Marco A. Del Lama, pelos ensinamentos recebidos e pela colaboração, direta ou indireta, em diferentes fases do desenvolvimento deste trabalho;
- Aos meus colegas e “ex-colegas” do Laboratório Genética de Aves (DGE – UFSCar): Iara Freitas Lopes, Thaís Camilo Corrêa, Luiza Helena da Silva Avelar, Juliana Rossi de Souza, Regiane Alberto (obrigada pela ajuda com a sexagem das aves!), Andiara Silos, Emmanuel Moraez, Emmeline Boni Campanini, Jorge Luis Rodriguez Malaver e Cynthia Martins Villar, pela colaboração, boa disposição, discussões estimulantes e risadas nos momentos de descontração durante esses anos todos. Obrigada pessoal!
- Aos meus colegas do *The Ecological Genomics Laboratory* (University of British Columbia – Okanagan): Anders Gonçalves da Silva, Philippe Henry, Yoamel M. García, Karen Frazer e Zijam Sim, pelas estimulantes discussões, a companhia nos momentos de distensão e a boa disposição para comigo durante minha estada no Canadá;
- Aos donos das fazendas do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, por nos ter permitido acessar as colônias reprodutivas localizadas nas suas propriedades;
- Aos colaboradores nos trabalhos de campo, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho: Sr. Sherer Sherezino, Matheus Schutte, Michel Gandra, Rodrigo Chinaglia, Galo,

Laylson, Admilson Moreira Torres (Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA);

- À Professora Dra. Norma Mortari (DGE – UFSCar), por ter gentilmente nos oferecido os serviços do Laboratório de Imunogenética;
- Ao Marcelo Cervini, do Laboratório de Imunogenética (DGE – UFSCar), pelo auxílio prestado com o uso do programa MEGABACE™ Fragment Profiler;
- Aos professores e pesquisadores: Michael Blouin, Jason Coombs, Christophe Herbinger, Adam Jones, Dimitry Konovalov, Tristan Marshall e Jinliang Wang, pela ajuda e as sugestões recebidas durante a fase de análise de dados do presente trabalho;
- Ao Centro Nacional de Pesquisas para a Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE) e ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) pela concessão das licenças para coleta e transporte das amostras utilizadas neste estudo;
- A Vanessa Morgan, pela ajuda com a genotipagem dos microssatélites, pelas inúmeras “caronas” em dias de chuva (e em outros não tão chuvosos), pelas longas conversas e pelo carinho e amizade;
- A Greissi e Heloisa, da secretaria do Programa de Pósgraduação em Genética e Evolução (PPG-GEv, UFSCar), pelo bom atendimento concedido durante todos esses anos;
- Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética e Evolução (DGE – UFSCar), pelo convívio durante esses anos todos;
- Ao Rodrigo Cabrera, Técnico de Informática do DGE (UFSCar), pelo auxílio prestado toda vez que algum problema aconteceu com os computadores do laboratório;
- Aos meus colegas do PPG-GEv (UFSCar) pelos momentos compartilhados; ao PPG-GEv e ao DGE (UFSCar) pela ajuda recebida;
- Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro recebido sem o qual não teria sido possível a execução deste trabalho.
- À University of British Columbia – Okanagan (Canadá) e ao Bureau Canadense de Educação Internacional (CBIE) - Governo do Canadá, pela ajuda financeira durante o estágio de investigação nesse país, na forma de bolsa sob o programa Líderes Emergentes das Américas (ELAP).

Não-acadêmicos, mas essenciais:

- Aos meus pais, por me apoiarem incondicionalmente em todos os meus empreendimentos e projetos. Aos meus irmãos e avó, por estarem sempre perto de mim, a pesar da distância física;
- A Manuela Rodríguez e Rodolfo Ramos, por me considerarem a sua “filha adotiva” e me brindarem sempre todo o seu amor e apoio;
- Às minhas amigas Ana Carolina Abrão Neri e Adriana Frias Renner, pelo amor, apoio, suporte, e bate-papos durante as nossas “convenções de bruxas” tão estimulantes, sobretudo em tempos difíceis. Gracias amigas!
- As minhas amigas Ana Laura Herrera e Nelci Pascual, por todo! Gracias chicas!
- Aos meus amigos e amigas: Elisa, Rosanna, Cecilia, Laura, Liliana, Aninha, Juan, Sebastián, Pietro, Luis, Margarita, Inés, Paula, Anabela, Marcela, Betania, Laurita, Gisela, Tato, Federico e Renato, por ter estado aí para compartilhar muitos momentos das nossas vidas e ter sabido compreender a minha distância física;
- A toda a minha família (primos, tios, sobrinhos) pela força, apoio e compreensão durante todos os anos de ausência física;
- A Rita de Cássia Frazão por ter me recebido na sua família como se fosse a sua filha. À Suellen e Marcela, as minhas irmãs da alma;
- Aos bebês e crianças da minha vida: Franco, Verena, Elián, Luiza, Diogo, Nathan, Isabely, Tomás, Jaluza, Astor, Bruno, Juan Ignacio, Lara, Maité, Helena, Gonzalo, Melany, Luca, Lucas e Victoria, por trazer luz e paz a este mundo;
- A Gloria Silea, e aos membros das famílias Literas, Lozano, La Regina, Lungarzo-Altube, Viscido, Fabbri, Saralegui, Saavedra, Zitta – De Blasis e Just, por estarem sempre comigo;
- Aos meus colegas do Grupo Cativoiro de Capoeira (CAASO – USP – SP), pelas rodas de capoeira, samba-de-roda, maculelê e tantas horas de divertimento e relax. Axé para vocês!
- A Sue e Ron McNerney que me brindaram apoio, carinho e amizade durante o tempo que passei em Kelowna, BC, Canadá. Thanks guys!
- A Claudio Juan Bidau, por existir.
- A Sergio Daniel Quintana, por su perseverancia, por su inmenso e intangible amor.

Mendieta: - *El pingüino es monógamo, don Inodoro... –*

Inodoro Pereyra: - *¿Y por qué cree que le dicen Pájaro Bobo?*

“Inodoro Pereyra, el renegáu”, Poema telúrico de Roberto Fontanarrosa.

“...C’est à des fins précises qu’une molécule d’hémoglobine change de conformation suivant la tension d’oxygène; qu’une cellule de la surrénale produit de la cortisone; que l’oeil de la grenouille repère des formes bougeant devant lui; que la souris fuit devant le chat; qu’un oiseau mâle se pavane devant sa femelle. Dans tout les cas, il s’agit d’une propriété qui confère à l’organisme une avantage dans la compétition pour la descendance. Ajuster une réponse au milieu, à un ennemi en puissance, à un éventuel partenaire sexuel, c’est très exactement s’adapter. Dans la sélection naturelle, un programme génétique qui impose l’automatisme de telles réactions est assuré de l’emporter sur celui qui ne les possède pas...”

François Jacob, “La logique du vivant” (1970).

“El mundo fue y será una porqueria, ya lo sé
en el 506 y en el 2.000 también
que siempre ha habido chorros, maquiavelos y estafaos,
contentos y amargaos, barones y dublés.
Pero que el Siglo XX es un despliegue de maldad insolente, ya no hay quien lo niegue.
Vivimos revolcaus en un merengue, y en el mismo lodo todos manoseaos.
Hoy resulta que es lo mismo ser derecho que traidor,
Ignorante, sabio o chorro, generoso o estafador...
¡Todo es igual! ¡Nada es mejor! Lo mismo un burro que un gran profesor,
no hay aplasaus, ni escalafón, los inmorales nos han igualao.
Si uno vive en la impostura, y otro roba en su ambición, da lo mismo que sea cura,
colchonero, rey de bastos, caradura o polizón.
¡Qué falta de respeto, que atropello a la razón!
Cualquiera es un señor, cualquiera es un ladrón...
Mezclau con Stravisky, va Don Bosco y La Mignon,
Don Chicho y Napoleón, Carnera y San Martín...
Igual que en la vidriera irrespetuosa de los cambalaches, se ha mezclao la vid,
y herida por un sable sin remache, ves llorar la Biblia junto a un calefón.
Siglo XX cambalache, problemático y febril,
el que no llora no mama y el que no afana es un gil.
¡Dale, nomás...! ¡Dale, que va...! ¡Que allá en el Horno nos vamo’a encontrar..!
No pienses más, sentate a un lao, que a nadie importa si naciste honrao...
Si es lo mismo el que labura, noche y día como un buey,
que el que vive de los otros, que el que mata, que el que cura o está fuera de la ley...”
“Cambalache”, Enrique Santos Discépolo (1935).

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é amor.”

Santo Tomás de Aquino.

RESUMO

Estudos de genética de populações e de parentesco genético foram desenvolvidos em colhereiro (*Platalea ajaja*), cabeça-seca (*Mycteria americana*) e garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*), de colônias reprodutivas do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Genótipos em locos de microssatélites foram utilizados para se investigar os padrões de relacionamento entre ninhegos amostrados dentro dos mesmos ninhos com diferentes metodologias de análise. Pares de ninhegos não-relacionados foram encontrados nos ninhos de colhereiro (6,12% dos pares analisados) e de cabeça-seca (11,34%); meio-irmãos foram observados nos ninhos de colhereiro (1,36%). Em garça branca grande foi detectada apenas a presença de irmãos-completos dentro dos ninhos. Parasitismo de ninho intraespecífico e paternidade extra-par podem explicar a presença de ninhegos não-relacionados e meio-irmãos nos ninhos de colhereiro e cabeça-seca, o que indica a presença de um sistema de acasalamento diferente da monogamia genética nas populações naturais dessas espécies. Relações de parentesco entre adultos e filhotes e entre supostos irmãos foram determinadas em famílias de colhereiro de três zoológicos dos EUA. Análises de atribuição de maternidade e paternidade por máxima verossimilhança revelaram erros nos registros dos zoológicos quanto às relações progenitor-progênie e identificaram acasalamentos entre indivíduos aparentados que não tinham sido registrados. Parâmetros genético-populacionais e processos demográficos foram investigados em populações de garça-branca-grande do Pantanal e do Rio Grande do Sul. Análises Bayesianas, testes de alocação de indivíduos, análises de variância molecular, estimativa de estatísticas F , exame da distribuição das frequências alélicas e cálculo do índice de $G-W$ permitiram identificar que: i) há diferenciação genética significativa entre colônias reprodutivas do Pantanal e do Rio Grande do Sul; ii) o padrão de isolamento pela distância não explica essa diferenciação; e iii) duas populações no Pantanal e uma população no RS apresentaram sinais genéticos de redução demográfica. Os resultados foram discutidos considerando que as populações de garça-branca-grande localizadas no Pantanal e no Rio Grande do Sul são unidades populacionais independentes e devem se tratar separadamente no planejamento e desenvolvimento de programas de manejo para a conservação da diversidade genética total da espécie.

Palavras-Chave: *Ardea alba*; aves aquáticas; cabeça seca; colhereiro; garça; *Mycteria americana*; parasitismo de ninho intraespecífico; paternidade extra-par; *Platalea ajaja*; sistema de acasalamento.

ABSTRACT

Population genetic parameters and genetic relatedness estimates were carried out for Roseate Spoonbill (*Platalea ajaja*), Wood Stork (*Mycteria americana*) and Great Egret (*Ardea alba egretta*) reproductive colonies in Amapa, Pantanal and Rio Grande do Sul (RS), Brazil. Microsatellite genotypes were used to investigate kinship patterns between nestlings sampled inside the same nests, using a variety of analytical approaches. Unrelated nestling-pairs were observed in Roseate Spoonbill nests (6.12% of analyzed nests) and in Wood Stork nests (11.34%); half-siblings were present in Roseate Spoonbill nests as well (1.36%). Only full-siblings were detected inside Great Egret nests. Conspecific brood parasitism (CBP) and extra-pair paternity were proposed to account for the presence of unrelated nestmates and half-siblings, respectively, in Roseate Spoonbill and Wood Stork nests. Those results suggest the occurrence of a mating system different than genetic monogamy in natural populations of those waterbirds. Genetic relatedness was also investigated for adults and offspring, as well as for supposed siblings in Roseate Spoonbill families kept in three zoological facilities in the U.S. Paternity and maternity allocation analyses through maximum-likelihood revealed that errors were present in zoo's studbooks in relation to the familial records. We also identified mating between related individuals that were not detected previously by zookeepers. Population genetic parameters were also estimated and demographic processes were assessed for Great Egret reproductive colonies in the Pantanal and Rio Grande do Sul, Brazil. Bayesian clustering analyses, assignment tests, analysis of molecular variance, *F*-statistics estimates, allelic frequency distribution and the *G*-*W* index revealed that: i) Pantanal reproductive colonies are genetically differentiated from Rio Grande do Sul colonies; ii) an *IBD*-like pattern alone cannot explain that differentiation; and iii) genetic signal of a reduction of population size was present for two colonies in the Pantanal and one in Rio Grande do Sul. Results were discussed considering a metapopulation dynamic and also considering that populations from both Brazilian regions represent distinct units and deserve to be treated separately when planning and carrying out conservation and management programs that aim to preserve the species' genetic diversity.

Keywords: *Ardea alba*; conspecific brood parasitism; extra-pair paternity; genetic mating system; Great Egret; *Mycteria americana*; *Platalea ajaja*; Roseate Spoonbill; waterbirds; Wood Stork.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Indivíduos de colhereiro (<i>Platalea ajaja</i>) dentro de um corpo d'água rasa.....	16
FIGURA 1.2 Fotografia de filhotes de colhereiro no ninho. Note-se a cabeça coberta de penas e o bico com formato tubular.....	16
FIGURA 1.3 Mapa de distribuição geográfica do colhereiro (<i>Platalea ajaja</i>) no continente americano.....	18
FIGURA 1.4 Garça-branca adulta (<i>Ardea alba</i>) durante o período reprodutivo, exibindo plumagem característica (egretas), junto a jovem no ninho.....	19
FIGURA 1.5 Ninhegos de garça-branca-grande (<i>Ardea alba</i>) no ninho.....	21
FIGURA 1.6 Mapa de distribuição geográfica da garça-branca-grande (<i>Ardea alba</i>) no continente americano.....	22
FIGURA 1.7 Cabeça-seca (<i>Mycteria americana</i>) adulto e filhote no ninho.....	23
FIGURA 1.8 Juvenis de cabeça-seca (<i>Mycteria americana</i>) no ninho.	24
FIGURA 1.9 Mapa de distribuição geográfica do cabeça-seca (<i>Mycteria americana</i>) no continente americano.....	26
FIGURA 2.1 Mapa do Brasil com símbolos que indicam a localização aproximada das colônias reprodutivas das três espécies de Ciconiiformes acessadas no presente trabalho.....	33
FIGURA 2.2 Fotografia de um ninhal de garça-branca-grande (<i>Ardea alba egretta</i>) e colhereiros (<i>Platalea ajaja</i>) no RS, Brasil.....	34
FIGURA 2.3 Fotos da colônia reprodutiva “Se Cria”, no Amapá.....	37
FIGURA 2.4 Fotografias que ilustram as condições gerais de coleta de amostras para o presente trabalho.....	39
FIGURA 2.5 Fotos que mostram: a) Ovos; b) Ninhegos no ninho; c) Ninhego sendo medido; e d) Ninho com ovos em uma colônia de <i>Ardea alba egretta</i> do Rio Grande do Sul.....	40
FIGURA 2.6 Gráficos de barras que representam o número de ninhos de <i>Mycteria americana</i> , <i>Ardea alba egretta</i> e <i>Platalea ajaja</i> com um, dois, três ou quatro ninhegos, amostrados durante as expedições de 2007 e 2008 aos estados de: a) Amapá; b) Rio Grande do Sul; e c) ao Pantanal (Brasil).....	41
FIGURA 2.7 Diagrama representativo de relações de parentesco entre indivíduos.....	53
FIGURA 2.8 Coeficientes <i>k</i> de algumas categorias de relacionamento.....	59
FIGURA 2.9 Diagrama de fluxo do procedimento usado para classificar pares de ninhegos em categorias de relacionamento, com base nos genótipos em locos nucleares múltiplos.....	71

FIGURA 3.1 Total de pares de ninhegos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas brasileiras e as percentagens relativas dos pares classificados como irmãos-completos (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (UR).....	92
FIGURA 3.2 Resultado da análise Bayesiana de estruturação genética para a determinação do número de grupos em 142 indivíduos de <i>Ardea alba</i> de colônias reprodutivas do Pantanal e do Rio Grande do Sul, Brasil.....	98
FIGURA 3.3 Probabilidades de atribuição de indivíduos, baseadas em seis locos de microssatélites, para a $K = 2$ e b $K = 3$	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Número de indivíduos e número de ninhos de <i>Platalea ajaja</i> , <i>Mycteria americana</i> e <i>Ardea alba</i> amostrados no Pantanal (MT e MS), Amapá (AP) e Rio Grande do Sul (RS) (Brasil). Apresentam-se a data de coleta, os nomes de cada colônia reprodutiva e as suas coordenadas geográficas.....	42
Tabela 2.2. Relação de amostras de colhereiro (<i>Platalea ajaja</i>), mantidas em cativeiro em zoológicos dos Estados Unidos de América, cujos genótipos usaram-se na análise de parentesco e paternidade no presente trabalho.....	44
Tabela 2.3. Locos de microssatélites que amplificaram com sucesso em <i>Mycteria americana</i> , <i>Platalea ajaja</i> e <i>Ardea alba</i> . Para cada loco apresentam-se o nome do oligonucleotídeo iniciador, as suas sequencias (<i>forward: F</i> e <i>reverse: R</i>), e a temperatura de hibridação (T °C) utilizada no presente trabalho.....	46
Tabela 2.4. Número de indivíduos (<i>N</i>) usados nas estimativas dos parâmetros genéticos das populações de colhereiro (<i>Platalea ajaja</i>), cabeça-seca (<i>Mycteria americana</i>) e garça-branca-grande (<i>Ardea alba</i>) do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, Brasil....	52
Tabela 2.5. Lista dos coeficientes <i>k</i> para algumas categorias de relacionamento.....	54
Tabela 2.6. Ninhegos, pares e ninhos de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande amostrados no Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, Brasil.....	70
Tabela 3.1. Parâmetros de variação genética nas populações de cabeça-seca do Pantanal e do Amapá, baseados em nove locos de microssatélites.....	78
Tabela 3.2. Parâmetros de variação genética em populações de colhereiro do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, baseados em dados de cinco locos de microssatélites...	78
Tabela 3.3. Parâmetros de variação genética baseados em sete locos de microssatélites nas populações da garça-branca-grande (<i>Ardea alba egretta</i>), em cinco colônias reprodutivas do Rio Grande do Sul, Brasil.....	79
Tabela 3.4. Parâmetros de variação genética baseados em sete locos de microssatélites nas populações da garça-branca-grande (<i>Ardea alba egretta</i>), em cinco colônias reprodutivas do Pantanal, Brasil.....	81
Tabela 3.5. Parentesco genético ± erro padrão do índice de Queller e Goodnight (1989) (<i>Q&G</i>) e de Lynch e Ritland (1999) (<i>L&R</i>) para 1.000 pares simulados de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	85
Tabela 3.6. Taxas de erro esperadas para classificação dos pares de indivíduos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande, para os índices de Queller e Goodnight (1989) (<i>Q&G</i>) e Lynch and Ritland (1999) (<i>L&R</i>).....	86
Tabela 3.7. Valores de corte para distinguir entre categorias de relacionamentos, para os índices de Queller e Goodnight (1989) (<i>Q&G</i>) e Lynch e Ritland (1999) (<i>L&R</i>).....	86
Tabela 3.8. Número de pares de colhereiros, cabeça-seca e garça-branca-grande amostrados em colônias reprodutivas do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, Brasil que foram analisados para parentesco genético.....	88
Tabela 3.9. Valores de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight 1989, <i>Q&Gr</i>) ± Erro Padrão (E.P.) observados dentro e entre ninhos em colônias de	

colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Amapá, Pantanal e do Rio Grande do Sul, Brasil, estimados com base em locos de microssatélites.....	90
Tabela 3.10. Resultados da análise de maternidade para 25 ninhegos registrados nos <i>studbooks</i> de três zoológicos nos EUA, com base em locos de microssatélites e máxima verossimilhança.....	95
Tabela 3.11. Resultados da análise de paternidade para 25 ninhegos registrados nos <i>studbooks</i> de três zoológicos nos EUA, com base em locos de microssatélites e máxima verossimilhança.....	96
Tabela 3.12. Parentesco genético, relacionamento mais provável (<i>MLR</i>) e resultado dos testes de hipóteses para pares de ninhegos de colhereiro supostamente aparentados, de acordo com os registros dos zoológicos (#), ou de acordo com a análise genética realizada no presente trabalho (NR), com base em locos de microssatélites.....	97
Tabela 3.13. Valores de F_{ST} par-a-par (acima da diagonal) entre colônias da garça-branca-grande do Pantanal e do Rio Grande do Sul, Brasil.....	101
Tabela 3.14. Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para indivíduos de garça-branca-grande amostrados em cinco colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro.....	102
Tabela 3.15. Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para indivíduos de garça-branca-grande amostrados em cinco colônias reprodutivas do Rio Grande do Sul, Brasil.....	102
Tabela 3.16. Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para indivíduos de garça-branca-grande amostrados em colônias reprodutivas do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	102

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução

1. Relações de parentesco em populações naturais	2
1.1 Interesse pelas relações de parentesco em populações naturais.....	2
1.2 Parentesco genético e sistemas de acasalamento com ênfase nas aves.....	3
1.3 Ferramentas da genética molecular nas estimativas de parentesco genético.....	7
1.4 Genética de populações de Ciconiiformes.....	8
2. Aves aquáticas da ordem Ciconiiformes.....	11
2.1 Sistemática, classificação taxonômica e características gerais.....	11
2.2 Importância dos Ciconiiformes e ameaças à sua conservação, especialmente na Região Neotropical.....	12
2.3 Espécies estudadas no presente trabalho.....	14
2.3.1 O colhereiro, <i>Platalea ajaja</i>	14
2.3.2 A garça-branca-grande, <i>Ardea alba</i>	18
2.3.3 Cabeça-seca, <i>Mycteria americana</i>	22
3. Justificativa.....	26
4. Objetivos.....	30
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31

Capítulo 2. Material e Métodos.....

2.1 Áreas de estudo.....	33
2.1.1 Banhados do Rio Grande do Sul.....	33
2.1.2 O Pantanal brasileiro.....	34
2.1.3 Amapá.....	35
2.2 Procedimentos de coleta de material biológico.....	38
2.3 Material biológico.....	40
2.4 Procedimentos laboratoriais.....	44
2.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	44
2.4.2 Amplificação dos locos de microssatélites.....	45
2.4.3 Identificação dos fenótipos nos locos de microssatélites.....	48
2.4.4 Validação dos iniciadores heterólogos utilizados em <i>Ardea alba</i>	49
2.5 Procedimentos de análise estatística dos dados.....	50

2.5.1 Estimativas dos parâmetros genético-populacionais para subsidiar às posteriores estimativas de parentesco.....	50
2.5.2 Estimativas de parentesco genético.....	51
2.5.3 Distinção entre categorias de relacionamento.....	55
2.5.4 Abordagens metodológicas para inferências de parentesco genético.....	56
2.5.4.1 <i>Estimadores do tipo “métodos-dos-momentos” (methods-of-moments, MM)</i>	56
2.5.4.2 <i>Estimadores de tipo “máxima verossimilhança” (maximum likelihood, ML)</i>	58
2.5.5 Prova de hipóteses.....	60
2.5.6 Análise do desempenho dos estimadores de parentesco genético.....	63
2.5.7 Reconstrução de relacionamentos em ausência de informação parental.....	65
2.5.8 Classificação dos ninhegos em categorias de relacionamento.....	68
2.5.9 Atribuição de paternidade e maternidade em famílias de colhereiro.....	69
2.5.10 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional e detecção de processos demográficos em populações de garça-branca-grande.....	72

Capítulo 3. Resultados

3.1 Parâmetros genéticos populacionais para subsidiar análise de parentesco em cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande.....	76
3.2 Desempenho dos estimadores de parentesco genético.....	77
3.3 Parentesco entre ninhegos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande.....	87
3.4 Comparações intraespecíficas e interespecíficas dos valores de parentesco médio e das distribuições das categorias de relacionamento dos pares de ninhegos.....	88
3.5 Paternidade e parentesco genético em colhereiros de cativoiro.....	92
3.6 Diferenciação genética entre colônias reprodutivas da garça-branca-grande.....	97

Capítulo 4. Discussão

4.1 Validação e avaliação das limitações das metodologias empregadas na determinação do parentesco genético em populações naturais de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande.....	106
4.2 Parentesco entre ninhegos dentro dos ninhos e implicações para os sistemas genéticos de acasalamento do colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande.....	110
4.2.1 Fatores que contribuem para uma maior ocorrência de paternidade extra-par (PEP) e parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) em Ciconiiformes.....	114
4.2.2 Implicações evolutivas da ocorrência de cópula extra-par e parasitismo de ninho intraespecífico em Ciconiiformes.....	117

4.3 Paternidade e maternidade em populações de colhereiros de cativoiro.....	118
4.4 Estruturação genética em populações brasileiras da garça-branca-grande.....	120
Conclusões.....	128
Referências.....	131
Apêndices.....	153
Anexos.....	177

APÊNDICES

APÊNDICE A – Descrição da amostra coletada nas expedições às colônias reprodutivas.....	160
APÊNDICE B – Procedimento de extração de DNA das amostras de sangue e pena canhão.....	163
APÊNDICE C – Descrição da metodologia de marcação fluorescente dinâmica.....	164
APÊNDICE D – Gráficos de distribuição dos valores de parentesco genético (r) par-a-par, estimados pelos índices de Queller e Goodnight (1989) e de Lynch e Ritland (1999).....	166
APÊNDICE E – Pares de ninhegos de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca grande cujos padrões de relacionamento foram avaliados com base no uso de marcadores moleculares e metodologias de máxima verossimilhança, reconstrução de relacionamentos e testes de hipóteses.....	171

Capítulo 1

Introdução

1. Relações de parentesco em populações naturais

“...community of descent is the hidden bond which naturalists have been unconsciously seeking.”
Charles Darwin, 1859.

1.1. Interesse pelas relações de parentesco em populações naturais

O conceito de parentesco genético é central para muitos aspectos da vida, incluindo desde questões mais gerais, como, nos seres humanos, as relativas à herança, ao casamento e às relações familiares, até questões mais específicas, como o cálculo das componentes de dominância e aditividade (na genética aplicada ao melhoramento de animais e plantas), o mapeamento de genes relacionados a doenças (na genética humana, investigando famílias de afetados), entre outras (WEIR et al., 2006). Para explicar a sua teoria de seleção por parentesco, Hamilton (1964) definiu o conceito de “parentesco de regressão” (*regression relatedness*) entre um indivíduo altruísta M e um indivíduo “recebedor” F como a razão entre a probabilidade de que M e F produzam, num dado loco, dois gametas idênticos-por-descendência e a probabilidade de que M produza dois gametas idênticos-por-descendência para o mesmo loco (HAMILTON, 1964). Essa definição foi traduzida posteriormente como a razão da co-ancestralidade (LYNCH E WALSH 1998; MILLIGAN 2003). Por definição, a co-ancestralidade entre M e F é igual ao coeficiente de endogamia de um filho potencial desse par (FO). Se o parentesco for estimado pelo método de Queller e Goodnight (1989), FO será igual à definição de endogamia de Wright (1951).

Questões relativas ao parentesco genético aparecem em quase todas as discussões nas espécies sociais em que alguns comportamentos têm sido preditos como produto da evolução sob sucesso reprodutivo inclusivo e seleção de grupos (AVISE, 2004). O interesse pelo parentesco também aparece em estudos focados em espécies com populações espacialmente estruturadas e linhagens familiares distintas (AVISE, 2004). Estimativas do grau de parentesco genético entre indivíduos são utilizadas em estudos de biologia e da genética das populações naturais quando o objetivo é responder questões relativas ao reconhecimento entre parentes, sistemas de acasalamento, padrões de dispersão de gametas e indivíduos, grau de vagilidade e filopatria, dispersão sexo-diferencial e processos populacionais histórico-demográficos (AVISE, 2004). O

conceito de parentesco genético também pode ser pensado desde um ponto de vista mais aprofundado no tempo, se levamos em conta que todos os indivíduos de uma dada espécie são aparentados uns com os outros através de um “*pedigree* estendido” que constitui a genealogia intraespecífica dessa espécie (AVISE, 2004).

Pelas estimativas de parentesco genético tem se estudado questões teóricas como: a teoria da evolução de grupos (HAMILTON, 1964; QUELLER, 1985), a “fuga da endogamia” (REUSH et al., 2001; RICHARDSON et al., 2004), o isolamento pela distância e a filopatria (MACTOQ E LACEY, 2004), e os padrões de dispersão (DOUBLE et al., 2005; TEMPLE et al., 2006). Estimativas de parentesco genético têm sido utilizadas também para se investigar questões mais específicas da biologia de diversos organismos, como por exemplo: o padrão de dispersão dos ursos polares (*Ursus maritimus*; ZEYL et al., 2009), o grau de influência da caça na estrutura social de grupos de elefantes africanos (*Loxodonta africana*; GOBUSH et al., 2009), o papel das diferenças sociais e ecológicas na formação de “alianças sociais” em golfinhos (*Tursiops truncatus*; PARSONS et al., 2003), o papel da seleção de grupos na determinação das associações cooperativas entre baleias (*Megaptera novaengliae*; POMILLA E ROSEMBAUM, 2006).

Em termos da conservação de espécies e populações genéticas, as estimativas de parentesco genético têm tido uma aplicação prática, auxiliando programas de translocação de populações naturais e de manejo em cativeiro e, dessa forma, contribuindo para a preservação da variabilidade genética desses grupos (LACY, 1994; RUSSELLO E AMATO, 2004; DE WOODY, 2005). Além disso, o parentesco genético tem sido investigado pela sua relação com a escolha de parceiros e a fuga da endogamia (PUSEY E WOLF, 1996; LEHMANN E PERRIN, 2003), com a dinâmica evolutiva populacional (QUADER, 2005), com a especiação (GRIFFITH, 2010) e com questões relativas à maneira em que as populações lidam com a fragmentação do habitat, à sua susceptibilidade às doenças, ao tamanho populacional efetivo, à reprodução em cativeiro (CARO, 1999) e até para definir unidades de manejo (MUs) (ØKLAND et al. 2009).

1.2 Parentesco genético e sistemas de acasalamento com ênfase nas aves

O conceito de sistema de acasalamento foi introduzido por Trivers (1972) e por Emlen e Oring (1977) e faz referência à forma com que os indivíduos das espécies e populações (*demes* genéticos) acessam seus parceiros, o número de parceiros com os quais interagem durante uma estação reprodutiva, a duração dos vínculos reprodutivos e o envolvimento relativo de cada sexo no cuidado da prole (DAVIES, 1991, REYNOLDS, 1996). O sistema de acasalamento é um aspecto essencial da biologia básica dos organismos e determina a maneira com que os genes são transmitidos de uma geração à seguinte e, portanto, influencia diretamente a estrutura genética das populações. A pesquisa na área da biologia do comportamento reprodutivo tem sido intensa durante os últimos 30 anos, o que levou a que alguns dos conceitos originais de Emlen e Oring (1977) fossem modificados e/ou re-definidos (DANCHIN et al., 2008).

Existe uma ligação direta entre o sistema de acasalamento e a seleção sexual (DARWIN, 1871), pois a habilidade de um sexo de monopolizar parceiros do sexo oposto define o sistema de acasalamento, criando assimetrias entre os sexos. O sexo com a menor taxa reprodutiva potencial (essa geralmente delimitada pelo investimento na produção de gametas) constitui-se num recurso limitado para o outro sexo e a desproporcionalidade desse recurso influencia o nível de pressão de seleção sexual. Estas questões se tornam mais complexas se adicionarmos ao sistema o fato de que, em muitas espécies, os machos contribuem com o cuidado da prole, representando um recurso valioso para as fêmeas (DANCHIN et al., 2008). A maneira como os sexos tentam maximizar o seu sucesso reprodutivo e, portanto, o grau de pressão de seleção sexual, influencia o sistema de acasalamento. Assim, a evolução de um determinado sistema de acasalamento é determinada pelo sucesso reprodutivo dos indivíduos de uma determinada população. O sucesso reprodutivo é um parâmetro importante para a conservação das populações (CARO, 1999; 2007). Nos sistemas de acasalamento nos quais somente um número limitado de machos é responsável pela maior parte da progênie, o tamanho populacional efetivo é pequeno (CARO, 1999; 2007). A variabilidade genética dessa população será menor do que naquela população na qual vários machos contribuem para a geração seguinte; esse aspecto deve ser levado em consideração no estabelecimento de parâmetros de manejo e/ou conservação. A inclusão de informação sobre o sistema de acasalamento no desenho e implementação de programas de conservação de uma espécie é, portanto, não somente desejável senão também essencial (KEOG, 2009; MILLER et al., 2009).

Ecologistas comportamentais têm se interessado especialmente pelo estudo dos sistemas de acasalamento em aves, em parte porque nesses organismos tais sistemas apresentam-se muito diversos (LIGON, 1999). Essa diversidade concentra-se em dois eixos principais: no número de parceiros sociais e no número de parceiros sexuais (BIRKHEAD E MØLLER, 1992; PETRIE E KEMPENAEERS, 1998; BENNETT E OWENS, 2002). Com relação ao número de parceiros sociais, a maioria das aves é socialmente monogâmica, ou seja, um indivíduo associa-se somente com outro parceiro durante pelo menos um determinado ciclo reprodutivo (LACK, 1968; GREENWOOD, 1980; GILL, 1990). Algumas espécies, porém, apresentam outras formas de associação, como a poliginia social, a poliandria social e a promiscuidade (DAVIES, 1991). Contudo, quando as técnicas da genética molecular começaram a ser aplicadas ao estudo do comportamento reprodutivo em aves, tornou-se evidente que o número de parceiros sociais nem sempre correspondia no número de parceiros sexuais (WESTNEAT E WEBSTER, 1994; GRIFFITH et al., 2002).

A caracterização das interações reprodutivas é, muitas vezes, difícil de ser feita na natureza, pois a observação direta do comportamento dos indivíduos requer um investimento alto de tempo e recursos materiais e esses não estão sempre disponíveis. Além do mais, em espécies sem dimorfismo sexual ou com dimorfismo secundário pouco perceptível, a distinção dos parceiros de sexos diferentes fica dificultada, o que dificulta ainda mais a caracterização do tipo de interação entre os indivíduos. O padrão genético de acasalamento resultante de um determinado comportamento reprodutivo social não pode, na maioria dos casos, ser inferido a partir da observação da interação entre os indivíduos. Ferramentas de genética molecular, entretanto, quando aplicadas a tais estudos permitem a determinação dos vínculos de parentesco entre os indivíduos nas populações, contribuindo imensamente para a caracterização dos sistemas de acasalamento de vários organismos na natureza. Dentre os diversos exemplos desse tipo de abordagem podemos mencionar o estudo de Túnez et al. (2009) que avaliou, por meio da estimativa do parentesco entre indivíduos, o grau de organização social e o sistema de acasalamento do ratão-do-banhado (*Myocastor coypus*); o trabalho de Sefc et al. (2008) que demonstrou a existência de paternidade múltipla em *Variabilichromis moorii*, um peixe ciclídeo socialmente monogâmico e com defesa biparental do ninho; o estudo de McVay et al., (2008) que evidenciou paternidade múltipla na progênie de populações do crocodilo *Crocodylus moreletii* em

Belize; e o trabalho de Liegbold et al. (2006) que também evidenciou paternidade múltipla na salamandra socialmente monogâmica *Plethodon cinereus*.

Em aves, estudos das relações de parentesco baseados em ferramentas da genética molecular têm auxiliado na investigação e caracterização dos sistemas de acasalamento de várias espécies (AVISE, 1996; WEBSTER E REICHART, 2005). Esses resultados têm demonstrado que as estratégias reprodutivas das aves são bem mais complexas do que se tinha hipotetizado anteriormente com inferências baseadas apenas em observações comportamentais (LIGON, 1999). O fato de se encontrar ampla evidência de que a monogamia social nem sempre está associada à monogamia genética nas populações de aves (LIGON, 1999; WESTNEAT E WEBSTER, 1994; GRIFFITH et al., 2002) causou uma verdadeira “revolução” no entendimento deste aspecto da biologia desses organismos (GRIFFITH et al., 2002). Atualmente, a procura por um melhor entendimento da história evolutiva das aves norteia os debates, as pesquisas e a experimentações nessa área de estudo dos sistemas de acasalamento em aves.

A paternidade extra-par (PEP), ou seja, a produção de uma progênie com mais de um parceiro, incluindo indivíduos diferentes do parceiro social, por exemplo, é comum nas espécies de aves socialmente monogâmicas, como revelado pela revisão sobre variação inter-específica e função adaptativa da PEP feita por Griffith et al. (2002). Nesse trabalho, foi observado que dentre as 150 espécies estudadas com métodos genético-moleculares 130 apresentavam PEP. A revelação da ocorrência de paternidade extra-par (PEP) em frequência alta em muitas espécies de aves, estimulou o avanço de discussões no campo do comportamento reprodutivo durante as últimas décadas (GRIFFITH et al., 2002), levando à proposição de novas hipóteses para se explicar os fenômenos observados. Essa descoberta levou os pesquisadores a levantarem questões sobre o porquê das diferenças nos sistemas sociais e genéticos de acasalamento entre espécies e entre distintas populações de uma mesma espécie (NEUDORF, 2004). Pesquisas nessa área têm sido orientadas para responder por que algumas espécies têm diferentes sistemas de acasalamento sociais e genéticos enquanto outras apresentam correspondência entre esses sistemas (BENNETT E OWENS, 2002). Essas questões e outras de importância para a ecologia evolutiva do comportamento das aves têm estimulado a pesquisa nesta área, resultando no aumento quase exponencial de trabalhos científicos que objetivam caracterizar o sistema genético de acasalamento em aves na última década.

Além da PEP, o parasitismo de ninho intra-específico (PNI) é um comportamento reprodutivo cada vez mais evidenciado em populações de aves (LYON E EADIE, 2008). O PNI ocorre quando há postura de ovos por uma fêmea em ninhos de outras fêmeas da mesma espécie, livrando a fêmea progenitora do cuidado parental posterior o qual será dado pela fêmea “parasitada” (ZINK, 2000). A investigação da ocorrência de PNI em populações naturais e de como esse comportamento influencia na dinâmica populacional tem implicações conservacionistas diretas. Em espécies onde ocorre PNI, esse comportamento deverá ser considerado, pois caso a população manejada encontre poucos recursos para nidificação e/ou alimentação, a taxa de PNI pode aumentar e o tamanho efetivo populacional diminuir, o que, em longo prazo, poderia inviabilizar a sobrevivência da população.

1.3 Ferramentas da genética molecular nas estimativas de parentesco genético

Em populações naturais, quando a informação sobre a genealogia dos indivíduos não está disponível, o cálculo direto do grau de parentesco genético entre os organismos fica impossibilitado. Uma abordagem que pode ser aplicada nesses casos requer o uso de marcadores moleculares para se conhecer os genótipos dos indivíduos envolvidos no vínculo e calcular o grau de parentesco entre eles (BLOUIN, 2003; JONES E ARDREN, 2003). O uso de marcadores moleculares altamente polimórficos, como os microssatélites é uma estratégia amplamente utilizada para se estimar parentesco e para se estudar sistemas genéticos de acasalamento em populações naturais de aves (BLOUIN, 2003; WEBSTER E REICHART, 2005). Na abordagem clássica dos estudos de sistemas genéticos de acasalamento, determinam-se os genótipos dos adultos e da progênie que cuidam, calcula-se o grau de relacionamento entre eles e atribui-se a paternidade e a maternidade aos indivíduos que cuidam da progênie, ou a outros (MARSHALL, 1998).

Os microssatélites, ou STRs (do inglês, *Simple Tandem Repeats*) (TAUTZ, 1989) foram introduzidos nas análises de parentesco por Queller et al. (1993) e são considerados marcadores ideais para esse tipo de estudo (WEBSTER E REICHART, 2005). Esses marcadores são sequências nucleotídicas curtas (uma a seis bases) repetidas, distribuídas ao longo do genoma da maioria dos organismos (TAUTZ, 1989). Se as sequências das regiões adjacentes ao loco do microssatélite são conhecidas,

esses marcadores podem ser amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). A herança dos microssatélites é biparental e co-dominante e essa é uma das principais vantagens do uso desses marcadores nos estudos de parentesco, pois permite a distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos e as comparações diretas dos genótipos entre indivíduos relacionados. Outra característica favorável da utilização desses marcadores nas estimativas do parentesco genético é a taxa alta de mutação desses locos, o que os fazem apresentar uma quantidade considerável de alelos por loco, assim, a chance de dois indivíduos não relacionados compartilharem tais alelos ao acaso diminui, favorecendo a determinação mais acurada do vínculo biológico entre indivíduos (WEBSTER E REICHAERT, 2005). Os microssatélites são considerados marcadores neutros no sentido de que não codificam, na maioria dos locos, nenhum produto que possa estar sob seleção natural. Uma característica prática que permitiu o uso dos microssatélites como marcador numa grande variedade de estudos em populações naturais e especificamente em estudos de parentesco é a probabilidade alta de amplificação heteróloga bem sucedida. Se marcadores não foram ainda desenvolvidos para uma determinada espécie, pode-se utilizar marcadores descritos numa espécie relacionada, com chance alta de que a amplificação ocorra com sucesso.

Existe uma grande variedade de métodos estatísticos e programas computacionais para o cálculo do grau de parentesco entre os indivíduos com base na sua informação genética dos locos de microssatélites (PEMBERTON, 2008). Todos os métodos baseiam-se nas diferentes probabilidades com que dois indivíduos aparentados podem compartilhar alelos por “identidade-por-descendência” (IBD, do inglês, *identity-by-descent*). Essas probabilidades podem ser expressas em termos de frequências alélicas e servem para calcular o grau de relacionamento entre os indivíduos (ver Capítulo 2). Estimativas de parentesco robustas podem ser obtidas com a determinação prévia do grau de estruturação populacional e quando um bom número de locos polimórficos é empregado na análise (BLOUIN, 2003; WAGNER et al., 2006).

1.4 Genética de populações de Ciconiiformes

A diversidade genética é o material que origina e mantém o potencial evolutivo e a adaptação biológica dos organismos. Conhecer qual o nível de diversidade genética das

populações e como essa diversidade está distribuída nas mesmas é importante, pois essas características revelam aspectos das histórias de vida dos organismos. Os fatores que afetam a diferenciação genética entre populações são bem conhecidos na teoria e incluem o fluxo gênico, o tamanho populacional efetivo (N_e), a mutação, a seleção e a deriva genética (WRIGHT, 1978). Na prática, no entanto, a estruturação genética das populações é resultante de um processo complexo cujas causas são muitas vezes difíceis de serem identificadas na natureza (COYNE E ORR, 2004; FRIESEN, et al. 2007). A análise da variabilidade genética utilizando marcadores moleculares como os microssatélites, pode esclarecer padrões de conectividade populacional e processos demográficos, aspectos difíceis de serem determinados com base apenas em informações ecológicas (KOENIG, 1996). O nível de endocruzamento e os padrões de dispersão dos indivíduos nas populações contribuem a determinar o sistema de acasalamento e isto influencia a estrutura genética da população.

Além de ser importante para a investigação de questões teóricas, a determinação do nível e da distribuição da variabilidade genética nas populações também tem implicações práticas. Para a conservação das espécies na natureza é importante, por exemplo, se conhecer qual é o padrão de dispersão da mesma e qual o seu nível de fluxo gênico. Para a conservação *in situ* de uma espécie (ou as suas populações), por exemplo, é ideal conhecer quão filopátrica (fiel ao local de nascimento) é a espécie, quanto de movimento de indivíduos pode-se esperar entre populações e quais as consequências desses movimentos (CRANDALL et al., 2000; FRASER E BERNATCHEZ, 2001). Se o fluxo gênico entre as populações mantém a variabilidade genética da espécie, quando há fluxo, as populações podem responder mais prontamente e melhor, às diversas pressões de seleção (PETIT et al., 1998), garantindo a sobrevivência da espécie a longo prazo.

O parentesco genético entre indivíduos e, mais precisamente, a sua estruturação espacial nas populações, é outro componente da diversidade genética que pode ter importantes consequências para os diversos aspectos da biologia dos organismos, como as táticas reprodutivas, a socialidade, o endocruzamento e a dispersão, entre outros (HAMILTON, 1964; PERRIN E GOUDET, 2001; ROUSSET, 2002). A dispersão pode ser classificada em dois níveis: a que se refere ao movimento de um organismo do seu local de nascimento até o local de sua reprodução (dispersão natal) e a que se refere ao movimento entre um e outro local de reprodução

(dispersão reprodutiva). Esses comportamentos influenciam na dinâmica, estrutura genética e persistência das populações (CLOBERT et al. 2001; GAUFFRE et al., 2009).

As aves possuem um padrão sexo-diferencial de dispersão, sendo as fêmeas da maioria das aves dispersando mais do que os machos (GREENWOOD, 1980). Por exemplo, o sistema de acasalamento das espécies é determinado pela decisão de qual sexo dispersará mais (PERRIN E GOUDET, 2001). Investigações das tendências espaciais do nível de parentesco genético têm sido realizadas para se identificar os padrões de dispersão em populações animais (e.g., LYNCH AND RITLAND, 1999; DOUBLE et al., 2005). Em aves, um exemplo é o estudo de Berg e cols. (2009), no qual os autores usaram estimativas de parentesco genético e ferramentas de máxima verossimilhança para reconstruir grupos sociais e examinar os padrões de dispersão sexo-diferencial numa população de *Calocitta formosa* (Passeriformes). Essa espécie é um das poucas dentre as aves que apresenta filopatria natal das fêmeas. Os autores detectaram que as fêmeas dentro dos grupos estavam mais relacionadas entre si do que os machos e, dentro dos grupos, os casais fêmea-macho seriam não aparentados. Esses resultados estão de acordo com o padrão dispersivo da espécie.

Estudos de diversidade e estrutura genética de populações brasileiras de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande foram realizados pelo grupo do Laboratório de Genética de Aves da Universidade Federal de São Carlos (LGA-UFSCar), utilizando tanto marcadores mitocondriais quanto nucleares (DEL LAMA et al., 2002; ROCHA et al., 2004; LOPES et al., 2004; TOMASULO-SECCOMANDI, 2004; LOPES et al., 2006; MIÑO E DEL LAMA, 2007; LOPES et al., 2007; SANTOS et al., 2008; AVELAR, 2008; SOUZA, 2008; CORRÊA, 2009). Os Ciconiiformes exibem comportamentos que podem favorecer a estruturação genética das populações. A reprodução colonial, somada à filopatria natal, pode gerar agrupamentos geográficos de indivíduos, pois haveria maiores probabilidades dos indivíduos voltarem ao local de nascimento (ou a colônias vizinhas) para se reproduzirem, contribuindo com o aumento da diferenciação genética entre aves aquáticas (FRIESEN, 1997). Conhecer a estrutura genética das populações de Ciconiiformes, portanto, se constitui num importante objetivo direcionado a incrementar o conhecimento sobre aspectos básicos da biologia desses organismos, assim como para subsidiar políticas de conservação dos mesmos. Como os processos demográficos pelos quais essas populações têm passado não têm

sido investigados, a informação genética se torna de grande importância porque permite avaliar tanto a “saúde genética” atual das populações, quanto inferir sobre as possibilidades de sobrevivência futura dessas populações.

2. As aves aquáticas da ordem Ciconiiformes

“The colonial breeding of most ciconiiforms, which concentrates displaying males and subsequent nest sites, leads to many types of interactions among individuals most of which have been little studied”.
Kushlan, 1973.

2.1. Sistemática, classificação taxonômica e características gerais

A ordem dos Ciconiiformes (Bonaparte 1854) abrange aves aquáticas que possuem porte médio a grande, pernas longas, pescoços compridos e bicos longos e é uma das ordens mais tradicionais na sistemática das aves (SIBLEY E AHLQUIST, 1990). Ainda é controverso o *status* monofilético do grupo e alguns autores têm proposto que seja considerado parafilético (SIBLEY E AHLQUIST, 1990). Das famílias incluídas nesta ordem, foram estudados representantes das famílias Ciconiidae Sundevall 1836 (cegonhas), Threskiornithidae Poche 1904 (curicacas e colhereiros) e Ardeidae Leach 1820 (garças e socós) (VAN TUINEN et al., 2001; LIVEZEY E SUZI, 2001). Outras duas famílias monogênicas (Balaenicipitidae e Scopidae) são consideradas tradicionalmente como pertencentes aos Ciconiiformes. De acordo com estudos recentes da filogenia dos Ciconiiformes por meio de caracteres osteológicos cranianos (FERREIRA, 2007), o grupo teria origem polifilética e compreenderia dois subgrupos. O primeiro subgrupo incluiria os Threskiornithidae, Phoenicopteridae e Ciconidae e o segundo abarcaria os Podicipedidae, Scopidae, Balaenicipitidae, Pelecanidae, Procellariiformes, os demais Pelecaniformes e Ardeidae. Phoenicopteridae e Threskiornithidae seriam grupos-irmãos, e Scopidae e Balaenicipitidae estariam fortemente relacionados com Pelecanidae (FERREIRA, 2007). A posição da família Ardeidae dentro da ordem ainda é incerta (FERREIRA, 2007).

Os Ciconiiformes apresentam distribuição mundial e habitam preferencialmente as zonas costeiras e as regiões intracontinentais, como lagos, lagoas e rios. O Brasil se constitui em um dos principais locais de ocorrência de aves dessa ordem, com 35 espécies documentadas no país, dentre as 120 reconhecidas no mundo todo (DE LUCA et al., 2006). As espécies de interesse no presente estudo *Platalea*

ajaja, *Mycteria americana* e *Ardea alba* pertencem às famílias Threskiornithidae, Ciconiidae e Ardeidae, respectivamente. A família Threskiornithidae inclui 13 gêneros e 32 espécies (MATHEU E DEL HOYO, 1992), divididas em duas subfamílias: Threskiornithinae e Plataleinae (DEL HOYO et al., 1992). À família Threskiornithidae pertencem, entre outros, o curicaca (*Theristicus caudatus*), o coró-coró (*Mesembrinibis cayennensis*), o guará-vermelho (*Eudocimus ruber*) e o colhereiro (*Platalea ajaja*). As aves da família Ciconiidae estão divididas em três subfamílias: Mycterini, Ciconini e Leptoptilini (DEL HOYO et al., 1992). No Brasil, a família está representada pelo tuiuiú (*Jabiru mycteria*), o maguari (ou João-Grande, *Ciconia maguari*) e o cabeça-seca (*Mycteria americana*). As aves da família Ardeidae caracterizam-se por possuir o pescoço com forma de “S”, que pode ser contraído sobre o corpo durante o vôo (DEL HOYO et al., 1992). Essa família compreende 62 espécies divididas em cinco subfamílias: Ardeinae, Botaurinae, Tigrisomatinae, Agamiinae e Cochleariinae (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). No Brasil, essa família está representada por 25 espécies, incluindo desde as garças grandes até os pequenos socós (DEL HOYO et al., 1992).

2.2 Importância dos Ciconiiformes e ameaças à sua conservação, especialmente na Região Neotropical

A Região Neotropical possui uma área de 20 milhões de km² que inclui o México, a América Central, a América do Sul e o Caribe (CEBALLOS et al., 2009). As planícies alagadiças da região centro-sul da América do Sul (1.000.000 km²; NEIFF, 2001) são das mais importantes no mundo para as aves aquáticas (JUNK, 2006; HARRIS et al., 2005). Essas planícies oferecem uma grande variedade de habitats e uma alta produtividade em termos de recursos alimentares (HARRIS et al., 2005). Esses ecossistemas exercem, portanto, importante função na preservação da biodiversidade de aves. Na Região Neotropical foram registradas 461 espécies de aves aquáticas, das quais 400 são residentes, registrando-se 417 espécies na América do Sul, 214 na América Central e 172 no Caribe (WATERBIRD CONSERVATION FOR THE AMERICAS, 2007). A percentagem de aves aquáticas que está ameaçada de extinção na Região Neotropical (14,3%) é maior do que o total das espécies de aves ameaçadas do mundo (12%). Além disso, 31 espécies (6,7%) estão classificadas como quase-ameaçadas

(WATERBIRD CONSERVATION FOR THE AMERICAS, 2007). Os Ciconiiformes ocorrem em grande número nas planícies alagadiças e estão bem adaptados às flutuações dos níveis hidrológicos, causados pelos típicos regimes de cheia-seca (KUSHLAN et al., 1985; GONZÁLEZ, 1997).

As áreas alagadiças da Região Neotropical têm sido objeto de crescente número de pesquisas por parte de instituições governamentais e não governamentais durante os últimos 15 anos, mas ainda não receberam toda a atenção que merecem (GOTTGENS E FORTNEY, 2004). É importante incrementar os esforços de pesquisa para favorecer o melhor conhecimento de questões como ecologia, comportamento e interação entre as espécies que habitam a Região Neotropical (JUNK, 1996). Apesar da evidente importância das planícies alagadiças para a manutenção da biodiversidade e dos processos ecológicos a ela associados, sua destruição e/ou alteração vem crescendo rapidamente (BOUTON E FREDERICK, 2003). No Brasil, as planícies alagadiças vêm sendo objeto de rápida degradação ambiental causada, principalmente, pela modificação e redução dos habitats pelo uso destas áreas para criação de gado, entre outras atividades altamente impactantes. A necessidade urgente de preservação destes ambientes e das espécies que neles vivem tem sido enfatizada por diversos autores (GUADAGNIN et al., 2005; GIMENES E ANJOS, 2006; GUADAGNIN E MALTCHIK, 2007; ALHO et al., 2008). A vegetação nativa do Pantanal brasileiro, por exemplo, está sendo perdida a uma taxa 2,3% ao ano para dar lugar a pastos (GOTTGENS E FORTNEY, 2004). A cobertura ainda preservada das áreas mais altas do Pantanal é extremamente importante já que atua como refúgio para diversas espécies durante as inundações. Foi predito que, se mantido o ritmo atual de supressão da cobertura de mata no Pantanal, a mesma se perderá completamente em 45 anos (HARRIS et al., 2006).

As aves aquáticas coloniais, de uma maneira geral, têm sido utilizadas como indicadores ecológicos do estado dos ecossistemas nos quais habitam (KUSHLAN, 1993; GONZÁLEZ, 1997; PAILLISSON et al., 2002). Várias características desses organismos, como a escolha do local de nidificação, o número de ninhos por colônia, o sucesso reprodutivo e o sucesso na predação, entre outras, são importantes para se avaliar o estado de conservação dos habitats nos quais se reproduzem e forrageiam (KUSHLAN, 1993; GIMENES E ANJOS, 2006; LORENZ et al., 2008; FREDERICK et al., 2008). As aves aquáticas coloniais são sensíveis às

alterações nos regimes hidrológicos normais, causadas pelos impactos antropogênicos (KUSHLAN, 1993; GONZÁLEZ, 1997; PAILLISSON et al., 2002). Os Ciconiiformes, por exemplo, dependem de manchas de habitat com adequada profundidade e alta densidade de presas para forragearem (KUSHLAN, 1976; GIMENES E ANJOS 2006). Esses fenômenos são bastante temporários e distribuídos desigualmente nas planícies alagáveis (FASOLA, 1994). Além disso, grande parte dos Ciconiiformes alimenta-se principalmente de peixes (DEL HOYO et al., 1992), cuja abundância se vê grandemente influenciada pelos níveis hidrométricos (GIMENES E ANJOS, 2006). O sucesso na nidificação e na posterior reprodução, pode ser influenciado pelas condições da água nas planícies alagáveis nas quais os Ciconiiformes habitam e afeta drasticamente a dinâmica das suas populações. Existe uma relação direta entre o número de tentativas de reprodução e o nível de precipitação pluvial na área de nidificação anterior à época de reprodução (KAHL, 1964; KUSHLAN et al., 1975; KUSHLAN, 1979; OGDEN et al., 1980; FREDERICK E COLLOPY, 1989). O estudo de aspectos básicos da biologia dos Ciconiiformes pode auxiliar na conservação dos ecossistemas a eles associados, como as planícies alagadiças intracontinentais e costeiras.

Os Ciconiiformes têm sofrido muitas pressões antrópicas, como a ocupação e a modificação dos habitats utilizados pelas aves. As garças, por exemplo, foram caçadas esportivamente na Europa por muito tempo, usadas na alimentação na China, Madagascar, Índia e Europa. Suas penas eram usadas para decoração de chapéus (America do Norte e Europa) e com propósitos medicinais (Índia) (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Algumas espécies e populações da família Ardeidae encontram-se atualmente ameaçadas em nível mundial e local (INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE, 2008).

2.3 Espécies estudadas no presente trabalho

2.3.1 Colhereiro, *Platalea ajaja*

O colhereiro, *Platalea ajaja* Linnaeus 1758 (Ciconiiformes: Treskiornithidae) (Fig. 1.1) é a única espécie das seis do gênero *Platalea* que ocorre no continente americano. Essa ave se distribui desde o sul dos Estados Unidos da América (EUA) até o centro da Argentina e suas colônias se estabelecem em áreas alagáveis intracontinentais e

costeiras (DUMAS, 2000). Os colhereiros se reproduzem numa variedade de ambientes aquáticos ao longo da sua distribuição como manguezais, estuários, pântanos, lagos e lagoas, entre outros (DUMAS, 2000). Nidificam em colônias, construindo ninhos em árvores, arbustos ou sobre juncos, dependendo das características da área escolhida. Os colhereiros podem se agrupar em colônias reprodutivas grandes, juntamente com outras espécies, como o cabeça-seca (*Mycteria americana*) e a garça-branca-grande (*Ardea alba*) (YAMASHITA E VALLE, 1990; DUMAS, 2000); ou nidificar em colônias menores, específicas da espécie.

O colhereiro é uma ave pernalta de porte médio, de até 80 cm de altura, 1,8 kg de peso e envergadura de até 133 cm (HANCOCK et al., 1992; BJORK E POWELL, 1994). O bico tem, em média, entre 15 e 18 cm de comprimento, nos adultos (BJORK E POWELL, 1994). O bico dos jovens é tubular no início do desenvolvimento e adquire a forma típica, parecida a uma colher, com o avanço do crescimento. Os filhotes (Fig. 1.2) nascem brancos, com aproximadamente 50g e ganham peso rapidamente (WHITE et al., 1982). Possuem plumagem rosa claro, as pontas das coberteiras e as penas primárias escuras e a cabeça coberta de penas (Fig. 1.2). Após o 14º dia de idade, os jovens são capazes de andar e podem explorar os arredores do ninho (BJORK E POWELL, 1994). Com aproximadamente seis semanas de vida os filhotes são capazes de voar (WHITE et al., 1982), mas permanecem nas proximidades da colônia até aproximadamente os dois meses de idade, podendo ser alimentados esporadicamente pelos pais durante esse período (BJORK E POWELL, 1994). Depois da primeira muda os jovens adquirem coloração rósea mais intensa no corpo e nas asas, a cabeça perde as penas e a coloração rosada da plumagem do corpo intensifica-se, tornando-os mais semelhante aos adultos (veja indivíduo à esquerda, na Fig. 1.1). Aos três anos de idade, aproximadamente, os filhotes adquirem a plumagem característica de adultos, depois de terem passado por quatro mudas (ALLEN, 1942; DUMAS, 2000). Os adultos passam por duas mudas ao ano, uma parcial antes do ciclo reprodutivo e outra completa depois do ciclo reprodutivo. Os adultos reprodutivos apresentam a cabeça sem penas e com coloração esverdeada, pele negra ao redor dos olhos e da nuca, o saco gular com coloração alaranjada brilhante, olhos vermelhos e plumagem das asas de coloração rosa carmesim intensa (veja indivíduo à direita, na Fig. 1.1). Os colhereiros não apresentam dimorfismo sexual secundário, mas os machos são levemente maiores do que as fêmeas (DUMAS, 2000).



Figura 1.1. Indivíduos de colhereiro (*Platalea ajaja*) dentro de um corpo d'água rasa. Note-se o indivíduo à esquerda, um jovem, que possui a plumagem pré-reprodutiva (cor rosada mais clara). O indivíduo à direita é um adulto reprodutivo (possui uma “faixa” rosa escuro nas asas, pernas de um rosado mais escuro, lores amarelada, bico mais escuro e cor amarelada nas penas da porção escapular da asa).



Figura 1.2. Fotografia de filhotes de colhereiro no ninho. Note-se a cabeça coberta de penas e o bico com formato tubular. (Fonte: acervo do Laboratório Genética de Aves – DGE/UFSCar).

O período de atividade das colônias reprodutivas de colhereiro varia de uma região para outra, mas é de aproximadamente cinco meses por ano. Os adultos reúnem-se nas proximidades das colônias 1-2 meses antes de se acasalarem (ALLEN, 1942; WHITE et al., 1982). Os pares geralmente constroem seus ninhos durante o inverno (estação seca) no Pantanal (julho/agosto) e na primavera no Rio Grande do Sul (outubro/novembro). Os acasalamentos ocorrem em sincronia com o período de seca na

região onde as colônias reprodutivas se estabeleceram, possibilitando que o nascimento dos filhotes ocorra quando a disponibilidade alimentar é maior nessas regiões. Allen (1942), a partir da observação comportamental de um único casal, descreveu que o ninho é construído principalmente pela fêmea, usando material recolhido pelo macho. Concluída a construção do ninho, a fêmea copula diversas vezes com o macho e deposita de 2 a 3 ovos. O período de incubação dos ovos é, em média, de 22 dias (WHITE et al., 1982) e se inicia logo após a postura do primeiro ovo. Ambos os sexos se encarregam da incubação dos ovos (ALLEN, 1942). A espécie pode ser considerada semi-altricial, pois os filhotes requerem cuidado parental, mas informações detalhadas sobre essa questão são inexistentes (DUMAS, 2000). O colhereiro foi descrito como socialmente monogâmico na natureza, a partir de observações comportamentais de um único casal (DUMAS, 2000; SIBLEY, 2001). Porém, observações comportamentais de 25 famílias de colhereiros criados em cativeiro evidenciaram ocorrência de cópulas extra-par e o cuidado de ovos alheios por parte de casais dessa espécie (SAWYER, 2002), se bem que não foi esclarecido ainda se isso é, ou não, resultado do confinamento.

Na América do Sul, colônias de colhereiros foram documentadas ao longo da costa Atlântica da Colômbia e da Venezuela (HILTY E BROWN, 1986; MEYER DE SCHAUENSEE E PHELPS, 1978), no Suriname (HAVERSCHMIDT E MEES, 1994), ao leste dos Andes e próximo ao centro da Argentina (NAROSKY E YZURIETA, 2003) (Fig. 1.3). Ocorrência de colhereiros foi reportada no leste do Uruguai (NAROSKY E YZURIETA, 2003) e no Chile (ARAYA E CHESTER, 1993). No Brasil, o número total de colônias reprodutivas de colhereiro e o número exato de indivíduos por colônia, são ainda desconhecidos. Colônias reprodutivas da espécie são encontradas na região do Pantanal (Mato-Grosso e Mato Grosso do Sul; MORRISON et al., 2008) e no Rio Grande do Sul (YAMASHITA E VALLE 1990; SILVA E BELLO FALLAVENA, 1995; GUADAGNIN et al., 2005; GIANUCA et al., 2009). Colônias reprodutivas da espécie são também encontradas na região costeira do norte do Brasil, a Ilha do Cajual e no Delta do Rio Paranaíba, no Estado do Maranhão e no litoral do Estado do Amapá (OREN 1991; DE LUCA et al., 2006). A dispersão pós-reprodutiva dessas populações ocorre ao longo da sua área de distribuição e se relaciona aos ciclos de seca e inundação que determinam a variação na disponibilidade alimentar das áreas ocupadas (DUMAS, 2000). Colhereiros adultos migram depois do ciclo reprodutivo

para regiões diferentes dentro do Brasil, onde permanecem até o ciclo seguinte, mas dados detalhados sobre os movimentos de dispersão da espécie inexistem. Um único registro publicado por Silva e Bello Falavena (1995) reportou um indivíduo que havia sido anilhado, enquanto ninhego, no Estado do Rio Grande do Sul e foi recuperado no Estado do Espírito Santo (aprox. 1147 km do local de anilhamento).



Figura 1.3. Mapa de distribuição geográfica do colhereiro (*Platalea ajaja*) no continente americano (fonte: <http://www.natureserve.org/infonatura>).

2.3.2 Garça-branca-grande, *Ardea alba*

A garça-branca-grande, *Ardea alba* Linnaeus 1758 (Ciconiiformes: Ardeidae) (Fig. 1.4) é uma das 22 espécies do gênero *Ardea*. A classificação da espécie no gênero *Ardea* vem sendo longamente debatida (KUSHLAN E HANCOCK, 2005), mas evidências morfológicas, bioquímicas, moleculares e de comportamento apóiam a classificação da espécie nesse gênero (SHELDON E SLIKAS, 1997; CHANG et al., 2003). Ao longo da ampla área de distribuição mundial da espécie, são reconhecidas três subespécies com distribuição geográfica distinta: *Ardea alba alba* Linnaeus 1758 (Europa ocidental), *Ardea alba egretta* Gmelin 1789 (Américas) e *Ardea alba melanorhyncho* Wegler 1827

(África) (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). No Brasil, a espécie se denomina *Ardea alba* Linnaeus 1758 desde a Resolução nº 118 do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (10/10/2003).

A garça-branca-grande é grande e delgada, possui o corpo todo branco, pescoço longo, pernas pretas e longas penas dorsais durante o período de reprodução (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). O bico é amarelo com ponta preta, a íris e a pele ao redor dos olhos (lores) são amareladas e a cabeça está desprovida de penas (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Os adultos podem medir até 102 cm de altura, com envergadura de asas de até 140 cm, e peso até 1,7 kg (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Não existe dimorfismo sexual aparente mas as fêmeas podem ser levemente maiores do que os machos (SICK, 1997). Adultos e jovens possuem padrão de plumagem distinto e este se modifica nos primeiros durante o período reprodutivo quando surgem as “egretas”, penas de adorno situadas no dorso do corpo (ver indivíduo à esquerda na Fig. 1.4). Durante o período reprodutivo a íris passa a ser vermelha, o bico laranja e a lores esverdeada (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Os filhotes possuem penugem na cabeça, o bico amarelado-cinza, a face desprovida de penas, azul pálida a cinza, a garganta e as pernas rosadas (KUSHLAN E HANCOCK, 2005).



Figura 1.4. Garça-branca adulta (*Ardea alba*) durante o período reprodutivo, exibindo plumagem característica (egretas), junto a jovem no ninho.

A garça-branca-grande habita uma grande variedade de ecossistemas, como pântanos, margens de rios, lagoas e outras áreas alagadiças (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Também é encontrada em habitats marinhos, como pântanos

salubres, manguezais, lagoas costeiras e recifes de corais (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Pode utilizar ambientes alterados pelo homem, como terras de cultura, pastagem e lagoas de criação de peixes, incluindo áreas de beberagem de gado. Estas aves constroem os ninhos numa grande variedade de espécies vegetais, em árvores, bambuzais e arbustos (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Nidificam em colônias monoespecíficas ou mistas, que podem ser compostas por várias espécies de garças (*Ardea alba* e *Egretta thula*), ou por garças e espécies de outras famílias, como o colhereiro (*Platalea ajaja*), o cabeça-seca (*Mycteria americana*), entre outras (SICK, 1997). O período de procriação coincide com o começo da estação seca (SICK, 1997). As colônias podem ter mais de 1.000 ninhos e permanecem ativas por cerca de três a quatro meses por ano (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Os ninhos podem ser construídos até 1m um do outro, ou mais distantes e podem ter até 120 cm de diâmetro (MCCRIMMON et al., 2001). Os machos de *Ardea alba* chegam às colônias primeiro do que as fêmeas e escolhem o local de nidificação. Essa escolha é liderada pelos machos mais velhos, os quais geralmente nidificam no centro das colônias (PRATT, 1993). Uma vez escolhido o local de nidificação e depois da chegada das fêmeas à colônia, os machos começam o comportamento de corte para atrair às potenciais parceiras reprodutivas. As fêmeas interessadas num determinado macho executam um comportamento de “limpeza de asas” enquanto o observam. Às vezes, a fêmea faz um “vôo circular”. As fêmeas podem afastar outras fêmeas atacando-as (PRATT, 1993). Uma vez estabelecidos os casais, esses participam de várias cerimônias de cortejo durante a reprodução (KUSHLAN E HANCOCK, 2005).

A garça-branca-grande provavelmente começa a se acasalar no seu segundo ano de vida (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). As fêmeas colocam de dois a três ovos azuis-claros por ninho e ambos os pais os incubam, revezando-se a cada 24h. O período de incubação é de 23 a 27 dias (PALMER, 1962). Os dois membros do casal cuidam ativamente dos jovens durante a primeira semana de vida. Durante as semanas seguintes, os pais começam a se revezar no cuidado dos ninhegos e mostram um comportamento agressivo na presença de possíveis ameaças (MCCRIMMON et al., 2001). Entre os 21 e 30 dias de idade, os filhotes (Fig. 1.5) começam a sair do ninho, mas não o abandonam; a partir dos 34 dias saem por tempo considerável e entre os 45 e os 60 dias deixam a colônia. A espécie foi descrita como socialmente monogâmica durante cada ciclo reprodutivo (MOCK, 1978). Cópulas extra-par, forçadas e/ou

homossexuais, já foram reportadas nessa espécie por vários autores de maneira independente (WIESE, 1976; GLADSTONE, 1979; KREBS et al., 2004). Portanto, o sistema genético de reprodução da garça-branca-grande ainda permanece por ser estudado e esclarecido.



Figura 1.5. Ninhegos de garça-branca-grande (*Ardea alba*) no ninho.

Ardea alba reproduz-se nas Bahamas, Antilhas, América Central, América do Sul (até o sul do Chile e Argentina) e nas Ilhas Galápagos (COCONIER, 2006) (Fig. 1.6). Na América do Sul, as populações estão em crescimento e são residentes, estimadas entre 246.000 e 915.000 indivíduos (MORALES, 2000). Existem também populações reprodutivas na América do Norte (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Fora do período reprodutivo, as populações da América do Norte migram mais ao norte, enquanto que, as da América do Sul migram mais para o sul do continente (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). Algumas populações também dispersam para ilhas oceânicas vizinhas ao continente. As populações do oeste dos EUA migram para o México e América Central (KUSHLAN E HANCOCK, 2005). No Brasil, colônias reprodutivas foram localizadas em diversas regiões do norte, centro-oeste, sudeste e sul do país (YAMASHITA E VALLE, 1990; AMERICAN ORNITHOLOGISTS' UNION, 1998; DE LUCA et al., 2006). As populações do Pantanal foram estimadas em 12.715 indivíduos (MORRISON et al., 2008). Estimativas do número de indivíduos nas populações do Estado do Rio Grande do Sul não estão disponíveis.

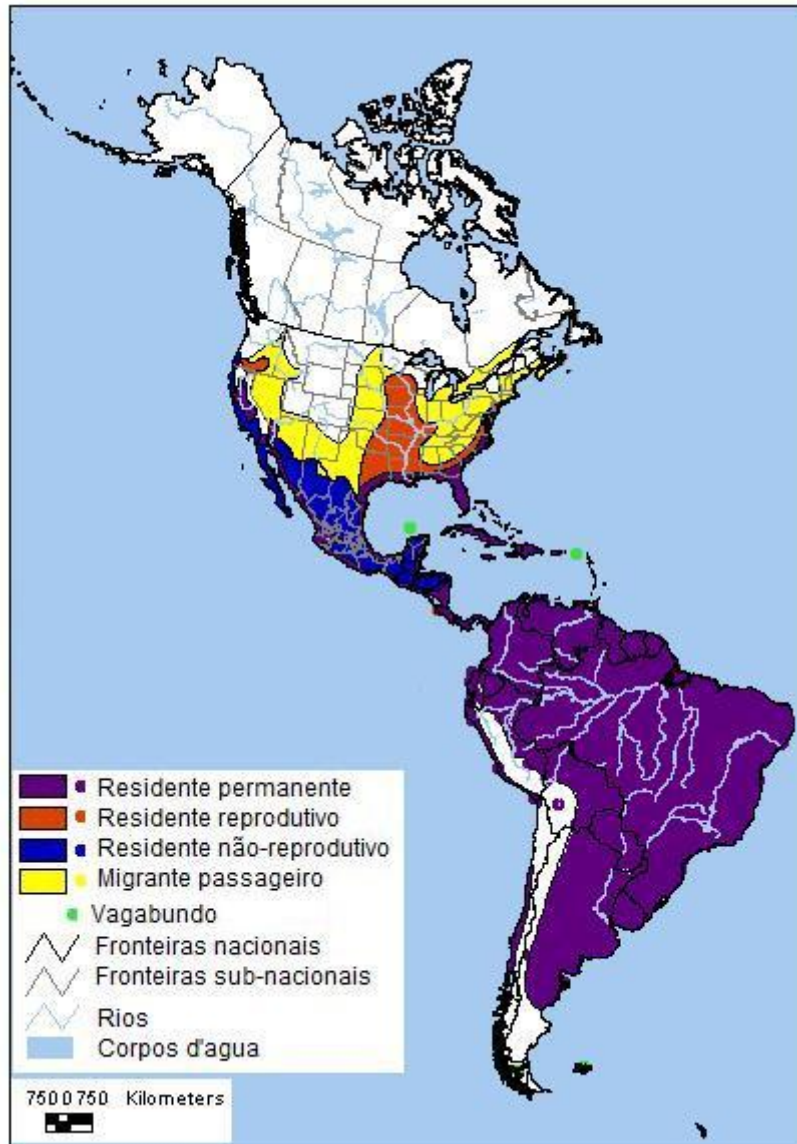


Figura 1.6. Mapa de distribuição geográfica da garça-branca-grande (*Ardea alba*) no continente americano (fonte: <http://www.natureserve.org/infonatura>).

2.3.3 Cabeça-seca, *Mycteria americana*

O cabeça-seca ou jaburu, *Mycteria americana* Linnaeus 1758 (Fig. 1.7) é uma das espécies que formam a família monofilética Ciconiidae (Ciconiiformes) (HANCOCK, 1992). No mundo, podemos encontrar quatro espécies do gênero *Mycteria*: *M. americana*, *M. leucocephala*, *M. cinerea* e *M. ibis*. O cabeça-seca é a única espécie do gênero *Mycteria* que ocorre no continente americano, nidifica associado a ambientes intra-continentais de água doce e a ambientes costeiros marinhos e estuarinos (RODGERS et al., 1996). Forrageia em áreas úmidas naturais e/ou artificiais e se

alimenta principalmente de peixes, capturados numa profundidade da água de até 23 cm (COULTER E BRYAN, 1993).



Figura 1.7. Cabeça-seca (*Mycteria americana*) adulto e filhote no ninho.

Os adultos de cabeça-seca apresentam plumagem branca, com exceção das penas retrizes e rêmigas, que são negras, com reflexos verdes e roxos. Podem medir até 115 cm de comprimento (do bico à cauda) e pesar entre 2.0 e 3.0kg (COULTER et al., 1999). O cabeça-seca apresenta a cabeça e o pescoço sem penas e de coloração cinza escuro, bico negro, comprido e largo na base, pernas e os pés escuros e dedos rosados durante a estação reprodutiva. Os filhotes nascem nus e possuem bicos encurvados, de cor amarela ou rosados, que são mantidos frequentemente abaixados (Fig. 1.8). Na terceira semana de vida os filhotes já estão empenados (SICK, 1997). O cabeça-seca atinge a maturidade sexual entre o terceiro e o quarto ano de vida. A longevidade da espécie na natureza é de aproximadamente 11 anos (COULTER et al., 1999). Em cativeiro, foram reportados indivíduos longevos (27 e 30 anos de idade) (HANCOCK et al., 1992).



Figura 1.8. Juvenis de cabeça-seca (*Mycteria americana*) no ninho. Note-se a diferença de tamanho entre eles (Fonte: LGA-DGE/UFSCar).

O período reprodutivo de *Mycteria americana* coincide com a estação seca, quando há maior disponibilidade alimentar, em consequência da concentração de animais aquáticos em lagoas, rios e poças. Nos EUA dura cerca de quatro meses por ano (COULTER et al., 1999), ao passo que no Pantanal e na região norte do Brasil os ciclos reprodutivos ocorrem entre junho e novembro (SICK, 1997). Variação tanto nas datas de formação das colônias quanto nos locais de nidificação podem acontecer em resposta à disponibilidade alimentar (OGDEN, 1980). A espécie nidifica em colônias, que podem ser monoespecíficas ou mistas, junto a outras espécies de Ciconiiformes como *Platalea ajaja* e *Ardea alba* (SICK, 1997), e também com o guará-vermelho (*Eudocimus ruber*) no norte do Brasil. Os machos de *Mycteria americana* estabelecem o território para o ninho e iniciam a interação com as fêmeas que entram nesses territórios. O macho é inicialmente hostil com as fêmeas, mas essa hostilidade diminui à medida que avança o período reprodutivo. Uma vez que a fêmea é aceita dentro do território, se inicia o comportamento de cortejo, que pode durar desde horas até alguns dias (KAHL, 1972). *Mycteria americana* foi descrita como socialmente monogâmica, permanecendo os parceiros juntos por toda a estação reprodutiva. Porém, essas observações foram limitadas (COULTER et al., 1999). Os indivíduos constroem seus ninhos em diversas espécies de plantas, dependendo do habitat no qual se estabeleça a colônia. Os ninhos podem medir até 1,5 m de diâmetro e até 23 cm de profundidade (COULTER et al., 1999). As distâncias de um ninho para o outro são variáveis dependendo das características do local de nidificação. As colônias podem ser densas, com ninhos distantes até 60 cm entre si (COULTER et al., 1999). Uma vez finalizada a construção dos ninhos, as fêmeas colocam os ovos, com um intervalo de até dois dias entre cada um (HANCOCK et al., 1992). O tamanho médio da ninhada nessa espécie é

de três ovos, mas ninhadas de até cinco ovos são comuns em algumas colônias (COULTER et al., 1999). Ambos os pais se revezam no cuidado dos ovos, que são incubados entre 27 e 32 dias, e dos filhotes (COULTER et al., 1999). O atendimento do ninho por parte dos pais diminui ao longo da incubação até que, no momento da eclosão, somente o progenitor que incuba está presente no ninho. É interessante notar que já foram observados ninhos com ovos adicionais, até uma semana depois da primeira ninhada de três ovos, sendo interpretado como evidência de parasitismo de ninho co-específico (COULTER et al., 1999). O nascimento dos filhotes coincide com o período de maior disponibilidade alimentar e, os pais se alternam na busca de alimento para eles. Os filhotes são classificados como altriciais (nascem sendo muito dependentes dos adultos). O macho e a fêmea dividem igualmente o cuidado parenta e os filhotes são atendidos constantemente durante a primeira semana de vida, mas após esse tempo, somente à noite; a partir do vigésimo dia de vida dos filhotes decai dramaticamente o tempo que os pais passam no ninho. Os adultos alimentam aos filhotes mais jovens mais vezes do que os mais velhos (BRYAN et al., 1995). A partir da quarta semana de vida já podem deslocar-se fora do ninho até galhos próximos, mas só abandonam os ninhos aos 50-55 dias de vida (KAHL, 1964; COULTER et al., 1999), podendo retornar aos ninhos esporadicamente para serem alimentados pelos pais. O tempo que os filhotes permanecem relacionados com o ninho pode variar desde os 30 dias (KAHL, 1964) até os 80 dias de vida (HYLTON, 2006).

O cabeça-seca habita áreas periodicamente alagáveis na América tropical e subtropical (Fig. 1.9), desde o sul dos EUA (COULTER et al., 1999; FREDERICK E MEYER, 2008) e México (HOWELL E WEBB, 1995), pela América Central (Costa Rica e Panamá) (STILES E SKUTCH, 1989), no Caribe (Cuba e República Dominicana, STOCKTON DE DOD, 1981), e na América do Sul desde Colômbia até o Perú, norte da Bolívia, Paraguai, Uruguai até noroeste da Argentina (COCONIER et al., 2006), e desde as Guianas e a Venezuela até o Brasil (AMERICAN ORNITHOLOGISTS' UNION, 1998). Após o período reprodutivo, os indivíduos de cabeça-seca migram para outras regiões, num período denominado invernada. As populações dos EUA permanecem na Flórida e no sul da Geórgia. As populações de Cuba são provavelmente residentes e não migram. Alguns indivíduos de cabeça-seca provenientes do México e da América Central foram observados no Vale do Rio Mississippi, nos EUA (BRYAN et al., 2008).

As rotas migratórias dos indivíduos que se reproduzem na América do Sul ainda não estão devidamente esclarecidas, mas, provavelmente, a direção e o destino dessas migrações estão relacionados com a disponibilidade de alimento e com as condições ambientais (COULTER et al., 1999). Dados recentes de indivíduos anilhados no Brasil pela equipe do LGA – UFSCar sugerem que esses indivíduos dispersam bastante numa idade jovem. Por exemplo, um indivíduo anilhado em outubro de 2007 no Estado do Amapá foi recuperado na província de Santa Fe, no centro da Argentina, em fevereiro de 2008 (S. N. Del Lama, com. pessoal). Outro indivíduo anilhado no sul do Pantanal foi recuperado ao norte da mesma região (S. N. Del Lama, com. pessoal).



Figura 1.9. Mapa de distribuição geográfica do cabeça-seca (*Mycteria americana*) no continente americano (fonte: <http://www.natureserve.org/infonatura>).

3. Justificativa

A falta de correspondência entre a monogamia social e a monogamia genética detectada na maioria das espécies de aves comprova que inferências sobre o sistema genético de acasalamento de aves não podem ser feitas com base somente no sistema social de acasalamento. Embora numerosos estudos tenham sido conduzidos para se investigar sistemas genéticos de acasalamento em aves, a maioria foi realizada em espécies de Passeriformes que ocorrem em regiões temperadas. Os poucos trabalhos ecológicos (GILL et al., 2007; STUTCHBURY et al., 2007) e genéticos (CAPARROZ, 2003; CARVALHO et al., 2006) disponíveis em aves Neotropicais demonstram que os seus sistemas de acasalamento são também complexos e variáveis. Existe, portanto, uma lacuna importante a ser preenchida quanto aos estudos de comportamento reprodutivo em aves da Região Neotropical (MACEDO, 2008; MACEDO et al., 2008; STUTCHBURY E MORTON, 2008) e em especial, no grupo de aves como as aquáticas (MIÑO E DEL LAMA, 2009).

Aves aquáticas coloniais oferecem um modelo biológico interessante para o estudo dos sistemas de acasalamento, pois exibem comportamentos que têm sido propostos como favoráveis à ocorrência de parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) e de paternidade extra-par (PEP). Muitas dessas espécies reproduzem-se em colônias, nas quais um grande número de indivíduos reprodutivos se concentra num mesmo local. Tanto o agrupamento espacial de indivíduos reprodutivos quanto a maior sincronia reprodutiva entre eles têm sido propostos como comportamentos que favorecem a ocorrência de cópula extra-par (CEP) (e paternidade extra par, PEP) e PNI em aves (BROWN E BROWN, 2001; LYON E EADIE, 2008). Apesar de representarem um modelo interessante, o grupo das aves aquáticas coloniais tem sido pouco estudado quanto aos sistemas genéticos de acasalamento (MIÑO E DEL LAMA, 2009). Informações detalhadas sobre a biologia básica de aves aquáticas são escassas no Brasil e a sua obtenção contribuirá para a pesquisa de aspectos básicos de sua biologia assim como para o estabelecimento das prioridades para a conservação dessas espécies (MARINI E GARCIA, 2005).

No presente estudo propõe-se caracterizar as relações de parentesco entre indivíduos de populações naturais brasileiras de três espécies de aves aquáticas coloniais da ordem Ciconiiformes: o colhereiro (*Platalea ajaja* Linnaeus 1758), a garça-

branca-grande (*Ardea alba egretta* Gmelin 1789) e o cabeça-seca (*Mycteria americana* Linnaeus 1758). Essas três espécies apresentam em comum o comportamento reprodutivo em colônias reprodutivas localizadas em áreas alagáveis ao longo de todo o Brasil. Por outro lado, essas espécies diferem na extensão do cuidado parental dado aos filhotes, os quais apresentam diferentes níveis de autonomia: os ninhos de cabeça-seca são completamente dependentes dos pais para sobreviverem (altriciais), enquanto que os ninhos de colhereiros e os de garça-branca-grande são semi-independentes (semi-altriciais); essa última espécie apresenta o menor grau de dependência dos pais dentre as três espécies. O cuidado parental é um dos fatores que poderiam influenciar no grau de PNI e PEP em populações naturais de aves. Ao estudar espécies filogeneticamente relacionadas, mas com níveis de cuidado parental diferentes, propõe-se contribuir com novas informações sobre a relação entre o grau de PEP e PNI e esse comportamento parental.

Estudos detalhados sobre sistemas de acasalamento em populações naturais de colhereiro, garça-branca-grande e cabeça-seca inexistem. A observação direta de adultos marcados na natureza requer um custo alto em termos de esforço e investimento nas tarefas de campo (YOM-TOV, 1980; ANDERSSON, 1984). Esse trabalho fica ainda mais dificultado porque nessas espécies não há dimorfismo sexual. O desenvolvimento de estudos tradicionais de atribuição de paternidade e maternidade para determinação do sistema de acasalamento nessas espécies tem sido impedido por limitações relacionadas à indisponibilidade de informação genética dos adultos responsáveis por uma determinada progênie. Como consequência dessa limitação de amostragem, os genótipos dos supostos progenitores não podem ser comparados de maneira direta com os dos filhotes que estão sendo cuidados por esses adultos. Com o presente estudo, propõe-se utilizar de métodos da genética molecular para se investigar as relações de parentesco entre ninhos amostrados dentro dos mesmos ninhos, em populações naturais dessas três espécies de aves aquáticas. Pelas categorias de relacionamento entre ninhos encontradas, procurar-se-á fazer inferências sobre o sistema genético de acasalamento dos adultos que produziram esses ninhos. Caso os adultos das espécies estudadas sejam geneticamente monogâmicos o esperado é que todos os ninhos amostrados dentro de um determinado ninho sejam irmãos completos. Caso haja evidências genéticas da existência de outras categorias de relacionamento entre os ninhos de um mesmo ninho (meio irmãos e não

relacionados), estas serão interpretadas como argumentos a favor de um sistema diferente da monogamia genética.

Outra proposta do presente trabalho é expandir a análise realizada por Souza (2008) sobre níveis e padrões de distribuição da variabilidade genética em locos de microssatélites de populações brasileiras de garça-branca-grande. Nesse estudo, a autora encontrou, com um número limitado de indivíduos, diferenciação genética entre populações de garças do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul. No presente estudo, propõe-se aumentar o número de indivíduos analisados em cada região e realizar análises Bayesianas para detectar estruturação populacional em ausência de informação geográfica. Além disso, propõe-se aprimorar os testes de alocação de indivíduos às potenciais populações de origem, para explorar melhor a possível existência de diferenciação genética sutil, mas significativa, entre essas regiões brasileiras. Além disso, examinar-se á a possível existência de um padrão de tipo isolamento pela distância (IBD), com o objetivo de melhor entender as causas da diferenciação genética entre regiões, se verificada. Ainda, investigar-se-ão sinais genéticos de diferentes processos demográficos, como por exemplo a redução do tamanho populacional, por meio de parâmetros genético- populacionais (excesso temporário de heterozigotos, distribuição das frequências alélicas e relação entre o intervalo de tamanho, em pares de bases, entre o maior e menor alelo e o número de alelos/loco). O conhecimento da variabilidade genética e de como essa variabilidade se distribui nas populações brasileiras de garça-branca-grande ajudará a inferir sobre aspectos da biologia dessa espécie (como os padrões de dispersão e fluxo gênico). O padrão de distribuição da diversidade genética em populações naturais permitirá identificar processos demográficos pelos quais essas populações podem ter passado, o qual é, muitas vezes, difícil de ser atingido com informações não-genéticas. Por outro lado, o conhecimento da saúde genética das populações de garça-branca-grande auxiliará na avaliação do estado dos ecossistemas nos quais essas aves habitam. Por fim, se a existência de diferenciação genética entre as populações do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul proposta por Souza (2008) for confirmada, sugerir-se-ão medidas tendentes à conservação dessas populações à luz desses achados.

Objetivos

Objetivos

1 Geral

- ❖ Estimar parâmetros populacionais e parentesco genético para ninhegos de populações naturais brasileiras de três espécies de Ciconiiformes: o cabeça-seca (*Mycteria americana*), o colhereiro (*Platalea ajaja*) e a garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*).

2 Específicos

- ❖ Estimar parâmetros genético-populacionais em colônias reprodutivas brasileiras de *Mycteria americana*, *Platalea ajaja* e *Ardea alba egretta*, com base em marcadores moleculares nucleares de tipo microssatélites;
- ❖ Estimar o grau de parentesco genético entre filhotes amostrados dentro dos mesmos ninhos em colônias reprodutivas brasileiras de *Mycteria americana*, *Platalea ajaja* e *Ardea alba egretta*, com base nos seus genótipos em múltiplos locos de microssatélites;
- ❖ Utilizar uma combinação de abordagens para reconstrução de relacionamentos e testes estatísticos para se identificar o vínculo mais provável entre os ninhegos amostrados dentro dos mesmos ninhos, com base nos seus genótipos em múltiplos locos de microssatélites;
- ❖ Inferir sobre os sistemas de acasalamento de *Mycteria americana*, *Platalea ajaja* e *Ardea alba egretta* a partir das categorias de relacionamento encontradas para pares de ninhegos amostrados dentro dos mesmos ninhos;
- ❖ Avaliar o grau e os padrões de distribuição de variabilidade genética em colônias reprodutivas brasileiras de *Ardea alba egretta* do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul e discutir esses resultados à luz das características de história de vida e dos processos demográficos nas populações dessa espécie.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 Áreas de estudo

2.1.1 Banhados do Estado do Rio Grande do Sul

As áreas úmidas da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul (RS) alojam uma avifauna aquática muito rica e abundante, sendo essa uma das regiões da América do Sul mais importantes para residência e reprodução de aves aquáticas (BENCKE et al., 2006; GUADAGNINE E MALTCHIK, 2007). Essa área também atua como local importante para invernagem e ganho de peso de muitas espécies migratórias (GUADAGNIN et al., 2005; BENCKE et al., 2006). A planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul é caracterizada por um clima subtropical úmido, apresenta um complexo mosaico de dunas, banhados, campos e matas, além de um sistema de lagoas costeiras (BECKER et al., 2006a). A precipitação pluvial dessa planície varia entre 1.000 e 1.500 mm.

Para o presente estudo foram acessadas oito colônias reprodutivas na planície costeira nas quais foram amostrados o colhereiro e a garça-branca-grande (Fig. 2.1 e 2.2; Tabela 2.1).

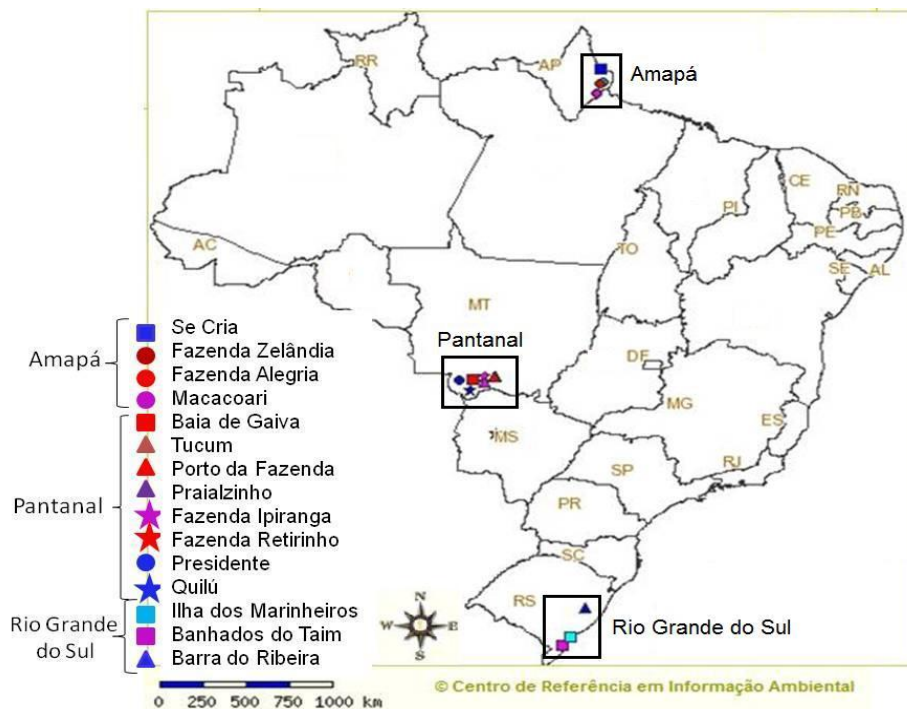


Figura 2.1. Mapa do Brasil com símbolos que indicam a localização aproximada das colônias reprodutivas das três espécies de Ciconiiformes acessadas no presente estudo.



Figura 2.2. Fotografia de um ninhal de garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*) e colhereiros (*Platalea ajaja*) no RS, Brasil (Foto: Eridiane Lopes da Silva).

2.1.2 O Pantanal Brasileiro

O Pantanal é uma das maiores planícies continentais alagadas do planeta. No Brasil, compreende uma área de 138.183 km² de planície inundável e inclui a bacia superior do Rio Paraguai (BAP) que drena o Cerrado do Brasil Central (HARRIS et al., 2005a). Esse ecossistema é extremamente rico em fauna terrestre e aquática, consequência do mosaico de habitats disponíveis, originados da grande variedade de solos e dos períodos de inundações (HARRIS et al. 2005a). O Pantanal é uma das planícies alagadas mais ricas em avifauna do mundo, com 463 espécies identificadas (TUBELIS E TOMAS, 2003). É uma das regiões da América do Sul com maior diversidade de aves aquáticas (HARRIS et al. 2005; JUNK et al., 2006). Além da sua importância como região detentora de diversidade alta de aves, o Pantanal atua também como ponto de parada de espécies migratórias (ANTAS, 1994; SILVA, 1998). O ecossistema é considerado *Patrimônio Nacional Brasileiro* pela Constituição de 1988, *Planície Alagável de Importância Internacional* pela Convenção RAMSAR (1993) e *Reserva da Biosfera e Patrimônio Natural da Humanidade* (UNESCO, 2001). Embora a importância do Pantanal seja mundialmente reconhecida, apenas 2,5% da BAP está oficialmente protegida no Brasil por unidades de conservação. Como consequência, o Pantanal se

constitui em uma região vulnerável, com alta prioridade para a conservação (OLSON et al., 1998). Dados sobre a sua biodiversidade ainda são escassos e fragmentados (SILVA et al., 2001; SILVA, 2002; HARRIS et al., 2005 a,b) e novas informações sobre as espécies que nele habitam precisam ser urgentemente recolhidas.

A formação vegetal do Pantanal caracteriza-se por apresentar um mosaico de classes de vegetação: o campo, o cerradão, o cerrado, os brejos, a mata semidecídua, a mata de galeria e a vegetação flutuante (SILVA et al., 2000). A pastagem natural, da qual depende a fauna herbívora, é o principal recurso florístico do Pantanal e inclui representantes da vegetação aquática e arbórea (MOURÃO et al., 2002). A precipitação pluvial do Pantanal está aproximadamente entre os 800 e os 1.200 mm anuais e entre 30% a 70% da água da chuva ficam retidos, favorecendo a inundação das grandes planícies (ALHO, 2008). As oscilações climático-hidrológicas que ocorrem anualmente no Pantanal influenciam fortemente os deslocamentos das populações silvestres que habitam essa área. A dinâmica hídrica da região e o ciclo hidrológico garantem a biodiversidade alta e mantêm o funcionamento ecológico de toda a região (HARRIS et al., 2005a,b). Na atualidade, atividades agropecuárias e agrícolas causam modificações e perdas do habitat, ameaçando a integridade do Pantanal (MOURÃO et al., 2002; HARRIS et al., 2005a), o que afeta diretamente às populações de aves aquáticas.

Para o presente estudo foram amostradas no Pantanal nove colônias reprodutivas de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande (Figura 2.1; Tabela 2.1).

2.1.3 Amapá

O Estado do Amapá (AP) encontra-se localizado na Região Norte do Brasil e apresenta uma área de aproximadamente 143.453,7 km², limitando-se ao norte e noroeste com a Guiana Francesa e com o Suriname, a oeste e sudoeste, com o Estado do Pará (PA) e ao leste e nordeste com o Oceano Atlântico (598 km de costa). O clima do Amapá é “tropical super-úmido” e a região climática que predomina na maior parte do litoral é úmida, com seis meses mais secos (setembro - fevereiro). A zona costeira do Estado do Amapá (ZCA) abarca 25% do território do estado (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ, 2007). Ao longo do Oceano Atlântico e do Delta do Rio

Amazonas, nas regiões litorâneas da ZCA encontram-se depósitos de areia e argila, com partes alagadas, além de bancos de areia, dunas, ilhas, pequenas baías e reentrâncias, estuários, meandros, lagoas, litorais rasos e lamacentos, lagos temporários e permanentes (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ, 2007). Os rios Amapari-Araguari, o Amapá Grande e o Calçoene formam meandros e banhados na planície costeira. Muitos trechos da planície costeira estão sujeitos a inundações periódicas, tanto de água doce como salgada decorrente do ciclo das marés, devido à baixa altitude dessas terras, em relação ao nível do mar e as inúmeras conexões entre diversos tipos de corpos d'água (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ, 2007). A cobertura florística nativa da ZCA alberga uma grande variedade de habitats adequados para as aves aquáticas, entre os quais se destacam os pântanos de água doce e de água salgada (“campos de várzea”), as savanas alagadiças com palmeiras, as florestas alagadiças, as ilhas cobertas de florestas e os lagos, os manguezais, e as restingas costeiras (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ, 2007). A ZCA é bem conhecida como sítio de parada para várias espécies de aves migratórias da Região Neártica e muitas espécies de gaivotas. Várias aves aquáticas são residentes na região, como *Eudocimus ruber*, *Mycteria americana*, *Jabiru mycteria*, *Ciconia maguari*, *Platalea ajaja*, *Nyctanassa violacea*, *Nycticorax nycticorax*, *Egretta tricolor*, *Egretta caerulea*, *Ardea alba* e *Ardea cocoi*. É interessante notar que a única população brasileira do flamingo caribenho (*Phoenicopterus ruber*) encontra-se nesta região (DE LUCA et al., 2006).

Destaca-se o grau baixo de alterações antrópicas em quase todas as formações da vegetação natural do Estado. Estima-se que o total de florestas nativas perdidas no estado, desde a década de 1970 é de pouco acima de 1%, sendo esta a vegetação nativa menos alterada dentre todos os estados amazônicos (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ, 2007). Os manguezais do Amapá são considerados os mais preservados de todo o litoral brasileiro (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ, 2007). Sessenta e dois por cento do território do Estado do Amapá (8.798.040,31ha) estão protegidos em 19 unidades de conservação, as quais apresentam uma expressiva representatividade ecossistêmica. Porém, tem se detectado, mais recentemente, que o estado passa por modificações e reduções de habitat como consequência das pressões introduzidas no ambiente pelas práticas pecuárias (criação de búfalos e outros animais).

No presente estudo foram acessadas quatro colônias reprodutivas localizadas no Estado do Amapá (Figura 2.1 e 2.3; Tabela 2.1). Essas colônias estavam compostas, principalmente, por *Mycteria americana* e *Platalea ajaja*, com presença, em menor proporção, de *Ardea alba* e *Eudocimus ruber* (guará-vermelho) (AVELAR et al., 2009). Os ninhais de Macacoari (MA), Fazenda Zelandia (FZ) e Se Cria (SC) localizam-se em terreno alagadiço, dependente do regime de chuvas e/ou marés, classificando-se a fisionomia vegetal no seu entorno como mata de várzea, enquanto que, a fisionomia vegetal no entorno de FA pode ser classificada como mata de terra firme (AVELAR et al., 2009). A disposição dos ninhos das distintas espécies de Ciconiiformes nessas colônias apresenta-se de maneira estratificada, com os ninhos de cabeça-seca localizados nos galhos mais altos das árvores (entre 15 e 25m) até em arbustos (com altura entre 3 e 4 m), o dos colhereiros em alturas intermédias (2 a 3m) e os das garças em altura menor (1-2m) (AVELAR et al., 2009).



Figura 2.3. Fotos da colônia reprodutiva “Se Cria”, no Estado do Amapá, que ilustram: a) Ovos de *Mycteria americana* no momento da eclosão; b) Ninhegos de *Mycteria americana* no ninho; c) Jovens de *Mycteria americana* nos seus ninhos; e d) Aspecto geral da colônia reprodutiva (Fotos do acervo do LGA-DGE/UFSCar).

2.2 Procedimento de coleta de material biológico

O acesso às colônias reprodutivas das aves aquáticas estudadas no presente estudo requereu, dependendo da sua localização, a ajuda de colaboradores que proveram os recursos necessários para tal fim, como barcos, botes e veículos tracionados apropriados para todo terreno. As equipes de campo estiveram constituídas por pessoal guia com conhecimento das áreas visitadas (moradores locais e/ou pessoal ligado às agências governamentais), pessoal experiente no uso de material de escalada (para coletar os ninhegos nos ninhos localizados em árvores altas) e pesquisadores do Laboratório de Genética de Aves (LGA, UFSCar – DGE). Os ninhos foram acessados com ajuda de material de escalada (no caso da colônia Fazenda Zelândia, do Estado do Amapá, e de algumas colônias do Pantanal), ou com ajuda de escada (no caso da colônia Se Cria, do Estado do Amapá e de algumas colônias do Pantanal) (Fig. 2.4).

A coleta de material biológico para este estudo foi realizada com licença das autoridades ambientais Brasileiras (IBAMA). Todos os ninhegos presentes nos ninhos foram recolhidos manualmente, colocados em sacos especiais confeccionados com tecido escuro (para minimizar o desconforto dos animais), descidos até o chão com ajuda de uma corda e roldana (no caso da coleta em árvores altas) e depositados na área de trabalho (mesa ou solo). No momento da coleta, os ninhegos das três espécies tinham 2-3 semanas de vida. Nessa idade os ninhegos ainda não se deslocam para fora do ninho, o que garantiu que aqueles encontrados dentro de um determinado ninho pertenciam, de fato, a esse ninho. Todos os ninhegos amostrados dentro do mesmo ninho foram colocados num único saco, tendo-se cuidado especial para não misturá-los durante o seu manuseio posterior. Para cada ninhego, foram anotadas as medidas do comprimento do tarso, bico, asa e cúlmen, e o peso. Amostras de sangue, de entre 0,2 ml e 0,4 ml, foram coletadas dos ninhegos utilizando uma seringa hipodérmica de 1 ml (BD Plastipak®) com agulha estéril de parede fina bisel trifacetada (27,5 G $\frac{1}{2}$). A punção foi realizada na veia braquial das aves, após limpeza dessa área com algodão embebido em álcool iodado. Cada seringa foi enxaguada com anticoagulante EDTA (3%), antes da coleta de sangue. Depois de retiradas das seringas, as amostras de sangue foram armazenadas em álcool a 96% (MERCK KGaA, Alemanha). Durante o tempo que demorou o trabalho de campo, as amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente e, uma vez no laboratório, foram colocadas a -20°C até o seu processamento.



Figura 2.4. Fotografias que ilustram as condições gerais de coleta de amostras para o presente estudo. a) Colaborador durante a campanha à colônia Se Cria, no Estado do Amapá, com ninhego de colhereiro nas mãos; b) Equipe de campo durante a caminhada para acessar a colônia Se Cria, no Estado do Amapá; c) Equipe de campo colocando uma escada para acessar os ninhos numa colônia do Pantanal; d) Colaborador durante a campanha ao Pantanal, com um ninhego de garça-branca-grande recolhido em um ninho (Fotos do acervo do LGA-DGE/UFSCar).

Além das amostras coletadas pela equipe do LGA, colaboradores coletaram amostras de penas em crescimento de ninhegos de colhereiro nas colônias do Estado do Rio Grande do Sul. As penas foram colocadas em tubos de 1,5 ml e armazenadas em álcool a 96% (MERCK KGaA, Alemanha) à temperatura ambiente, até a sua chegada no laboratório. Uma vez no laboratório, as amostras foram armazenadas a -20°C até o seu processamento.

A figura 2.5 mostra fotografias que ilustram ovos e ninhegos de garça-branca-grande e um ninhego sendo medido numa colônia do Estado do Rio Grande do Sul.



Figura 2.5. Fotos que mostram: a) Ovos; b) Ninhegos no ninho; c) Ninhego sendo medido; e d) Ninho com ovos em uma colônia de *Ardea alba egretta* do Estado do Rio Grande do Sul (Fotos do acervo do LGA-DGE/UFSCar).

2.3 Material Biológico

O total de amostras de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande coletadas para este estudo apresenta-se na tabela 3.1. As expedições de 2006, 2007 e 2008 foram realizadas durante o decorrer do presente estudo. O total de ninhos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande com um, dois, três e quatro ninhegos coletados no Estado do Amapá, no Estado do Rio Grande do Sul e no Pantanal estão registrados na na figura 2.6. Detalhes sobre o número de ninhos com um, dois, três e quatro ninhegos coletados por colônia e por espécie apresentam-se no Apêndice A.

Além dos indivíduos coletados no Brasil, foram analisados genótipos de 51 colhereiros mantidos em três zoológicos dos Estados Unidos de América (EUA): Fort Worth Zoo (N = 22), Dallas Zoo (N = 20) e Sedgwick County Zoo (N = 9) e mais 10 colhereiros coletados na natureza na Flórida (EUA). Trinta e cinco dessas amostras constituíram 17 supostas famílias (supostos pais e progênes listados no *studbook* dos zoológicos) (Tabela 2.2).

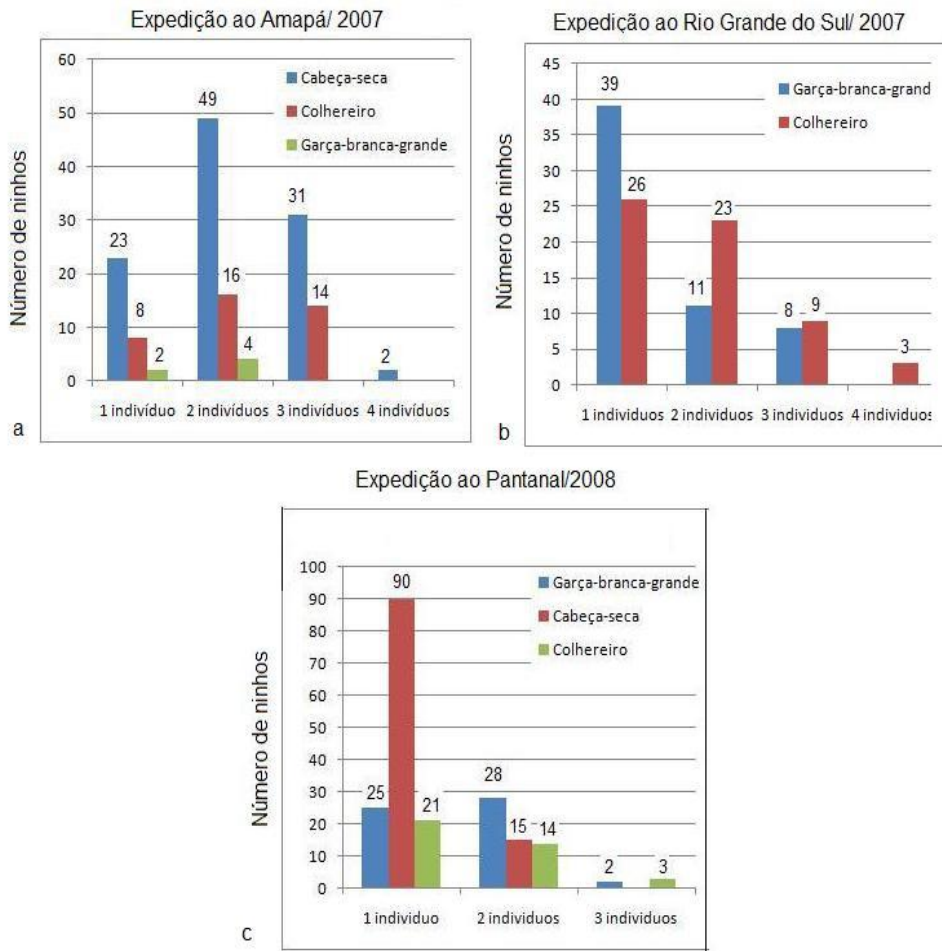


Figura 2.6. Número de ninhos de *Mycteria americana*, *Ardea alba egretta* e *Platalea ajaja* com um, dois, três ou quatro ninhegos, amostrados durante as expedições de 2007 e 2008 nos estados do: a) Amapá; b) Rio Grande do Sul; e c) no Pantanal (Brasil).

Tabela 2.1. Número de indivíduos e número de ninhos de *Platalea ajaja*, *Mycteria americana* e *Ardea alba* amostrados no Pantanal (MT e MS), Estado do Amapá (AP) e Estado do Rio Grande do Sul (RS) (Brasil). Apresentam-se a data de coleta, os nomes de cada colônia reprodutiva e as suas coordenadas geográficas.

Espécie	Data de coleta	Local de Coleta	Coordenadas geográficas	Nº ninhos	Nº indivíduos
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/2003	Baia de Gaíva (BG), MT	16°35'00'' S; 57°14'00'' O	4	10
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/2003	Quilú (QL), MT	17°17'00'' S, 56°21'00'' O	1	2
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/2003	Fazenda Ipiranga (FI), MT	16°25'00'' S; 56°36'00'' O	3	6
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/2003	Porto da Fazenda (PF), MT	16°28'05'' S; 56°07'35'' O	2	5
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/2003	Fazenda Retirinho (FR), MS	19°50'00'' S; 56°02'00'' O	2	6
<i>Platalea ajaja</i>	Dezembro/2003	Banhado do Taim (BT), RS	32°29'00'' S, 52°32'00'' O	1	2
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/ 2008	Porto da Fazenda (PF), MT	16°28'05'' S; 56°07'35'' O	17	25
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/ 2008	Praialzinho (PRA), MT	16°46'04'' S, 56°35'02'' O	16	28
<i>Platalea ajaja</i>	Setembro/ 2008	Segala (SG), MT	16°18'00'' S, 57°02'45'' O	5	5
<i>Platalea ajaja</i>	Outubro/ 2007	Fazenda Nova Zelândia (FZ), AP	01°09'00'' N, 50°23'00'' O	14	27
<i>Platalea ajaja</i>	Outubro/ 2007	Ninhal Se Cria (SC), AP	01°56'00'' N, 50°35'00'' O	25	55
<i>Platalea ajaja</i>	Dezembro/ 2007	Coxilha Fazenda das Flores (CX), RS	32°10'14'' S, 52°32'52'' O	61	111
<i>Platalea ajaja</i>	Dezembro/ 2007	Ilha dos Marinheiros (IM), RS	31°59'58'' S, 52°07'08'' O	13	13
Total				164	295
<i>Mycteria americana</i>	Setembro/2000	Fazenda Ipiranga (FI), MT	16°25'00'' S; 56°36'00'' O	6	13
<i>Mycteria americana</i>	Outubro/2006	Fazenda Nova Zelândia (FZ), AP	01°09'00'' N, 50°23'00'' O	72	72
<i>Mycteria americana</i>	Outubro/ 2007	Macacoari (MAC), AP	00°27'00'' N, 50°40'00'' O	48	115
<i>Mycteria americana</i>	Outubro/ 2007	Fazenda Nova Zelândia (FZ), AP	01°09'00'' N, 50°23'00'' O	10	16
<i>Mycteria americana</i>	Outubro/ 2007	Fazenda Alegria (FA), AP	01°02'00'' N, 50°32'00'' O	4	8
<i>Mycteria americana</i>	Outubro/ 2007	Ninhal Se Cria (SC), AP	01°56'00'' N, 50°35'00'' O	43	81
<i>Mycteria americana</i>	Setembro/ 2008	Tucum (TUC), MT	16° 26'31'' S, 56°03'28'' O	14	28
<i>Mycteria americana</i>	Setembro/ 2008	Praialzinho (PRA), MT	16°46'04'' S, 56°35'02'' O	20	21
<i>Mycteria americana</i>	Setembro/ 2008	Presidente (PT), MT	16°43'00'' S, 57°50'00'' O	36	44
<i>Mycteria americana</i>	Setembro/ 2008	Porto da Fazenda (PF), MT	16°28'05'' S; 56°07'35'' O	18	20
<i>Mycteria americana</i>	Setembro/ 2008	Segala (SG), MT	16°18'00'' S, 57°02'45'' O	16	16
Total				287	434
<i>Ardea alba egretta</i>	Outubro/1999	Baia de Gaíva (BG), MT	16°35'00'' S; 57°14'00'' O	5	5

<i>Ardea alba egretta</i>	Outubro/1997	Fazenda Ipiranga (FI), MT	16°25'00'' S; 56°36'00'' O	6	6
<i>Ardea alba egretta</i>	Janeiro/2007	Barra do Ribeiro (BR), RS	30°16'46'' S, 51°23'52'' O	41	68
<i>Ardea alba egretta</i>	Janeiro/2007	Santa Maria (SM), RS	29°42'36'' S, 53°16'02'' O	34	34
<i>Ardea alba egretta</i>	Janeiro/2007	Serrinha (SE), RS	30°22'58'' S, 54°04'37'' O	27	27
<i>Ardea alba egretta</i>	Janeiro/2007	Mariante (MA), RS	29°40'48'' S, 51°58'07'' O	23	23
<i>Ardea alba egretta</i>	Janeiro/2007	Pântano Grande (PG), RS	30°10'58'' S, 52°20'51'' O	17	17
<i>Ardea alba egretta</i>	Outubro/2007	Macacoari (MAC), AP	00°27'00'' N, 50°40'00'' O	6	10
<i>Ardea alba egretta</i>	Setembro/ 2008	Tucum (TUC), MT	16° 26'31'' S, 56°03'28'' O	10	15
<i>Ardea alba egretta</i>	Setembro/ 2008	Praialzinho (PRA), MT	16°46'04'' S, 56°35'02'' O	22	36
<i>Ardea alba egretta</i>	Setembro/ 2008	Porto da Fazenda (PF), MT	16°46'00'' S; 56°12'00'' O	22	35
<i>Ardea alba egretta</i>	Setembro/ 2008	Segala (SG), MT	16°18'00'' S, 57°02'45'' O	5	5
<i>Ardea alba egretta</i>	Setembro/ 2008	Presidente (PT), MT	16°43'00'' S, 57°50'00'' O	1	1
Total				219	282

Tabela 2.2. Relação de amostras de colhereiro (*Platalea ajaja*), mantidas em cativeiro em zoológicos dos Estados Unidos de América, cujos genótipos usaram-se na análise de parentesco e paternidade no presente trabalho. FW: Fort Worth Zoo; DZ: Dallas Zoo; SCZ: Sedgwick County Zoo; ND: Não disponível.

Família registrada	Progenitores registrados		Progênie registrada
	Macho	Fêmea	
#1	FW11	FW15	FW10, FW12
#2	FW10	FW12	FW13
#3	FW11	ND	FW16
#4	FW21	FW16	FW17
#5	ND	FW15	FW19
#6	ND	FW19	FW20
#7	ND	FW15	FW21
#8	SCZ44	SCZ43	DZ31
#9	SCZ46	ND	DZ32
#10	SCZ44	ND	DZ33, DZ34
#11	SCZ44	SCZ43	DZ35
#12	DZ32	DZ29	DZ36, DZ37
#13	DZ33	DZ28	DZ38
#14	DZ25	DZ26	DZ39, DZ40, DZ41, DZ42
#15	ND	DZ30	SCZ45
#16	SCZ46	ND	SCZ47, SCZ48, SCZ49
#17	SCZ48	SCZ45	SCZ51

2.4 Procedimentos laboratoriais

2.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 20 µl de papa de hemácias ou 80 µl do conteúdo das penas em crescimento dos ninhegos das três espécies utilizando-se o procedimento de Sambrook et al. (2001) (detalhes no Apêndice B). A integridade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas mediante eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA), corado com Brometo de Etídeo (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA). Para tal, 5 µl da solução aquosa de DNA estoque foram aplicados no gel e corridos junto com alíquota equivalente do marcador de massa molecular MassRuler™ DNA Ladder Low Range (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, EUA). Depois da eletroforese a 5 volts/cm, durante aproximadamente 40 minutos em cuba para eletroforese horizontal (Gibco BRL, New York, NY, EUA), os géis foram examinados sob luz UV em transiluminador MacroVue UVis-20 (Hoefler Inc., San Francisco, EUA). Os géis foram fotografados com uma câmera fotográfica digital Kodak Digital Science™ (Eastman Kodak Company, NY, EUA). O programa 1D Image Analysis®

Software (Eastman Kodak Company, NY, EUA) auxiliou na estimativa do peso molecular do DNA genômico extraído, mediante comparação da intensidade da banda do DNA com a correspondente banda do marcador de massa molecular. Após cálculo da massa molecular do DNA genômico, as amostras foram divididas em dois grupos, o “DNA estoque” (sem diluir), foi armazenado em freezer a -20°C, e a “solução de trabalho” (diluída com água deionizada estéril a aproximadamente uma concentração de 40 ng/μl), foi armazenada em geladeira a 4°C, para posterior utilização na amplificação dos marcadores moleculares através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.4.2 Amplificação dos locos de microssatélites

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a caracterização dos fenótipos foram escolhidos com base na literatura (Tabela 2.3). Marcadores espécie-específicos foram utilizados para o cabeça-seca e o colhereiro (TOMASULO-SECCOMANDI et al., 2003; SAWYER e BENJAMIN, 2006). Como não existem microssatélites descritos para a garça-branca-grande, foram utilizados marcadores descritos para *Ardea herodias* (MCGUIRE E NOOR 2002), cuja amplificação foi padronizada em *Ardea alba* por Souza (2008). Testes de amplificação foram também feitos em todas as espécies estudadas, com os locos descritos para cabeça-seca (TOMASULO-SECCOMANDI et al., 2003), colhereiro (SAWYER E BENJAMIN, 2006) e *Ardea herodias* (MACGUIRE E NOOR, 2002). Foram testados também os locos Eru04 e Eru09 descritos para *Eudocimus ruber* (Aves: Threskiornithidae) (SANTOS et al., 2005) e o loco Nnf5, descrito para *Nipponia nippon* (JI et al. 2004). Porém, o iniciador Nnf5 não amplificou em nenhuma das três espécies e os iniciadores Eru04 e Eru09 amplificaram somente no colhereiro, mas não foram polimórficos numa amostra de 10 indivíduos de diferentes colônias reprodutivas.

As reações de amplificação dos marcadores foram realizadas dentro de uma câmara de fluxo laminar e tanto os materiais plásticos utilizados quanto o local de trabalho foram esterilizados com radiação com luz ultravioleta (UV) durante, ao menos, 10 minutos antes do início da preparação das reações de amplificação. Para minimizar riscos de contaminação, o DNA molde foi colocado nos tubos de 0,2 ml utilizando-se ponteiras com filtro (Axygen, Union City, CA, EUA). Todas as reações de amplificação foram realizadas utilizando-se um aparelho termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha).

Tabela 2.3. Locos de microssatélites que amplificaram com sucesso em *Mycteria americana*, *Platalea ajaja* e *Ardea alba*. Para cada loco apresentam-se o nome do oligonucleotídeo iniciador, as suas sequências (*forward*: *F* e *reverse*: *R*) e a temperatura de hibridação (T °C) utilizada no presente estudo.

Espécie	Loco	Seqüência dos iniciadores (5'-3')	T°C	
<i>Mycteria americana</i> ¹	WSμ03	F-AGAAGCCAAATTGATTAGA R-ACAAAGTTGCGGAGAA	60°C	
	WSμ08	TGTCTTTCCAGGTAGTTT TACAACGTTCGTGCTTT	60°C	
	WSμ09	GGTAACAGCGAGTTGGAT TAATGCCAATAAGTGCTTAG	60°C	
	WSμ13	AGGGCTCATCAATAGTGT GTTTGCCCACTGTGTCAACT	60°C	
	WSμ14	AAATGAGCACGGTATT GTTTCTGTGTTAGTGGCTAAG	60°C	
	WSμ18	CATATACTAACTGGGTTTAATC GTTGTTCTGCGTTATTC	55°C	
	WSμ20	CGGGCCTTTATCTATC ACAGTACCAAACCATTCA	55°C	
	WSμ23	TTTTGGTGGGATTGATA ATAAAAGGGTTAGAAAGACT	55°C	
	WSμ24	GTAAGGCATGAGAGACTAAG GTGTGATTTAGGATTGTT	55°C	
	<i>Platalea ajaja</i> ²	Aajμ1	F-GATCACCACCATCTTAAATGATAA R-CTTCTGTTTGCCTCACATGG	55°C
		Aajμ2	F-CTTGATGCAAAGGAAACATCC R-GAGGTGCTTCCAGTTTCCTG	55°C
		Aajμ3	F-CCCATGGCCACATTATAAACTT R-GCTCTGGAGTAACTTGCTGGA	55°C
		Aajμ5	F-GGCTGAACACTGTTGTGCTCT R-GAACCAAGCCTCCCTGAATA	58°C
		WSμ03	F-AGAAGCCAAATTGATTAGA R-ACAAAGTTGCGGAGAA	60°C
<i>Ardea alba</i> ³	Ah211	F-GCTCATCAGGAGTTGAATCTGGC R-TCTGTCATTCAGCAATGGACC	57°C	
	Ah217	F-GCTCAGGCTCTGCTTTGTCTAC R-CACAGATTCAAACAAGCACCATGC	57°C	
	Ah320	F-TTAGGAGCAAGATTTTAAAGAAGGTGC R-AAGTGCTGGGTCATACTGGAATAG	55°C	
	Ah414	F-CATTCCAGCTGCTCTTCATTCTTG R-GGCAAAAGCAACTAGGGGC	56°C	
	Ah522	F-TTGTGGGACTAAACAGTGAAGCAG R-CAAAGCTGATTTAAAGATGTTCCATCCC	56°C	
	Ah630	F-TCCTCCTTCACAATGCTACTTGC R-CGGCAGGCAGTATTATTCAGTGG	55°C	
	WSμ03	F-AGAAGCCAAATTGATTAGA R-ACAAAGTTGCGGAGAA	60°C	

1) Tomasulo-Seccomandi e cols., 2003; 2) Sawyer e Benjamin, 2006; 3) MacGuire e Noore, 2002 (locos desenvolvidos em *Ardea herodias*).

As reações de amplificação dos marcadores de microssatélites seguiram protocolos diferentes para cada espécie, como descritos em seguida:

✓ Cabeça-seca: As reações de amplificação tiveram volume final de 10 µl, com: tampão para PCR (10 mM Tris pH 8,8 25°C; 50 mM KCl; 0,8% Nonidet P40), 2,5 mM MgCl₂, 0,15 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra), 0,5 U *Taq* DNA Polimerase (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, EUA) e aproximadamente 50 ng de DNA molde. As concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse* (marcados com os fluorocromos HEX e FAM; Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canadá) variaram entre 0,16 µM e 0,80 µM para permitir a realização de reações de amplificação com vários iniciadores simultaneamente. O programa de amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial por 5 min. a 94°C; cinco ciclos a 94°C por 20 s., 20 s. à temperatura de hibridação mais alta dos iniciadores utilizados e 20 s. a 72°C; 21 ciclos a 94°C por 20 s., 20 s. à temperatura de hibridação mais alta (diminuindo-se -0,5°C por ciclo, *touchdown*) e 20 s. a 72°C; 10 ciclos a 94°C por 20 s., 20 s. à temperatura de hibridação mais baixa e 20 s. a 72°C; extensão final de 10 min. a 72°C seguida de manutenção dos tubos a 4°C até a sua retirada do aparelho de ciclagem térmica.

✓ Colhereiro: As reações de amplificação tiveram volume final de 10 µl, com: tampão de PCR com 10 mM Tris pH 8,8 25°C; 50 mM KCl e 0,8% Nonidet P40 (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, EUA), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador (marcados com os fluorocromos HEX e FAM, Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canadá), 150 µM de cada dNTP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra), 0,5 U *Taq* DNA Polimerase (Fermentas Inc, Glen Burnie, MD, EUA) e aproximadamente 40 ng de DNA molde. O programa de amplificação incluiu: denaturação da dupla fita de DNA por 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 50 s. à 94°C, 50 s. à temperatura de hibridação de cada iniciador e extensão por 50 s. a 72°C, seguidos de um passo final de extensão por 5 min. a 72°C, e manutenção dos tubos a 4°C até a sua retirada do aparelho de ciclagem térmica.

✓ Garça-branca-grande: As reações de amplificação dos microssatélites utilizados basearam-se nos protocolos padronizados por Souza (2008), com algumas modificações, dependendo do loco:

- Para os locos Ah211 e Ah320, as reações tiveram volume final de 15 µl, com: tampão para PCR [75 mM Tris HCL pH 9,0 25°C; 50 mM KCL; 20 mM (NH₄)₂SO₄; (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, Espanha)], 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra), 1U *Taq* DNA Polimerase (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, Espanha), 0,20 µM de cada iniciador (*forward* e

reverse, marcados com os fluorocromos TET e HEX) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação começou com um ciclo de desnaturação à 94°C por 90 s., seguido por 30 ciclos de: 94°C por 30 s., hibridação à temperatura específica do iniciador (MCGUIRE E NOOR, 2002) por 30 s. (redução de 0,1°C por ciclo, *touchdown*), extensão a 72°C por 45 s., seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 10 min., e manutenção dos tubos à 4°C até a sua retirada do aparelho termociclador.

- Para os locos Ah414, Ah217, Ah522 e Ah630 foram utilizados protocolos diferentes dos anteriores, pois os oligonucleotídeos *forward* usados na amplificação desses locos traziam uma “cauda M13”, permitindo a utilização do protocolo de marcação fluorescente dinâmica (BOUTIN-GANACHE et al., 2001; SCHUELKE et al., 2000) (detalhes dessa metodologia estão no Apêndice C).

O rendimento dos produtos de amplificação foi avaliado através de eletroforese em géis de agarose (2%, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA), corados com Brometo de Etídeo (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA). Depois da eletroforese a 10 V/cm durante 25 minutos em cuba para eletroforese horizontal (Gibco BRL, New York, EUA), visualizaram-se as bandas relativas aos fragmentos amplificados nos géis, utilizando-se um transiluminador MacroVue UVis-20 (Hoefer Inc., San Francisco, EUA) e lâmpadas de luz ultravioleta (GE Healthcare do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Os produtos que apresentaram bandas intensas e nítidas sob luz UV foram utilizados em seguida para determinação dos fenótipos em locos múltiplos de cada indivíduo.

2.4.3 Identificação dos fenótipos nos locos de microssatélites

Os fenótipos nucleares nos locos de microssatélites foram determinados para todos os ninhegos coletados das três espécies estudadas, com auxílio de um aparelho sequenciador automático MegaBACE™1000 (GE Healthcare/Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), nas dependências do Laboratório de Imunogenética (Departamento de Genética e Evolução - UFSCar). Os produtos de PCR foram diluídos até 20 vezes, dependendo do seu rendimento e 2 µl dessa diluição foram combinados com 8 µl de uma mistura contendo o marcador para o MegaBACE™ ET550-R (controle interno de peso molecular) (GE Healthcare/Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) e

TWEEN 0,1% (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Os produtos de PCR foram preparados dessa forma (10 µl de volume final), colocados em placas de 96 poços (Axygen, Union City, EUA) seladas com Parafilm® (Pechiney, Menasha, EUA) as quais foram submetidas à leitura laser no sequenciador automático. Os eletroferogramas produzidos após leitura pelo sequenciador foram analisados mediante o programa computacional MegaBACE™ Fragment Profiler v2.2 (GE Healthcare/Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), a fim de se identificar os fenótipos nos locos múltiplos para cada indivíduo estudado. Para se estimar o tamanho molecular dos fragmentos correspondentes a cada um dos alelos dos indivíduos analisados, levaram-se em conta os tamanhos indicados pelo programa e os já descritos na literatura. Os dados de genotipagem foram recolhidos inicialmente em planilhas de “Excel”, as quais serviram de base para a posterior formatação, segundo requerimento de cada programa computacional utilizado nas análises posteriores. As tabelas nas quais foram anotados os alelos dos indivíduos para cada marcador foram inspecionadas visualmente a fim de se excluir erros de digitação e de se assegurar a adequada denominação dos alelos.

2.4.4 Validação dos iniciadores heterólogos utilizados em *Ardea alba*

Como os iniciadores de amplificação utilizados em *Ardea alba* foram originalmente descritos para outra espécie (*Ardea herodias*, MCGUIRE E NOOR, 2002), averiguou-se se a região amplificada em *A. alba* correspondia realmente a uma sequência repetitiva. Produtos resultantes da amplificação do loco Ah414 em *A. alba* foram sequenciados, segundo o método de *Cycle Sequencing* (sequenciamento em ciclo), utilizando-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de sequenciamento foram preparadas separadamente para cada iniciador, em tubos de 0.2 ml, com: 3.2 pmol de cada um dos iniciadores, 3µl de BigDye Terminator Ready Reaction Mix, 3µl do tampão 200 mM Tris-HCl pH 9,0 25°C; 5 mM MgCl₂; pH 9,0 25°C, 1 µl do produto de PCR, e H₂O ultra-pura até completar o volume de 10 µl. O método de sequenciamento utilizado requer que os produtos de PCR sejam previamente purificados. Para tal, utilizou-se o protocolo de Werle et al. (1994), como se segue: para cada 8 µl de produto de PCR, foi adicionado 1 U da enzima *SAP* (Shrimp Alkaline Phosphatase; USB Corp., Cleveland, OH, EUA) e

10 U da enzima *EXO I* (Exonuclease I; USB Corp., Cleveland, OH, EUA). Essa mistura foi colocada à 37°C por 1 h e as enzimas foram posteriormente inativadas mediante incubação por 15 min à 72°C. Alíquotas dos produtos das reações de sequenciamento assim purificados foram colocadas em microtubos, devidamente acondicionados e enviados ao Departamento de Tecnologia da UNESP, em Jaboticabal (SP), a fim de se realizar o sequenciamento, propriamente dito, em sequenciador automático ABI Prism® 3730 ou 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O fragmento resultante da amplificação com o iniciador descrito para *Ardea herodias* foi analisado para verificar se continha uma repetição de tipo SSR. A sequência foi comparada com a base de dados de Nucleotídeos (*Nucleotides*) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI), utilizando-se o recurso BLAST (disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome). Verificou-se se a sequência do fragmento amplificado em *A. alba* apresentava homologia com alguma sequência da base de dados, pelo alinhamento com a ferramenta “Blastn” e como “query” a região repetitiva: 3'-CCCTGCTAAAGTTTGGATGCAAATATTCTGCAGAAATAGCTCAGAAATCGTACTTTGCAG GTAAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT -5'

2.5 Procedimentos de análise estatística dos dados

2.5.1 Estimativas dos parâmetros genético-populacionais para subsidiar às posteriores estimativas de parentesco

Foi realizada uma análise com o auxílio do programa computacional MICROCHECKER (VAN OSTERHOUT et al., 2004) com o objetivo de se detectar a ocorrência de erros na determinação dos fenótipos durante a leitura dos eletroferogramas, assim como também a presença de picos não específicos nos mesmos, de fenômenos como a amplificação alelo-diferencial (*allele dropout*) e a ocorrência de alelos nulos (falta de amplificação de um dos alelos dos indivíduos diplóides, causada por uma mutação na região de hibridação do oligonucleotídeo iniciador ao DNA molde). Uma vez

verificados os fenótipos individuais nos locos múltiplos, foram estimados: número de alelos por loco, frequências alélicas, heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), concordância entre as proporções genótípicas observadas e esperadas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE; teste exato: GUO E THOMPSON, 1992; WEIR E COCKERHAM, 1984), e possível desvio do Desequilíbrio de Ligação (LD). Estimativas desses parâmetros foram calculadas com o auxílio dos programas GENALEX v6.2 (PEAKALL E SMOUSE, 2006) e GENEPOP (RAYMOND E ROUSSET 1995). A Probabilidade de Exclusão (PE), apropriada para situações nas quais nenhum dos progenitores é conhecido, descrita por Garber e Morris (1983) e expressa em termos de homozigotos por Jamieson e Taylor (1997), foi calculada pelo GENALEX v6.2, segundo a equação:

$$P_E = 1 + 4 \sum p_i^4 - 4 \sum p_i^5 - 3 \sum p_i^6 - 8(\sum p_i^2)^2 + 8(\sum p_i^2)(\sum p_i^3) + 2(\sum p_i^3)^2$$

em que p_i é a frequência do alelo i -ésimo em um determinado loco.

A Probabilidade de Identidade (PI , estimativa da probabilidade média de que dois indivíduos não relacionados, amostrados ao acaso da mesma população, tenham o mesmo fenótipo nos locos múltiplos) combinando todos os locos (PAETKAU E STROBECK, 1994) foi calculada pelo programa GENECAAP (WILBERG E DREHER, 2004), de acordo com a seguinte fórmula:

$$P(ID) = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j \neq i} (2p_i p_j)^2$$

em que p_i e p_j são as frequências do alelo i -ésimo e j -ésimo

As estimativas de parâmetros populacionais foram realizadas com base nas amostras de indivíduos coletados em diferentes colônias, dentro de cada região estudada (Tabela 2.4). Esse procedimento se justifica pelo fato de que quanto maior é o número de indivíduos analisados por amostra, maior será a chance de que a amostra seja realmente representativa da população e maior precisão terá a estimativa dos parâmetros populacionais. Assim, haverá menos viés no cálculo de parâmetros baseados em parâmetros populacionais, como por exemplo, o parentesco genético. A combinação de colônias das mesmas regiões (Pantanal, Estado do Amapá e Estado do Rio Grande do Sul) para estimativa dos parâmetros genético-populacionais se baseou na evidência de que diferentes colônias dentro de uma mesma região não apresentam diferenciação

genética entre si (MIÑO E DEL LAMA, 2007; AVELAR, 2008; SOUZA, 2008) e podem ser consideradas como uma mesma população.

Tabela 2.4. Número de indivíduos (N) usados nas estimativas dos parâmetros genéticos das populações de colhereiro (*Platalea ajaja*), cabeça-seca (*Mycteria americana*) e garça-branca-grande (*Ardea alba*) do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

	Estado do Amapá	Pantanal	Estado do Rio Grande do Sul
Espécie	N	N	N
<i>Platalea ajaja</i>	39	38	74
<i>Mycteria americana</i>	72	92	-
<i>Ardea alba</i>	-	57	41

2.5.2 Estimativas de parentesco genético

As estimativas de parentesco genético podem ser calculadas com base nos padrões de identidade-por-descendência, ou IBD (siglas em inglês de *Identity by Descent*), entre os alelos que os indivíduos estudados possuem. Dois alelos que descenderam recentemente (umas poucas gerações atrás) de um mesmo alelo ancestral são denominados “idênticos por descendência”. Por exemplo, o alelo que um indivíduo recebe de um dos seus pais é idêntico por descendência ao alelo desse pai; pode-se dizer, então, que esse indivíduo e o pai dele compartilham um par de alelos IBD e quantificar a relação que existe entre eles supondo que a probabilidade de um par de alelos IBD neles é de um. Então, pode-se concluir que, se dois indivíduos não apresentam nenhum alelo em comum, eles não podem ser classificados como progenitor-prole. As inferências que se pode realizar sobre graus de relacionamento genético são de dois tipos: i) os genótipos observados em determinados indivíduos podem ser usados para distinguir um relacionamento entre um conjunto de alternativas diferentes de relacionamento; e ii) os genótipos observados em determinados indivíduos podem ser usados para se estimar o grau (desconhecido *a priori*) de relacionamento genético. Por exemplo, podemos utilizar os genótipos dos indivíduos X e Y (Figura 2.7), que são filhos dos pais A e B, para concluir que eles estão relacionados em primeiro grau. Alternativamente, pode-se estimar o grau atual de relacionamento entre X e Y (WEIR et al., 2006).

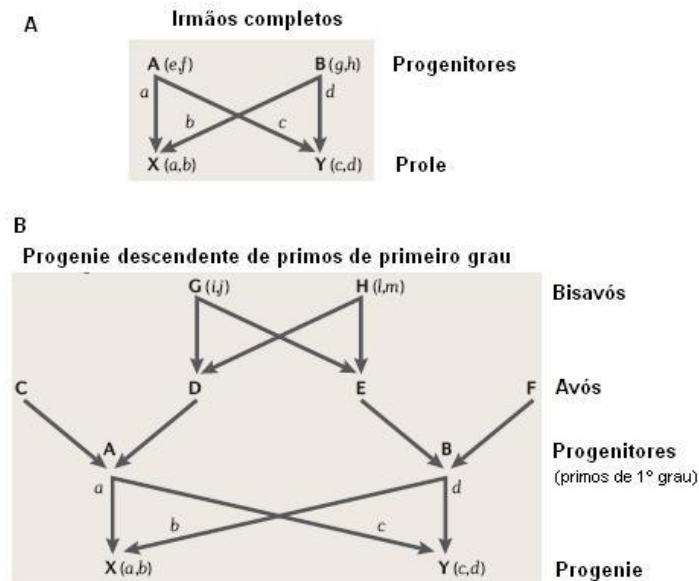


Figura 2.7. Diagrama representativo de relações de parentesco entre indivíduos (modificada de Weir et al. 2006).

A caracterização do grau de parentesco genético entre dois indivíduos baseia-se, então, na probabilidade de que os alelos que eles possuem sejam IBD, ou seu “coeficiente de coancestralidade” (LYNCH E WALSH 1998; WEIR et al., 2006). Por exemplo, na figura 2.7A, os indivíduos X e Y são irmãos completos e seus pais são A e B. O alelo (a ou b) do indivíduo X tem a mesma probabilidade de $\frac{1}{4}$ de ter descendido do mesmo alelo do progenitor (e, f, g ou h) do que um alelo (c ou d) do seu irmão Y. Essa origem comum significa que os dois alelos (um de X e outro de Y) são IBD. Portanto, o coeficiente de coancestralidade entre irmãos completos é de $\frac{1}{4}$. Existe também uma chance de $\frac{1}{2}$ de que um alelo (a) de X tenha vindo do progenitor A e uma chance de $\frac{1}{2}$ de que a descenda de um ou de outro alelo (e ou f) de A. O coeficiente de coancestralidade de progenitor-progenie é, portanto, também $\frac{1}{4}$. Podemos calcular o número de pares de alelos que quaisquer dois indivíduos compartilham: 0, 1 ou 2 (k_0, k_1 e k_2). Para o par de irmãos completos X e Y da figura 2.7A, o par de alelos a, c tem uma probabilidade de $\frac{1}{2}$ de ser IBD, independentemente do outro par de alelos, b, d . Os três eventos, nenhum, um ou os dois pares de alelos serem IBD são $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$, respectivamente. Para X, o alelo a deve ser IBD de um dos alelos do progenitor A, enquanto que o alelo b não pode ser IBD de nenhum dos alelos de A. O evento de um par de alelos IBD para o par progenitor-prole tem, então, uma probabilidade de um. Na figura 2.7B, cada um dos alelos a, b, c ou d , podem ter sido originados de qualquer um dos alelos i, j, l ou m que são portados pelos avós G e H (Fig. 2.7B), os quais são

compartilhados pelos primos de primeiro grau (A e B), dando como resultado 15 padrões distintos de IBD entre os quatro alelos. As categorias de relacionamento progenitor-prole e irmãos-completos são categorias de 1º grau (em média, os indivíduos compartilham 50% dos alelos); as categorias avós-netos, meio-irmãos e tios-sobrinhos são classificadas como de 2º grau (em média, os indivíduos compartilham 25% dos alelos); as categorias primos em 1º grau e bisavós-bisnetos consideram-se como de 3º grau (em média, os indivíduos compartilham 12.5% dos alelos) e assim por diante (BLOUIN, 2003).

A representação matemática das probabilidades de dois indivíduos compartilharem 0, 1 ou 2 alelos por identidade por descendência nos seus genótipos é conhecido como “coeficientes k ” (LYNCH E WALSH, 1998; BLOUIN, 2003). Denomine-se k_0 , k_1 e k_2 as probabilidades de compartilhar 0, 1 ou 2 alelos IBD em um determinado loco, respectivamente. Se dois indivíduos são pai-filho, k_0 será 0, k_1 será 1, e k_2 será 0. Se dois indivíduos são irmãos completos, k_0 , k_1 e k_2 serão 0,25, 0,5 e 0,25, respectivamente (ver Tabela 2.5 para mais coeficientes k). Esses coeficientes k devem somar 1.

Tabela 2.5. Lista dos coeficientes k para algumas categorias de relacionamento. k_m representa a probabilidade de dois indivíduos compartilharem m alelos por Identidade por Descendência dado um determinado relacionamento. Θ representa o Coeficiente de consangüinidade (Lynch e Walsh 1998; ver mais abaixo).

Relacionamento	k_0	k_1	k_2	$\Theta = k_1/4 + k_2/2$
Progenitor-prole	0	1	0	1/4
Irmãos-completos	0,25	0,5	0,25	1/4
Meio-irmãos	0,5	0,5	0	1/8
Não relacionados	1	0	0	0

O primeiro passo para se calcular probabilidades de IBD é expressar as probabilidades genóticas para pares de indivíduos como “probabilidades conjuntas”, em função das probabilidades alélicas (WEIR et al., 2006). A probabilidade de que dois indivíduos não relacionados e não endocruzados sejam dois homozigotos A_1A_1 é P_1^4 , enquanto que, a probabilidade de que dois irmãos-completos seja ambos homozigotos A_1A_1 é $P_1^2 (1 + P_1)^2 / 4$. Para um determinado indivíduo, os dois alelos em um loco

podem ser IBD ou não-IBD com probabilidades F e $(1 - F)$, respectivamente. Na primeira situação, os alelos IBD devem ser ambos do mesmo tipo e a chance de que sejam A_1 é a mesma de que nenhum dos dois seja desse tipo; é igual à frequência populacional desse alelo. Se dois alelos em um loco não são IBD, esses são independentes e cada um tem uma chance P_I de ser do tipo A_I . A probabilidade (Pr) de um homozigoto $A_I A_I$ é $\Pr(A_I A_I) = FP_I + (1 - F)P_I^2$ e o resultado correspondente de um heterozigoto $A_I A_2$ ($1 \neq 2$) é $\Pr(A_I A_2) = 2(1 - F)P_I P_2$ (O fator 2 permite que cada alelo seja materno ou paterno). A mesma lógica é seguida para se calcular as probabilidades conjuntas de todos os pares possíveis de genótipos relacionados, conforme determinados relacionamentos.

2.5.3 Distinção entre categorias de relacionamento

Quando não é possível determinar com absoluta certeza qual é o relacionamento entre dois indivíduos, pode-se avaliar qual é o relacionamento mais provável, conforme os genótipos observados, por meio do cálculo da “razão das verossimilhanças” entre as probabilidades de dois relacionamentos alternativos. O método do tipo máxima verossimilhança, de maneira geral, envolve o processo de se estimar um determinado parâmetro escolhendo-se os valores do mesmo que maximizam a probabilidade de um determinado dado observado. Na estimativa das probabilidades de IBD que caracterizam um relacionamento, o melhor procedimento é o de máxima verossimilhança. Nesse procedimento, as probabilidades de IBD são escolhidas para maximizar a probabilidade dos genótipos observados. A razão das verossimilhanças, ou *likelihood ratio*, representa a razão de duas probabilidades para a mesma observação (genótipos dos ninhegos amostrados dentro de um mesmo ninho), calculada sob hipóteses alternativas (relacionamentos). Esta razão se calcula dividindo-se a probabilidade do par observado de genótipos usando-se as probabilidades de identidade-por-descendência para um determinado relacionamento, pela probabilidade dos genótipos usando-se as probabilidades de identidade-por-descendência para um relacionamento alternativo. A razão da verossimilhança é uma variável contínua que pode ter qualquer valor não negativo; valores maiores suportam o relacionamento que se usou como numerador (BLOUIN, 2003). O procedimento de inferência sobre

relacionamentos genéticos tem uma natureza probabilística, pois a escolha de qual alelo um indivíduo transmitirá para a progênie é feita ao acaso, mas o uso da razão da verossimilhança permite que a maior quantidade de informação possível sobre o relacionamento seja extraída dos genótipos observados (BLOUIN, 2003).

2.5.4 Abordagens metodológicas para inferências de parentesco genético

As abordagens metodológicas baseadas em marcadores moleculares para a inferência de parentesco genético entre os indivíduos podem ser classificadas em duas categorias. A primeira utiliza um estimador de “*momentum*” para o cálculo do parentesco entre um par de indivíduos: uma quantidade contínua definida em termos de probabilidades de IBD (*e.g.*, LYNCH, 1988; QUELLER E GOODNIGHT, 1989; RITLAND, 1996; LYNH & RITLAND, 1999). Estimadores de “*momentum*” como, por exemplo, os desenvolvidos por Queller e Goodnight (1989), Ritland (1996), Lynch e Ritland (1999), e Wang (2002) têm sido os mais utilizados. A segunda categoria usa uma abordagem de verossimilhança para determinar, a partir dos genótipos, a probabilidade de um par de indivíduos se relacionarem de uma determinada forma (irmãos completos, meio-irmãos, etc.) (*e.g.* MARSHALL et al., 1998; MOUSSEAU et al., 1998; GOODNIGHT E QUELLER, 1999; THOMAS E HILL, 2000). Considerando-se as limitações dos métodos e empregando-se as devidas correções, disponíveis na maioria dos *softwares* utilizados, é possível obter-se estimativas adequadas das relações de parentesco entre indivíduos em populações naturais (BLOUIN, 2003; JONES et al., 2010).

A similaridade genética entre indivíduos tem sido estimada com base em dois métodos clássicos, as medições estatísticas, como a correlação, e as medições de IBD (QUELLER E GOODNIGHT, 1989). Duas categorias principais de estimadores de parentesco genético são atualmente utilizadas: 1) “*Métodos dos momentos*” (MM); e 2) Máxima verossimilhança (ML, das siglas em inglês de *Maximum Likelihood*), descritos pioneiramente por Thompson (1975) e utilizados para distinguir entre duas hipóteses de relacionamento.

2.5.4.1 Estimadores do tipo “*métodos dos momentos*” (*methods-of-moments, MM*)

Os estimadores de tipo MM são normalmente utilizados para calcular valores de similitude genética em termos de “probabilidades de Identidade-por-Descendência”. Queller & Goodnight (1989) foram os primeiros a desenvolverem estimadores de parentesco genético de tipo “métodos dos momentos” (MM), que podem ser aplicados a marcadores genéticos de tipo microssatélites. Esses estimadores foram posteriormente melhorados e reformulados por Ritland (1996) e Lynch e Ritland (1999). Um estudo recente de Csilléry et al. (2006) avaliou o desempenho de vários estimadores de parentesco em populações naturais e demonstrou que os estimadores de Ritland (1996), Lynch & Ritland (1999), e Queller e Goodnight (1989) tiveram seu desempenho melhor caracterizado (CSILLÉRY et al., 2006). No presente estudo, levou-se em consideração o sugerido por Csilléry e cols. (2006) e calcularam-se os estimadores de Lynch & Ritland (1999) (L&R) e Queller e Goodnight (1989) (Q&G). Os programas computacionais GENALEX (PEAKALL E SMOUSE, 2006) e KINGROUP (KONOVALOV et al., 2004) foram utilizados para o cálculo desses estimadores.

O estimador de parentesco de Lynch e Ritland (1999) pode ser descrito como:

$$\hat{r} = \frac{p_i(\delta_{jk} + \delta_{jl}) + p_j(\delta_{ik} + \delta_{il}) - 4p_i p_j}{(1 + \delta_{ij})(p_i + p_j) - 4p_i p_j}$$

considerando dois indivíduos diplóides, genotipados para quatro alelos de dois locos, sendo o indivíduo 1 $A_i A_j$ e o indivíduo 2 $A_k A_l$, se A_i e A_j são iguais $\delta_{ij} = 1$; e se A_i e A_j são diferentes $\delta_{ij} = 0$; n = número de alelos e p_i é a frequência do alelo i na população.

O estimador de Queller e Goodnight (1989) é definido utilizando-se a mesma linguagem, como:

$$\hat{r} = \frac{.5(\delta_{ik} + \delta_{jl} + \delta_{ik} + \delta_{il}) - p_i - p_j}{1 + \delta_{ij} - p_i - p_j}$$

Queller e Goodnight (1989) sugeriram para calcular o estimador multilocos que pode-se somar os numeradores e os denominadores de cada um de maneira separada e depois dividir um pelo outro.

A significância das estimativas de parentesco genético (obtidas pelos estimadores de Q&G e L&R) pode ser averiguada a partir de uma distribuição nula (BELKHIR et al., 2002) e calculando-se os valores P . O procedimento de amostragem de Guo e Thompson (1992) é utilizado para gerar os pares da hipótese-

nula, com escolha casual de alelos, sem reposição, do conjunto de alelos presentes na amostra populacional. Foi demonstrado que com 17.000 pares gerados como hipótese nula os valores de P podem ser obtidos com uma precisão de 0,01.

Estimativas negativas de r podem ser entendidas como uma medida de quão mais baixa é a probabilidade de coalescência relativa de um par de indivíduos, com relação à probabilidade média de todos os pares considerados da população de referência, ou seja, esses indivíduos apresentam menor número de alelos idênticos-por-descendência do que o esperado (ROUSSET, 2002). Esta interpretação se aplica às estimativas negativas obtidas pelo estimador de parentesco de Q&G (1989) e de L&R (1999) e isso os torna não-enviesados (CSILLÉRY et al 2006). Valores de parentesco genético negativos possuem um significado biológico bastante interessante: i) quanto mais negativo o valor de r , mais certeza pode-se ter de que os indivíduos que estamos avaliando não estão relacionados; ii) esses valores podem ajudar a detectar numa população os indivíduos que são migrantes ou que carregam alelos novos (KONOVALOV E HEG, 2008).

2.5.4.2 Estimadores de tipo “máxima verossimilhança” (*maximum likelihood, ML*)

Thompson (1975) foi o primeiro a desenvolver estimadores de parentesco genético de tipo “máxima verossimilhança” e, a partir do seu trabalho, novos estimadores foram descritos. O programa ML-RELATE (KALINOWSKI et al., 2006), utilizado no presente estudo, utiliza os coeficientes k para descrever as relações genealógicas entre os indivíduos. Podem-se representar os coeficientes k que representam as relações genealógicas entre dois indivíduos como pontos em um gráfico (Fig. 2.8).

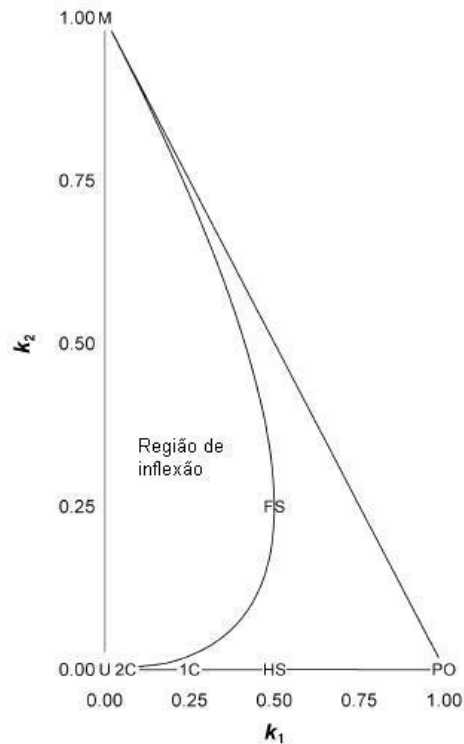


Figura 2.8. Coeficientes k de algumas categorias de relacionamento (U: não-relacionados; 1C: primos em primeiro grau; 2C: primos em segundo grau; FS: irmãos-completos; HS: meio-irmãos; PO: pogenitor-prole; M: gêmeos monozigóticos). A figura está construída de maneira que o parentesco aumenta à direita e ao extremo superior do gráfico. Figura adaptada de Kalinowski et al. (2006).

Se os indivíduos não forem endogâmicos, há uma relação entre os coeficientes k e o seu parentesco genético (r), de maneira que:

$$r = \frac{1}{2}k_1 + k_2. \quad (1)$$

O relacionamento entre dois indivíduos pode ser estimado a partir de dados genéticos pelo cálculo da verossimilhança dos pontos no *espaço-k* (LYNCH E WALSH, 1998; BLOUIN, 2003). Chame-se \mathbf{K} ao vetor representado pelos três coeficientes k , $\mathbf{K} = \{k_0, k_1, k_2\}$. Por definição, a verossimilhança de \mathbf{K} , $[L(\mathbf{K})]$ é igual à probabilidade de se observar determinados dados genéticos presentes em um indivíduo, conforme o relacionamento \mathbf{K} (KALINOWSKI et al., 2006). A estimativa de máxima verossimilhança do relacionamento entre dois indivíduos é realizada buscando-se em todo o espaço paramétrico de \mathbf{K} aqueles valores que maximizam $L(\mathbf{K})$ e inserindo esses valores na equação (1). A “rotina de otimização simples” é boa para se realizar essa busca (KALINOWSKI et al., 2006). Como o espaço paramétrico de \mathbf{K} pode ter vários

picos de várias “alturas”, sempre é melhor começar a busca partindo de vários pontos, o que é feito pelo programa ML-RELATE, o qual insere diferentes valores de \mathbf{K} na equação da verossimilhança (cada um correspondente a um relacionamento distinto) e determina qual é o valor que maximiza o resultado (KALINOWSKI et al., 2006). De maneira geral, as categorias de relacionamento que se encontram perto umas das outras no *espaço-k* são mais difíceis de serem diferenciadas.

No presente estudo, o programa ML-RELATE (KALINOWSKI et al 2006) foi utilizado para estimativas de parentesco, supondo a ocorrência de alelos nulos ou não na amostra e realizando-se a correspondente correção. Este procedimento foi empregado com o intuito de avaliar e comparar as estimativas calculadas tanto na presença como ausência dos alelos nulos

2.5.5 Prova de hipóteses

Outros procedimentos para se investigar o relacionamento entre dois indivíduos, complementares ao cálculo dos valores de parentesco genético par-a-par (BLOUIN, 2003), são: *i*) distinguir, mediante um procedimento estatístico, entre duas hipóteses de relacionamento *a priori*; e *ii*) determinar, estatisticamente, quais relacionamentos estão de acordo com os dados genotípicos observados nos indivíduos analisados (intervalos de confiança). O programa computacional ML-RELATE (KALINOWSKI et al., 2006) oferece esses dois testes. A primeira prova pode ser ilustrada com um exemplo: dois ninhegos foram amostrados dentro de um mesmo ninho e se supõe que sejam irmãos-completos (ou seja, que um mesmo casal seja o genitor de ambos). Genótipos em locos múltiplos são obtidos para cada um dos indivíduos e a análise pelo programa ML-RELATE indica que eles são irmãos-completos, mas a verossimilhança de um relacionamento de tipo meio-irmãos é muito semelhante à obtida para irmãos-completos. Neste caso, pode-se utilizar uma prova estatística para se decidir qual dos dois relacionamentos é o “verdadeiro”: chame-se de $\mathbf{K}_{presuposto}$ à representação dos coeficientes k para o relacionamento pressuposto pelas observações ecológicas (no caso, o de irmãos-completos) e $\mathbf{K}_{alternativo}$ à representação dos coeficientes k para o relacionamento que resultou em uma verossimilhança um pouco menor daquela do

primeiro relacionamento (no caso, a de serem meio-irmãos), define-se a prova estatística Λ como:

$$\Lambda = \text{Ln} [L(\mathbf{K}_{\text{presuposto}}) / L(\mathbf{K}_{\text{alternativo}})] \quad (\text{equação 2 em Kalinowski et al., 2006}) \quad (2)$$

A distribuição amostral de Λ é obtida a partir de simulações de genótipos de pares de indivíduos relacionados segundo as duas alternativas e calcula-se Λ para cada par simulado (no presente estudo foram simulados 1.000 pares). Essas simulações são realizadas em duas etapas: na primeira, o número de alelos idênticos por descendência é obtido de \mathbf{K} e, na segunda, os genótipos são escolhidos dado um determinado \mathbf{K} . Esse procedimento é realizado várias vezes (no presente estudo foram 10.000 vezes) e registra-se a quantidade de eventos em que as simulações chegaram a um valor Λ igual ou maior do que o observado – esse número representa o valor P da prova estatística. Caso esse valor de P seja pequeno, a hipótese alternativa é rejeitada. Caso ele seja grande, ambas as hipóteses (a pressuposta e alternativa) explicam os dados genéticos analisados (KALINOWSKI et al., 2006).

Em muitos casos, o pesquisador não terá um relacionamento pressuposto para avaliar contra uma determinada alternativa. Nesses casos, será útil se ter uma listagem de todos os relacionamentos que estão de acordo com os dados genéticos estudados (KALINOWSKI et al., 2006). O programa ML-RELATE oferece também uma maneira de se obter significância estatística das razões da verossimilhança (*likelihood ratios*) e utiliza simulações para obter a distribuição desse parâmetro. Chame-se \mathbf{K}_{null} ao relacionamento possível entre dois indivíduos que será posto a prova, \mathbf{K}_{ML} a estimativa de \mathbf{K} entre dois indivíduos, obtida por máxima verossimilhança, Λ' define-se como:

$$\text{Ln} [L(\mathbf{K}_{ML}) / L(\mathbf{K}_{null})] \quad (\text{equação 3 em Kalinowski et al. 2006}) \quad (3)$$

A significância de Λ' é obtida através de simulações de pares de genótipos com a hipótese nula e calcula-se Λ' para cada um dos pares simulados. Isso é realizado várias vezes (o número de vezes é escolhido pelo pesquisador) e registra-se a quantidade de eventos em que as simulações chegaram a um valor Λ' igual ou maior ao observado, esse número representa o valor P da prova estatística. Caso esse valor de P seja pequeno, a hipótese nula é rejeitada. Caso ele seja grande, a hipótese nula não é rejeitada e esse relacionamento é incluído na lista dos que estão de acordo com os dados genéticos analisados (KALINOWSKI et al., 2006). Esse procedimento repete-se com todos os relacionamentos de interesse.

De maneira análoga ao ML-RELATE, o programa KINGROUP (KONOVALOV et al., 2004), realiza uma análise de tipo “máxima verossimilhança” para calcular a verossimilhança de um determinado par de indivíduos estar relacionado segundo uma hipótese determinada pelo pesquisador (hipótese primária). Testes podem ser feitos, através de simulações, para comparar a significância dessa relação de parentesco com a significância da hipótese alternativa (também especificada pelo pesquisador). Esta abordagem é poderosa, flexível e permite que os indivíduos sejam classificados em categorias de relacionamento ainda que um baixo número de marcadores seja utilizado (HENSHAW et al., 2000; ORTEGA et al., 2003). A abordagem utilizada no programa KINGROUP baseia-se na descrita por Goodnight e Queller (1999) para se distinguir entre hipóteses diferentes de relacionamento entre dois indivíduos, a partir de dados de marcadores moleculares co-dominantes. Este método calcula a probabilidade de dois indivíduos compartilharem alelos por “identidade-por-descendência”, dada uma determinada hipótese de relacionamento (*Likelihood of Odds*, LOD). Esse LOD é sempre expresso em termos de *LOD ratio*, ou seja, a razão entre o LOD de uma hipótese primária e o LOD de uma hipótese alternativa, como medida da significância estatística de cada uma das hipóteses. Ambas as hipóteses são especificadas pelo pesquisador, com base nas informações ecológicas disponíveis. Um valor alto da razão *LOD* favorece a hipótese primária, enquanto que um valor pequeno não lhe dá suporte. Como a determinação da significância estatística dos valores da razão *LOD* é um processo difícil, o método de Goodnight e Queller (1999) baseia-se em simulações.

O processo de simulação começa escolhendo um genótipo individual ao acaso (X) e utiliza as frequências alélicas do conjunto de dados para calcular a probabilidade do indivíduo apresentar um determinado alelo. Em seguida, a simulação determina o genótipo do indivíduo Y, utilizando as frequências alélicas populacionais e segundo um relacionamento com o indivíduo X definido pelo pesquisador (por exemplo, irmãos completos). O programa KINGROUP realiza esse processo quantas vezes o pesquisador determine e sempre levando em conta o relacionamento definido como hipótese primária. O valor da razão *LOD* que exclua 95% desses pares assim criados corresponderá ao nível de significância de $P_\alpha = 0.05$, e esses valores serão comparados com os valores de *P* calculados para cada par observado na nossa amostra (GOODNIGHT E QUELLER, 1999). O poder deste método depende, por um lado, das

categorias de relacionamentos que se pretende distinguir e, por outro, do número de locos analisados. Algumas categorias de relacionamento são fáceis de serem distinguidas com poucos locos (GOODNIGHT E QUELLER, 1999). De acordo com Goodnight e Queller (ver tabela 3 em GOODNIGHT E QUELLER, 1999), somente dois locos são necessários para aceitar corretamente 50% dos pares relacionados pela hipótese primária, com um nível de significância de $P_\alpha = 0.05$, quando a comparação hipótese primária/hipótese alternativa corresponde a irmãos-completos/não-relacionados.

No presente estudo, os programas KINGROUP (KONOVALOV et al., 2004) e ML-RELATE (KALINOWSKI et al., 2006) foram utilizados para realizar as provas de hipóteses da seguinte maneira: uma primeira prova foi realizada considerando como hipótese primária (H_0) a existência de um parentesco de tipo “irmãos-completos” entre os ninhos amostrados dentro de um mesmo ninho, e definindo como hipótese alternativa (H_1) o “não-relacionamento”. Nos casos em que as primeiras análises de ML realizadas pelo programa ML-RELATE indicaram uma categoria de relacionamento como mais provável entre um determinado par de indivíduos diferente de irmãos-completos, as provas de hipótese foram realizadas definindo aquela categoria como hipótese primária. Todas as provas foram conduzidas com 10.000 permutações de genótipos/relacionamento.

2.5.6 Análise do desempenho dos estimadores de parentesco genético

Uma das características mais aparentes dos estimadores de parentesco é a sua grande variância estatística. Isto acontece porque muitos estimadores podem ter valores “não-permitidos” (ou seja, biologicamente não-significativos), como os valores maiores que um, ou negativos. Para forçá-los a entrar na categoria dos valores “permitidos”, deve-se introduzir um viés estatístico, geralmente na direção positiva (RITLAND, 2000). O desejável é que os estimadores de parentesco genético meçam a variância real no parentesco, resultado das várias categorias de relacionamento presentes ao mesmo tempo numa dada amostra (RITLAND, 2000; RUSSELLO E AMATO, 2004). Existe uma maneira de se calcular a variância real presente na amostra, utilizando um procedimento baseado na Análise de Variância simples (ANOVA), com dados de pelo

menos dois marcadores (RITLAND, 2000). Este método se baseia na independência estatística de estimativas realizadas com diferentes marcadores (por exemplo, o produto das estimativas realizadas com base em dois marcadores diferentes é uma estimativa não-enviesada de r). Deve-se chamar a atenção para o fato de que a variância é um parâmetro populacional e não individual e por isso têm menos erro estatístico do que a estimativa de parentesco genético par-a-par (RITLAND, 2000). Neste estudo, para calcular as variâncias de amostragem do estimador de parentesco genético de Queller e Goodnight (1989) e de Lynch e Ritland (1999), foi utilizada uma abordagem por simulação, de acordo com o sugerido por Van de Casteele e cols. (2001). O programa KINGROUP (KONOVALOV et al., 2004) foi empregado para gerar, ao acaso, genótipos de 1.000 pares de indivíduos não-relacionados (UR), 1.000 pares de meio-irmãos (HS) e 1.000 pares de irmãos completos (FS). Os dados de entrada oferecidos ao programa computacional para gerar esses genótipos foram: número de locos, frequências alélicas populacionais de cada loco e número de indivíduos a serem gerados. As frequências alélicas populacionais foram aquelas calculadas com base nos conjuntos de indivíduos apresentados na tabela 2.4, para cada espécie. Os valores médios de parentesco genético (r) foram calculados para cada um dos 1.000 pares de cada categoria de relacionamento criados pelo programa computacional e foram comparados com os valores teóricos esperados para cada categoria (UR: 0; HS: 0,25; FS: 0,5), para se estimar o viés do estimador empregado. Testes- t de duas caudas foram utilizados para se avaliar estatisticamente a significância do viés. A variância ao redor da média teórica esperada para cada categoria de relacionamento foi estabelecida como correspondente à variância apresentada por cada estimador. As análises estatísticas foram realizadas no programa BIOSTAT (AYRES et al., 2003).

O programa iREL v1.0 (GONÇALVES DA SILVA E RUSSELLO, 2009), disponível em <http://www.gentools.ecgl.ok.ubc.ca:8080/webMathematica/irel/irel.html>, calculou, com base nas frequências alélicas populacionais oferecidas pelo pesquisador, as proporções de erro teóricas esperadas na classificação de pares de indivíduos, como as frações erroneamente classificadas de 1.000 pares de UR, FS e HS gerados ao acaso pelo programa. As taxas de erro observadas na classificação do conjunto real de dados (ninhegos das três espécies estudadas, amostrados dentro dos mesmos ninhos), foram calculadas como a percentagem de pares de ninhegos nos quais houve discordância na

categoria de relacionamento indicada pelos diferentes métodos empregados (ver seção 2.5.6). Também foi calculada, com base em simulações, a percentagem da variância real nos relacionamentos representada pelos diferentes estimadores de parentesco genético, usando um cenário com 80% de irmãos completos, 10% de meio-irmãos e 10% de não-relacionados (cenário I em RUSSELLO E AMATO, 2004). Esse cenário foi escolhido, pois está mais de acordo com o padrão de parentesco esperado na nossa amostra, assumindo monogamia genética entre os adultos das espécies estudadas. O programa IREL v1.0 auxiliou neste último cálculo.

Como os estimadores de parentesco se baseiam numa amostra populacional para comparar os alelos do par de indivíduos analisados com os alelos da população, é ideal que a estimativa das frequências alélicas populacionais seja calculada com base numa amostra grande, e que não inclua aos genótipos do par de indivíduos que estão sendo avaliados para parentesco (KONOVALOV E HEG, 2008). Neste estudo calcularam-se os valores de parentesco genético par-a-par para os ninhegos amostrados nos mesmos ninhos colocando no arquivo de entrada do programa KINGROUP, as frequências alélicas populacionais calculadas com base nas amostras mencionadas na tabela 2.4. De qualquer maneira, as análises realizadas com a opção “bias correction”, que tira do cálculo das frequências alélicas os indivíduos que estão sendo avaliados para parentesco, não mudou nossas inferências.

2.5.7 Reconstrução de relacionamentos em ausência de informação parental

Quando a informação genética dos progenitores não se encontra disponível para contrastá-la com a da progênie, podem ser utilizados métodos de agrupamento de indivíduos segundo o seu grau de relacionamento (JONES et al., 2010). Neste estudo foram empregados dois programas computacionais baseados em abordagens diferentes para agrupar ninhegos com base nos seus fenótipos em locos múltiplos.

Uma das ferramentas estatísticas empregadas foi desenvolvida por Smith (2001) e Herbinger et al. (2006), implementada no programa PEDIGREE 2.2 (disponível em: <http://herbinger.biology.dal.ca:5080/Pedigree/>). Este programa divide os indivíduos em categorias de relacionamento, calculando primeiramente as razões de verossimilhança (LR, *likelihood ratios*) para cada par de indivíduos, considerando-os

irmãos completos versus não relacionados, segundo os seus fenótipos em locos múltiplos. Em seguida, o programa usa esses LR para calcular um valor (*score*) associado com uma determinada partição, para cada par de indivíduos presente nesse grupo (partição). As partições são geradas de maneira tal que os *scores* sejam maximizados. O programa constrói as partições usando um processo do tipo Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) e encontra a partição que maximiza todos os *scores*. Este método cria, primeiramente, uma partição e depois vai avaliando, um por um, pares de indivíduos para verificar se poderiam ser colocados dentro da mesma partição gerada originalmente. Neste estudo, foram realizadas 10 MCMC diferentes com os mesmos parâmetros, para minimizar a variação possível entre processos. Os parâmetros oferecidos pelo usuário ao programa foram: 100.000 iterações; “full-sib constraint”, ou seja, a coleção de génotipos em cada grupo deve ser estritamente compatível com as leis da herança de Mendel e o produto de um acasalamento entre dois indivíduos; uma temperatura inicial de 10 (que define a velocidade na qual o algoritmo “percorre” o espaço de amostragem). Quanto maior a temperatura, maior a probabilidade de que o algoritmo não fique “preso” num máximo local, mas também se corre o risco de que o algoritmo nunca chegue ao máximo absoluto. Uma temperatura de 10 foi recomendada pelos autores do programa como sendo boa para a maioria das situações. Uma temperatura de 30, também utilizada na nossa análise, não mudou os resultados. Usou-se um “peso” 2, o que permite que possíveis meio-irmãos incluídos na amostra (relacionados em segundo grau) possam ser agrupados junto com os de primeiro grau (irmãos completos). O peso 2, utilizado em conjunto com a “full-sib constraint” minimiza o erro de se agrupar indivíduos não-relacionados (manual de usuário do PEDIGREE). O programa estabeleceu-se a “semente” (valor de partida para a Cadeia de Markov) ao acaso. Também foi utilizado um peso 1, para se maximizar o agrupamento de somente irmãos-completos.

O programa PEDIGREE 2.2 pode avaliar a significância estatística das partições. Para tal fim é calculado um valor, chamado de “coesão”, que é a média aritmética do logaritmo decimal dos LRs usados na reconstrução do grupo, considerando-se todos os pares de indivíduos do grupo. Um valor alto de coesão indica que, em média, esses indivíduos são mais fortemente relacionados dentro do grupo do que o resto dos pares. Para se estabelecer se os indivíduos não tenham sido agrupados por PEDIGREE 2.2 somente como consequência de um possível artefato da análise, o

programa oferece uma abordagem baseada em re-amostragem dos dados, de maneira tal de tornar randômico, mediante permutação da coleção de genótipos, o conjunto original de dados. Cada permutação resulta num novo conjunto de dados com exatamente o mesmo número de indivíduos e as mesmas frequências alélicas do que a nossa amostra original, mas no novo conjunto, todos os indivíduos são não-relacionados ao restante dos indivíduos. Em outras palavras, as similaridades genotípicas do novo conjunto de dados vão refletir, agora, a identidade-ao-acaso (*identity by chance*) e não a IBD. Neste estudo foram gerados 1.000 conjuntos de dados “randomizados” e foram aplicados os mesmos parâmetros de análise usados no nosso conjunto de dados originais. Isto permitiu gerar uma distribuição nula dos atributos de cada partição (ou seja, do grau médio de relacionamento no conjunto de dado) a partir da realização de inferências estatísticas da partição “real” (empírica).

A outra abordagem foi desenvolvida por Wang (2004) e Wang e Sancture (2009) e é empregada no programa COLONY (JONES E WANG, 2009). Este programa foi usado para se reconstruir grupos de ninhegos relacionados em primeiro grau (irmãos completos) e em segundo grau (meio-irmãos). Esse método utiliza uma abordagem baseada na verossimilhança da genealogia inteira e aplica um algoritmo de tipo “simulated annealing” para procurar a configuração com máxima verossimilhança (WANG J., manual de usuário do COLONY). O programa usa um método similar à de MCMC, mas com um melhor controle da “aceitação” da configuração, baseado na “temperatura”. Partindo de uma configuração inicial na qual todos os indivíduos são não-relacionados, gera-se uma mudança na configuração para se criar configurações novas. As verossimilhanças da nova e da antiga configuração são calculadas e comparadas para se determinar se a nova configuração é aceita ou rejeitada (se a verossimilhança for maior). Calcula-se uma taxa de “aceitação” da configuração com base na temperatura, nos valores de verossimilhança antigo e novo e comparam-se com o valor gerado de uma distribuição nula. Se o valor nulo for menor do que a taxa de aceitação, a nova configuração se mantém, embora seja inferior à antiga. O programa faz isso para evitar ficar “preso” num máximo local. Quando os marcadores moleculares utilizados na análise não são muito informativos, recomenda-se realizar corridas diferentes do programa, sob os mesmos parâmetros, mas com uma “semente” diferente e identificar os agrupamentos de indivíduos consistentemente recuperados em todas as corridas. Esses grupos representam relacionamentos “confiáveis” (WANG J., manual

de usuário do COLONY). Neste estudo, foram realizadas 10 réplicas de 10 corridas do programa, com os seguintes parâmetros: machos e fêmeas monogâmicos, frequências alélicas calculadas pelo usuário, comprimento médio da corrida, indivíduos diplóides, tamanho das famílias não limitado, marcadores co-dominantes, e taxas de erro de genotipagem de 0.001.

2.5.8 Classificação dos ninhegos em categorias de relacionamento

A classificação final dos pares de ninhegos analisados neste estudo em categorias de relacionamento foi obtida segundo um procedimento de oito passos, baseado na concordância entre os resultados dos vários programas e dos procedimentos empregados (Figura 2.9). Primeiramente, foram calculados os valores de r com o estimador que melhor se desempenhou em cada situação, de acordo com as simulações previamente desenvolvidas. Em seguida, foram avaliados os valores de r e, com base neles, empregou-se o método proposto por Blouin et al. (1996). Esse método baseia-se em “valores de corte” (*cut-off values*) para classificar um par de indivíduos como relacionados de acordo com certa categoria de relacionamento. Esses valores de corte são determinados considerando-se as curvas de distribuição dos valores de r simulados obtidos a partir das frequências alélicas da nossa amostra para cada categoria de relacionamento e que podem ser diferentes dos esperados em populações ideais (BLOUIN et al., 1996). Esses valores de corte são estabelecidos como os pontos médios entre as médias das curvas de distribuição dos valores de parentesco genético par-a-par para pares de indivíduos simulados de acordo com as categorias de relacionamento (UR, HS e FS; BLOUIN et al., 1996). Para estabelecer os valores de corte das nossas amostras, foram gerados, com base nas frequências alélicas populacionais calculadas como descrito anteriormente, 1.000 pares de indivíduos UR, 1.000 pares de HS e 1.000 pares de FS. Os valores de parentesco genético calculados para cada um dos pares embasaram as curvas de distribuição desses valores, nas quais foram determinados os pontos médios entre as médias de cada categoria. Para isso foi empregado o programa computacional iREL v1.0 (GONÇALVES DA SILVA E RUSSELLO, 2009). Uma vez obtidos os valores de corte, comparou-se cada valor de r para todos os pares de ninhegos analisados e classificaram-se os pares segundo esses valores. Em seguida, foram

realizadas estimativas de máxima-verossimilhança dos relacionamentos entre os indivíduos de cada par de ninhegos analisados. A seguir, compararam-se os relacionamentos indicados pelos dois métodos (valores de corte e máxima verossimilhança) e se verificou se havia concordância entre eles. Em caso de concordância, a análise prosseguia com o desenvolvimento de provas de hipóteses para se verificar a significância do relacionamento indicado com relação às alternativas possíveis. Caso o relacionamento indicado obtivesse suporte estatístico, a análise prosseguia com o agrupamento dos indivíduos segundo o seu grau de relacionamento genético (utilizando dois métodos “filosoficamente” diferentes, ver seção anterior). Os resultados dessas análises foram analisados posteriormente para se identificar os agrupamentos de indivíduos que recuperassem os ninhegos amostrados dentro dos mesmos ninhos. Esse procedimento de oito passos foi aplicado a todos os pares de ninhegos de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande coletados nas colônias reprodutivas (Tabela 2.6).

2.5.9 Atribuição de paternidade e maternidade em famílias de colhereiro

As análises de atribuição de paternidade e maternidade em famílias de colhereiro criadas em cativeiro foram realizadas pelo programa CERVUS v3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Esse programa aplica uma abordagem de máxima verossimilhança para encontrar, num conjunto de progenitores candidatos, o mais provável de ser o pai verdadeiro de um determinado ninhego. A partir de simulações, o programa calcula a distribuição do estatístico Delta, a diferença das razões das probabilidades de dois progenitores candidatos serem o progenitor verdadeiro. O valor Delta é utilizado para estabelecer o nível de confiança na atribuição de paternidade (ou maternidade) para cada candidato. O pesquisador fornece ao programa: as frequências alélicas populacionais, o número de possíveis candidatos, e a proporção de candidatos amostrados. Na nossa análise, houve casos em que um dos progenitores (fêmeas ou machos) estava registrado nos *studbooks* dos zoológicos. Nesses casos, o outro progenitor foi “procurado” pelo programa CERVUS, levando em conta os genótipos da prole e do pai “conhecido”. Nessa análise foram considerados como candidatos os animais machos ou fêmeas que se encontravam no mesmo zoológico e que tinham ao menos três anos a mais de idade do que os filhotes analisados (informação disponível

nos *studbooks*; SAWYER, 2002). Foram usados os seguintes parâmetros de configuração do programa CERVUS: 10.000 simulações, 84% dos candidatos amostrados, 99% de genótipos disponíveis e 1% de erro de genotipagem. A maternidade e/ou paternidade foi atribuída com uma confiança de 95%, levando em conta o valor Delta. Nos casos em que nenhum pai estava registrado no *studbook* do zoológico como sendo responsável por determinado ninhego, o programa CERVUS foi usado para identificar o par de progenitores mais provável.

Tabela 2.6. Ninhegos, pares e ninhos de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande amostrados no Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, Brasil.

Cabeça-seca			
<i>Colônia</i>	<i>No. de ninhegos</i>	<i>No. de pares</i>	<i>No. de ninhos</i>
Pantanal			
Fazenda Ipiranga	13	8	6
Porto da Fazenda	24	12	12
Tucum	28	14	14
Presidente	18	9	9
Total	83	43	41
Amapá			
Macacoari	109	94	42
Fazenda Zelândia	12	6	6
Fazenda Alegria	7	5	3
Ninhal Se Cria	68	46	30
Total	196	151	81
Colhereiro			
Pantanal			
Porto da Fazenda	15	9	7
Praialzinho	22	14	10
Total	37	23	17
Amapá			
Fazenda Zelândia	23	16	10
Ninhal Se Cria	50	40	20
Total	73	56	30
Rio Grande do Sul			
Banhado do Taim	83	68	35
Garça-branca-grande			
Pantanal			
Tucum	10	5	5
Porto da Fazenda	25	14	12
Praialzinho	30	15	15
Total	65	34	32
Rio Grande do Sul			

Barra do Ribeiro	46	35	21
------------------	----	----	----

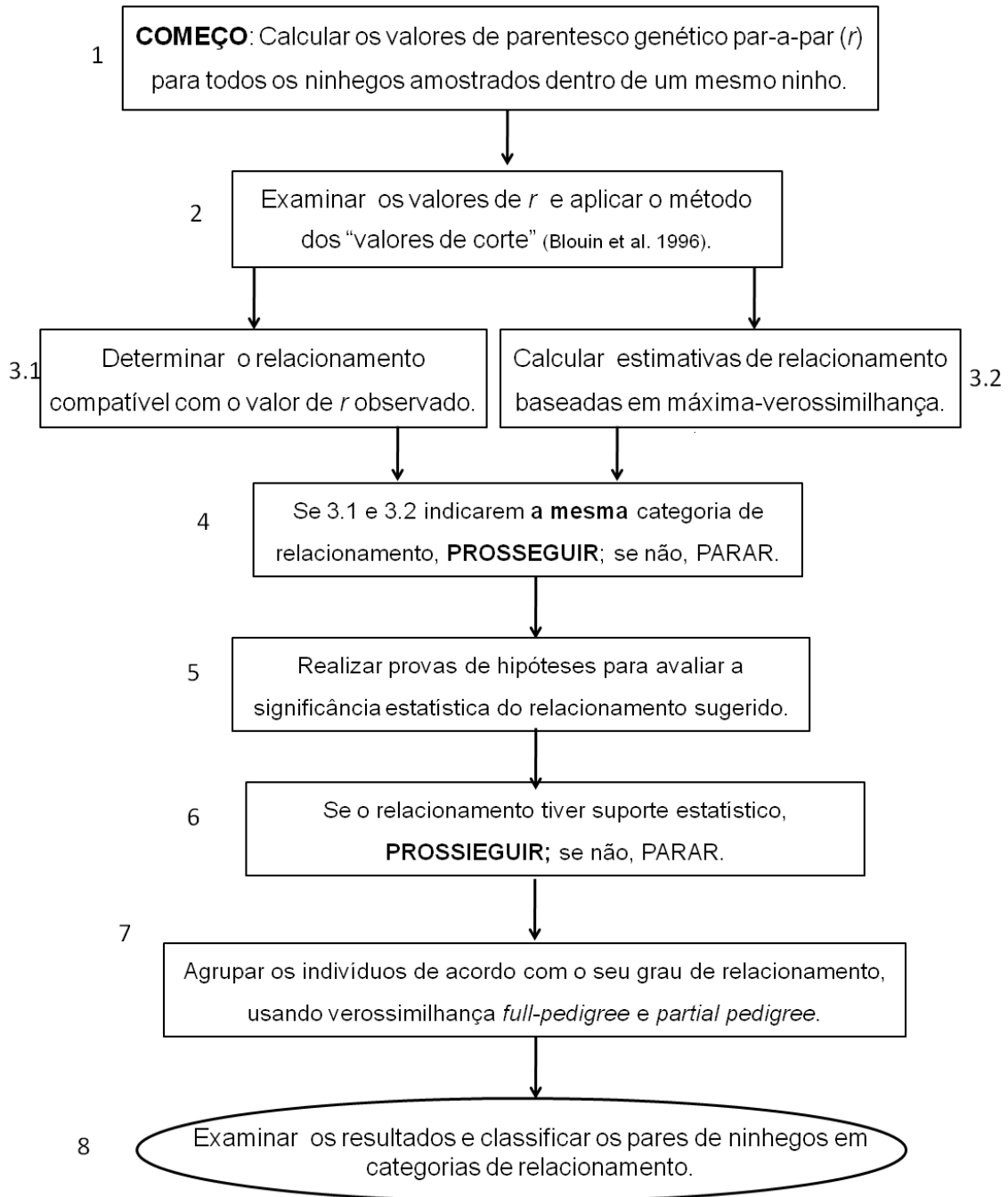


Figura 2.9. Diagrama de fluxo do procedimento usado para classificar pares de ninhegos em categorias de relacionamento, com base nos genótipos em locos nucleares múltiplos. Esse procedimento foi usado com ninhegos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande, amostrados dentro dos mesmos ninhos.

2.5.10 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional e detecção de processos demográficos em populações de garça-branca-grande

A presença de alelos nulos foi avaliada usando o programa MICROCHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERNHOUT et al., 2004). O número de alelos por loco (A), as frequências alélicas, a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram estimadas usando o programa GENALEX 6.3 (PEAKALL E SMOUSE, 2006). Uma estimativa da riqueza alélica (A_R) corrigida para tamanho populacional, baseada num método de rarefação, foi calculada usando FSTAT (GOUDET, 1995). Testes para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizados usando o método baseado em Cadeias de Markov de Guo e Thompson (1992) no programa GENEPOP 3.4 (RAYMOND E ROUSSET, 1995) com 1.000 dememorizações, 1.000 corridas e 10.000 iterações. Testes de desequilíbrio de ligação (LD) foram conduzidos em GENEPOP 3.4. Correções para testes múltiplos foram feitas seguindo o procedimento de Bonferroni (k) (RICE, 1989). Uma Análise da Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) em ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005) foi realizada para quantificar a distribuição hierárquica da variabilidade genética dentro e entre as colônias e as regiões. Valores de F_{ST} (WEIR E COCKERHAM, 1984) foram obtidos, como medida da divergência genética, usando o programa FSTAT (GOUDET, 1995). O valor de P crítico para significância estatística dos F_{ST} foi corrigido para comparações múltiplas, pelo procedimento de Bonferroni (RICE, 1989). Foram realizados, também, testes de atribuição de indivíduos a potenciais populações de origem usando a abordagem Bayesiana de Rannala e Mountain (1997) em GENECLASS 2.0. (PIRY et al., 2004). Foi demonstrado que esse método se comporta de melhor maneira que métodos baseados em frequência ou distância (CORNUET et al., 1999; GÓMEZ-UCHIDA et al., 2009). Para essa análise, foram consideradas, primeiramente, as colônias individuais como sendo populações fonte e, numa segunda análise, consideramos as regiões (Pantanal e Rio Grande do Sul) como sendo unidades populacionais. O raciocínio por trás deste método foi avaliar a existência de um grau leve de estruturação populacional entre regiões.

O isolamento pela distância foi avaliado usando a regressão linear *Reduced Major Axis* (RMA) entre a distância genética e a distância geográfica (teste de Mantel), no programa IBDWS 3.16 (JENSEN et al., 2005). A distância genética entre

cada par de colônias foi expressa como $F_{ST}/(1-F_{ST})$ e a distância geográfica foi calculada no programa *on-line* <http://www.go.ednet.ns.ca/~larry/bsc/jslatlng.html>. A distância geográfica expressou-se em valores logarítmicos, para ser aplicada no modelo de espaço bidimensional (ROUSSET, 1997). Já que a regressão do teste de Mantel contém comparações múltiplas, se realizaram 1.000 *randomizações* para calcular a sua significância. Os intervalos de confiança de 99% foram estimados com 1.000 permutações de pares independentes de populações.

A diferenciação genética entre colônias foi investigada usando uma análise Bayesiana no programa STRUCTURE 2.2.2 (PRITCHARD et al., 2000). A maioria dos parâmetros foi configurada de acordo com seus valores *default*, segundo o sugerido pelos autores do programa. Foi escolhido um modelo de mistura das populações, e a opção de frequências alélicas correlacionadas, pois essa configuração é considerada adequada nos casos em que pode haver estruturação populacional leve (FALUSH et al., 2003; EVANNO et al., 2005). O grau de mistura entre as colônias, α , foi inferido a partir dos dados e do parâmetro da distribuição das frequências alélicas, λ , foi 1. Foram estabelecidos períodos de “aquecimento” da Cadeia de Markov de 150.000, mas corridas do programa com períodos maiores de “aquecimento” não mudaram os resultados. Testou-se um intervalo possível de K s desde 1 até 10 (o número total de colônias amostradas). Para cada grupo de dados, correu-se o programa 20 vezes, com o objetivo de inferir a verossimilhança dos valores de K . Os valores logarítmicos da verossimilhança foram obtidos de $K = 1$ até $K = 10$, com cinco *iterações* entre cada valor de K . Para identificar o valor mais provável de K a partir das simulações, usamos o método de Pritchard et al. (2000) de identificação da maior probabilidade posterior dos dados e também analisamos a assimetria na probabilidade individual de pertencimento a cada grupo (gráficos de valores de Q) para diferentes K .

Foi averiguada a presença de sinais genéticos de uma possível redução do tamanho populacional em todas as colônias usando tanto a abordagem desenvolvida por Cornuet e Luikart (1996) em BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al. 1999), quanto calculando o índice de Garza e Williamson (2001). Com BOTTLENECK assumiu-se um modelo misto de mutação de microssatélites (TPM) (com 70% de mutações de passo simples e 30% de mutações de múltiplos passos), pois esse modelo mutacional poderia ser mais conservativo (LUIKART E CORNUET, 1998; GÓMEZ-UCHIDA et al., 2009). Também examinamos a distribuição das frequências alélicas em cada colônia

para detectar possíveis desvios do esperado sob equilíbrio entre mutação-deriva (em populações estáveis espera-se uma distribuição com forma de “L”, LUIKART et al., 1997). O índice de Garza-Williamson (valor M) foi calculado em ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). Essa estatística mostra-se sensível às reduções populacionais, pois durante um evento de redução demográfica o número de alelos é usualmente mais reduzido que o intervalo entre tamanhos alélicos. O valor de M é determinado comparando-o com uma distribuição de valores de M calculada de populações teóricas sob equilíbrio mutação-deriva. Supõe-se que esse índice seja bem pequeno em populações que passaram por um evento de redução demográfica e que esteja perto de 1 em populações estáveis (GARZA E WILLIAMSON, 2001).

Capítulo 3

Resultados

3.1 Parâmetros genéticos populacionais para subsidiar análise de parentesco em cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande

Para subsidiar as análises de parentesco, foram estimados parâmetros genético-populacionais nas amostras de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande. A análise no programa MICROCHECKER não detectou erros na nomenclatura dos alelos em nenhuma das espécies estudadas.

As populações de cabeça-seca do Estado do Amapá e do Pantanal apresentaram 27 alelos nos nove locos de microssatélites. Não houve evidências de desvios significativos do *EHW* em nenhuma amostra nem loco (Tabela 3.1). O Pantanal apresentou uma H_E média de 0,408 e uma H_O média de 0,457 e no Estado do Amapá apresentou uma H_E média de 0,358 e uma H_O média de 0,316. A probabilidade combinada de exclusão de 0,95 foi obtida considerando todos os locos.

Nas populações de colhereiro foram encontrados, em cinco locos de microssatélites, 35 alelos no Estado do Amapá, 34 alelos no Pantanal e 36 no Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 3.2). Não houve evidências de desvios significativos do *EHW* em nenhuma amostra nem loco (Tabela 3.2). A H_E média do Estado do Amapá foi 0,634, no Pantanal foi 0,607 e no Estado do Rio Grande do Sul foi 0,646. A H_O média foi 0,450 no Estado do Amapá, 0,561 no Pantanal e 0,613 no Estado do Rio Grande do Sul. A probabilidade combinada de exclusão para todos os locos foi 0,99.

Nas populações de garça-branca-grande foram detectados desvios significativos do *EHW* e alelos nulos (ver mais abaixo neste parágrafo) e, por esse motivo, as estimativas de parâmetros genético-populacionais apresentam-se para cada colônia individualmente. Em algumas colônias, o programa MICROCHECKER detectou evidência significativa da presença de alelos nulos no loco Ah522. Esses alelos podem explicar o excesso de homozigotos verificado pelos valores de F_{IS} positivos e significativamente diferentes de zero nas colônias BR, SM e MA (Estado do Rio Grande do Sul) (Tabela 3.3). O número de alelos por loco por colônia variou entre 2 e 16 e o número total de alelos foi 50 na amostra completa (Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul) (Tabelas 3.3 e 3.4). A probabilidade combinada de exclusão para todos os locos foi 0,99 e a probabilidade de identidade combinada foi 0,00004. Os níveis de diversidade genética variaram entre colônias e locos e a H_E variou desde 0,350 (colônia

PO) até 0,566 (BR) (Tabelas 3.3 e 3.4). Nas colônias do Estado do Rio Grande do Sul, o teste global para concordância com o *EHW* revelou desvios nos locos Ah414 e Ah522 ($P < 0.001$) (Tabela 3.3). O exame para cada colônia revelou que os locos Ah217, Ah414, Ah522 e WS03 estiveram fora do *EHW* em BR, os locos Ah414 e Ah522 em SM, o loco WS03 em MA e o loco Ah217 em PG (Tabela 3.3). O valor global de F_{IS} para as colônias do Estado do Rio Grande do Sul (0,159) não diferiu significativamente de zero, após correção para comparações múltiplas (procedimento de Bonferroni). A H_E por loco variou entre 0,091 (SE) e 0,914 (BR) e a H_O variou entre 0,086 e 0,865 (BR) (Tabela 3.3). Nas colônias do Pantanal, o teste global para concordância com o *EHW* revelou desvios nos locos Ah414 e Ah630 ($P < 0.001$). O exame para cada colônia individual revelou que os locos Ah414 e WS03 estão fora do equilíbrio em PRA, enquanto que o loco Ah630 está fora do equilíbrio em PF (Tabela 3.4). O valor global de F_{IS} para as colônias do Pantanal (0,106) não diferiu significativamente de zero, após correção para comparações múltiplas (procedimento de Bonferroni). A H_E por loco variou entre 0,167 (FI) e 0,938 (PF), e a H_O variou entre 0,167 (PO) e 0,999 (BG) (Tabela 3.4).

3.2 Desempenho dos estimadores de parentesco genético

Os índices de *Q&G* e de *L&R* não apresentaram desvios significativos dos valores teóricos esperados para os pares de UR, HS e FS obtidos por simulação, após correção de Bonferroni, como indicam os valores de P dos testes t de duas caudas, nas populações de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande (Tabela 3.5). O índice de *Q&G* mostrou uma variância menor de amostragem para a maioria das categorias de relacionamentos usando-se as frequências alélicas observadas nas populações das duas espécies, como indicado pelas simulações de Monte Carlo (Tabela 3.5). As percentagens de variação nas estimativas de parentesco explicadas pelo parentesco verdadeiro da amostra foram maximizadas pelo índice de *Q&G* (colhereiros: Estado do Amapá: 27,68%, Pantanal 22,99%, Estado do Rio Grande do Sul: 24,51%; cabeça-seca: Estado do Amapá: 19,70%, Pantanal: 27,70%; garça-branca-grande: Pantanal: 26,08%, Estado do Rio Grande do Sul: 26,44%).

Tabela 3.1. Parâmetros de variação genética nas populações de cabeça-seca do Pantanal e do Estado do Amapá, baseados em nove locos de microssatélites. Para cada loco apresentam-se: o número de indivíduos analisados (N), o número de alelos (A), a heterozigidade observada (H_O) e esperada (H_E), a probabilidade dos testes exatos para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{EHW}), a probabilidade de exclusão (P_E) e a Probabilidade de Identidade (PI : Jamieson e Taylor 1997) para combinação de locos.

Locos	Pantanal							Estado do Amapá						
	N	A	H_E	H_O	P_{EHW}	P_E	PI	N	A	H_E	H_O	P_{EHW}	P_E	PI
WS μ 03	70	3	0,577	0,271	0,058	0,52	0,0200	55	3	0,369	0,164	0,051	0,52	0,0220
WS μ 08	74	2	0,477	0,324	0,053	0,28	0,0077	71	2	0,492	0,479	0,360	0,28	0,0081
WS μ 09	74	3	0,053	0,054	0,229	0,52	0,0050	72	2	0,080	0,083	0,887	0,28	0,0060
WS μ 13	75	2	0,278	0,280	0,112	0,28	0,0026	70	3	0,281	0,271	0,750	0,52	0,0031
WS μ 14	71	4	0,646	0,634	0,879	0,68	0,0006	72	5	0,627	0,556	0,365	0,77	0,0007
WS μ 18	75	2	0,499	0,520	0,054	0,28	0,0002	71	3	0,500	0,507	0,052	0,52	0,0003
WS μ 20	74	4	0,252	0,041	0,059	0,68	<0,001	72	3	0,213	0,097	0,054	0,52	<0,001
WS μ 23	75	3	0,464	0,373	0,287	0,52	<0,001	64	3	0,488	0,500	0,188	0,52	<0,001
WS μ 24	75	4	0,195	0,173	0,886	0,68	<0,001	71	3	0,169	0,183	0,084	0,52	<0,001

Tabela 3.2. Parâmetros de variação genética em populações de colhereiro do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul, baseados em dados de cinco locos de microssatélites. Para cada loco apresentam-se: o número de indivíduos analisados (N), o número de alelos (A), a heterozigidade observada (H_O) e esperada (H_E), a probabilidade dos testes exatos para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{EHW}), a probabilidade de exclusão (P_E) e a Probabilidade de Identidade (PI : Jamieson e Taylor 1997) para combinação de locos.

Região	Estado do Amapá						Pantanal						Estado do Rio Grande do Sul					
	N	A	H_O	H_E	P_{EHW}	PI	N	A	H_O	H_E	P_{EHW}	PI	N	A	H_O	H_E	P_{EHW}	PI
Aaju1	39	11	0,820	0,831	0,275	0,050	38	11	0,816	0,808	0,195	0,062	74	10	0,878	0,898	0,059	0,064
Aaju2	39	10	0,590	0,677	0,150	0,006	38	10	0,605	0,707	0,951	0,007	74	11	0,649	0,671	0,073	0,009
Aaju3	39	6	0,436	0,554	0,118	<0,001	38	7	0,526	0,631	0,858	<0,001	74	7	0,662	0,662	0,116	<0,001
Aaju5	39	6	0,538	0,635	0,120	<0,001	38	4	0,474	0,397	0,817	<0,001	74	6	0,500	0,523	0,268	<0,001
WS03	39	2	0,405	0,473	0,185	<0,001	38	2	0,384	0,491	0,116	<0,001	74	2	0,378	0,477	0,076	<0,001

Tabela 3.3. Parâmetros de variação genética baseados em sete locos de microssatélites nas populações da garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*), em cinco colônias reprodutivas do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. N , número de amostras por loco; A , número de alelos; A_R , riqueza alélica; H_O , heterozigosidade observada; H_E , heterozigosidade esperada; P_{EHW} , probabilidade dos testes exatos para equilíbrio de Hardy-Weinberg; $G-W$, índice de Garza e Williamson (2001). Valores de F_{IS} significativos estão em itálico; valores de P significativos para o desvio de EHW se mostram em negrito (nível de significância ajustado para comparações múltiplas: 0,00143). Mono: monomórfico.

Rio Grande do Sul		Locos de microssatélites						
Colônia		Ah211	Ah217	Ah320	Ah414	Ah522	Ah630	WS μ 03
	N	37	36	37	36	36	37	35
	A	2	7	4	14	15	3	2
Barra do Ribeiro (BR)	A_R	1,999	4,103	3,907	7,431	8,515	2,16	1,993
	H_O	0,541	0,611	0,865	0,861	0,639	0,324	0,086
	H_E	0,462	0,623	0,742	0,868	0,914	0,349	0,401
	F_{IS}	-0,173	0,019	-0,168	0,008	<i>0,304</i>	0,072	0,789
	P_{EHW}	0,258	0,000	0,000	0,000	0,146	0,925	0,000
	$G-W$	0,667	0,466	0,444	0,424	0,600	0,667	0,667
	N	11	11	11	11	11	11	11
	A	1	4	4	9	9	2	3
Santa Maria (SM)	A_R	1	3,394	3,636	7,18	7,817	1,879	2,758
	H_O	0,000	0,455	0,818	0,727	0,273	0,182	0,364
	H_E	0,000	0,403	0,714	0,853	0,909	0,173	0,329
	F_{IS}	-	-0,136	-0,154	0,153	<i>0,710</i>	-0,053	-0,111

	P_{EHW}	Mono.	0,987	0,465	0,009	0,002	0,740	0,909
	$G-W$	-	0,307	0,571	0,310	0,667	0,600	0,667
	N	11	11	11	11	11	11	11
	A	2	4	5	10	8	2	3
Serrinha (SE)	A_R	1,636	2,909	4,514	7,899	6,973	1,636	2,636
	H_O	0,091	0,273	0,545	0,818	0,636	0,091	0,273
	H_E	0,091	0,260	0,775	0,892	0,883	0,091	0,481
	F_{IS}	0,000	-0,053	0,306	0,086	0,289	0,000	0,444
	P_{EHW}	0,875	1,000	0,141	0,483	0,061	0,875	0,338
	$G-W$	0,667	0,363	0,444	0,238	0,600	0,600	0,667
	N	9	9	9	9	9	9	9
	A	1	5	4	7	7	2	3
Mariante (MA)	A_R	1	4,66	3,778	6,467	6,536	1,778	2,96
	H_O	0,000	0,556	0,889	1,000	0,333	0,111	0,444
	H_E	0,000	0,621	0,732	0,850	0,882	0,111	0,523
	F_{IS}	-	0,111	-0,231	-0,190	0,636	0,000	0,158
	P_{EHW}	Mono.	0,205	0,557	0,741	0,092	0,860	0,018
	$G-W$	-	0,464	0,563	0,118	0,667	0,600	0,667
	N	7	7	7	7	7	7	7
	A	2	4	4	5	6	3	3

Pântano Grande (PG)	A_R	2	4	4	5	6	3	3
	H_O	0,286	0,286	0,714	0,714	0,714	0,286	0,857
	H_E	0,440	0,396	0,692	0,824	0,791	0,275	0,714
	F_{IS}	0,368	0,294	-0,034	0,143	0,104	-0,043	-0,22
	P_{EHW}	0,427	0,029	0,103	0,336	0,063	0,978	0,164
	$G-W$	0,354	0,56	0,6	0,25	0,667	0,74	0,667

Tabela 3.4. Parâmetros de variação genética baseados em sete locos de microssatélites nas populações da garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*), em cinco colônias reprodutivas do Pantanal, Brasil. N , número de amostras por loco; A , número de alelos; A_R , riqueza alélica; H_O , heterozigosidade observada; H_E , heterozigosidade esperada; P_{EHW} , probabilidade dos testes exatos para equilíbrio de Hardy-Weinberg; $G-W$, índice de Garza e Williamson (2001). Valores de F_{IS} significativos estão em itálico; valores de P significativos para o desvio de EHW se mostram em negrito (nível de significância ajustado para comparações múltiplas: 0,00143). Mono: monomórfico.

Pantanal		Locos de microssatélites						
Colônia		Ah211	Ah217	Ah320	Ah414	Ah522	Ah630	WSμ03
	N	10	10	10	10	10	10	10
	A	2	5	4	9	8	3	2
Tucum (TUC)	A_R	1,984	4,053	3,615	6,052	6,159	2,457	2
	H_O	0,500	0,900	0,700	0,700	0,600	0,300	0,200
	H_E	0,395	0,674	0,658	0,832	0,889	0,416	0,505
	F_{IS}	-0,286	-0,361	-0,068	0,166	0,337	0,289	0,617
	P_{EHW}	0,292	0,754	0,457	0,252	0,136	0,667	0,065
	$G-W$	0,667	0,470	0,454	0,363	0,185	0,600	0,600
	n_L	22	22	22	22	22	22	22

	<i>A</i>	2	6	4	10	16	3	2
Porto da Fazenda (PF)	<i>A_R</i>	1,999	3,902	3,286	4,683	7,616	2,807	1,947
	<i>H_O</i>	0,591	0,773	0,636	0,500	0,864	0,591	0,364
	<i>H_E</i>	0,502	0,660	0,665	0,703	0,938	0,559	0,359
	<i>F_{IS}</i>	-0,182	-0,176	0,044	0,294	0,081	-0,058	-0,012
	<i>P_{EHW}</i>	0,338	0,240	0,052	0,130	0,428	0,023	0,869
	<i>G-W</i>	0,667	0,400	0,571	0,254	0,209	0,600	0,667
	<i>n_L</i>	24	24	24	24	24	24	21
	<i>A</i>	2	5	4	8	14	2	2
Praialzinho (PRA)	<i>A_R</i>	1,999	3,327	3,074	4,59	6,607	1,993	1,937
	<i>H_O</i>	0,708	0,833	0,750	0,583	0,667	0,458	0,143
	<i>H_E</i>	0,503	0,633	0,655	0,751	0,899	0,467	0,345
	<i>F_{IS}</i>	-0,422	-0,326	-0,148	0,227	0,263	0,019	0,592
	<i>P_{EHW}</i>	0,031	0,269	0,723	0,00004	0,974	0,993	0,008
	<i>G-W</i>	0,667	0,454	0,667	0,363	0,278	0,667	0,600
	<i>n_L</i>	6	6	6	6	6	6	6
	<i>A</i>	2	2	4	4	4	1	2
Fazenda Ipiranga (FI)	<i>A_R</i>	1,833	1,833	3,818	3,667	3,652	1	2
	<i>H_O</i>	0,167	0,167	0,667	0,333	0,333	0,000	0,333
	<i>H_E</i>	0,167	0,167	0,712	0,697	0,561	0,000	0,545
	<i>F_{IS}</i>	0,000	0,000	0,070	0,545	0,429	-	0,412

	P_{EHW}	0,824	0,824	0,677	0,372	0,062	Mono.	0,414
	$G-W$	0,667	0,550	0,600	0,254	0,326	-	0,600
	n_L	5	5	5	5	5	5	5
	A	2	4	3	4	5	2	2
Baia de Gaiva (BG)	A_R	2	4	3	4	5	2	2
	H_O	0,200	0,800	0,999	0,600	0,400	0,200	0,600
	H_E	0,200	0,644	0,711	0,778	0,844	0,200	0,467
	F_{IS}	0,000	-0,280	-0,481	0,250	0,556	0,000	-0,333
	P_{EHW}	0,804	0,898	0,373	0,475	0,349	0,804	0,338
	$G-W$	0,600	0,469	0,667	0,463	220,000	0,600	0,667

As taxas de erro esperadas na classificação dos relacionamentos foram calculadas com base nos valores de corte específicos das populações ecológicas e espécies. Essas taxas indicaram que o índice de *Q&G* apresentou o menor erro na classificação de indivíduos em categorias de relacionamento (Tabela 3.6). A taxa esperada de sucesso na classificação de colhereiros não-relacionados, obtida pelo índice de *Q&G*, variou entre 64,4% e 81,63% (como pode se inferir a partir da Tabela 3.6). Para cabeça-seca, essa taxa variou entre 73,8% e 85,6% (como pode se inferir a partir da Tabela 3.6). Na garça-branca-grande, as taxas de sucesso na classificação de indivíduos não-relacionados pelo índice de *Q&G* variaram entre 67,40 e 87,80% (como pode se inferir a partir da Tabela 3.6). Com base em simulações feitas com nossos conjuntos de dados, as taxas de erro na classificação de indivíduos pertencentes a categorias de relacionamento adjacentes (por exemplo, FS e HS), pelo índice de *Q&G* variaram entre 25% e 35,6% no colhereiro (considerando as três regiões), entre 24,3% e 34,3% no cabeça-seca e entre 23% e 32,6% na garça-branca-grande (Tabela 3.6). Para categorias não-adjacentes de relacionamento (por exemplo, UR e FS), no entanto, essas proporções foram menores: 17,4% - 22,2% no colhereiro, 14,4%-17,5% no cabeça-seca e 12,2%-17,6% na garça-branca-grande (Tabela 3.6). Tendo o índice de *Q&G* superado o índice de *L&R* quanto ao desempenho em nosso conjunto de dados, optou-se pelo seu uso para a classificação dos pares de ninhegos amostrados nas colônias reprodutivas brasileiras de cabeça-seca e colhereiro (ver mais abaixo).

As curvas de distribuição dos valores de parentesco genético (índices de *Q&G* e de *L&R*) para pares de ninhegos obtidos por simulação com base nas frequências alélicas das amostras de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul mostram-se nas figuras D1 a D14 (Apêndice D). Os valores de corte específicos para se distinguir entre categorias de relacionamento nas amostras analisadas foram determinados como os pontos médios das médias dessas curvas e apresentam-se na Tabela 3.7. Esses valores foram utilizados como um subsídio à classificação dos pares amostrados nas colônias reprodutivas, segundo o procedimento de Blouin et al. (1996).

Tabela 3.5. Parentesco genético \pm erro padrão do índice de Queller e Goodnight (1989) (*Q&G*) e de Lynch e Ritland (1999) (*L&R*) para 1.000 pares simulados de indivíduos não-relacionados (UR), meio-irmãos (HS), e irmãos-completos (FS), com base nas frequências alélicas observadas nas amostras de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As variâncias para cada categoria de relacionamento estão entre parênteses, com as menores variâncias em negrito. Os valores de *P* para testes t de duas caudas para avaliar a diferença com os valores teóricos esperados de parentesco (UR: 0; FS: 0,50; HS: 0,25) estão em itálico [(t0.05(2),999 = 1.962; valor de *P* crítico após correção de Bonferroni = 0.0166)].

Colhereiro									
Região	Amapá			Pantanal			Rio Grande do Sul		
Relac.	UR	HS	FS	UR	HS	FS	UR	HS	FS
<i>Q&G</i>	-0,004 \pm 0,089 (0,086) <i>0,6255</i>	0,245 \pm 0,067 (0,082) <i>0,6145</i>	0,484 \pm 0,074 (0,070) <i>0,0576</i>	-0,017 \pm 0,009 (0,068) <i>0,0990</i>	0,242 \pm 0,035 (0,086) <i>0,4206</i>	0,482 \pm 0,011 (0,085) <i>0,0456</i>	0,013 \pm 0,028 (0,055) <i>0,2109</i>	0,235 \pm 0,039 (0,098) <i>0,1361</i>	0,495 \pm 0,023 (0,090) <i>0,6007</i>
<i>L&R</i>	-0,008 \pm 0,045 (0,039) <i>0,1903</i>	0,245 \pm 0,016 (0,076) <i>0,6092</i>	0,517 \pm 0,095 (0,265) <i>0,3080</i>	-0,003 \pm 0,005 (0,105) <i>0,7121</i>	0,264 \pm 0,065 (0,183) <i>0,3009</i>	0,514 \pm 0,036 (0,276) <i>0,3850</i>	0,010 \pm 0,037 (0,103) <i>0,1741</i>	0,265 \pm 0,059 (0,191) <i>0,2751</i>	0,520 \pm 0,019 (0,378) <i>0,3114</i>
Cabeça-seca									
Região	Amapá			Pantanal					
Relac.	UR	HS	FS	UR	HS	FS			
<i>Q&G</i>	-0,002 \pm 0,015 (0,0798) <i>0,2315</i>	0,224 \pm 0,0128 (0,0964) <i>0,0517</i>	0,469 \pm 0,012 (0,0814) <i>0,5364</i>		-0,015 \pm 0,015 (0,0798) <i>0,3138</i>	0,251 \pm 0,010 (0,0986) <i>0,8738</i>	0,482 \pm 0,009 (0,0850) <i>0,0507</i>		
<i>L&R</i>	0,008 \pm 0,009 (0,1248) <i>0,3452</i>	0,249 \pm 0,014 (0,2086) <i>0,9333</i>	0,489 \pm 0,013 (0,1811) <i>0,4193</i>		0,008 \pm 0,009 (0,2271) <i>0,3452</i>	0,270 \pm 0,014 (0,2030) <i>0,1578</i>	0,508 \pm 0,014 (0,2013) <i>0,5822</i>		
Garça-branca-grande									
Região	Pantanal			Rio Grande do Sul					
Relac.	UR	HS	FS	UR	HS	FS			
<i>Q&G</i>	-0,067 \pm 0,017 (0,0628) <i>0,7564</i>	0,265 \pm 0,075 (0,0056) <i>0,3452</i>	0,523 \pm 0,007 (0,0324) <i>0,5674</i>		-0,006 \pm 0,008 (0,0345) <i>0,2398</i>	0,264 \pm 0,006 (0,0784) <i>0,4537</i>	0,483 \pm 0,042 (0,0673) <i>0,7453</i>		
<i>L&R</i>	0,006 \pm 0,056 (0,1237) <i>0,1656</i>	0,198 \pm 0,035 (0,1865) <i>0,2930</i>	0,456 \pm 0,078 (0,2876) <i>0,4783</i>		0,102 \pm 0,023 (0,2190) <i>0,3421</i>	0,231 \pm 0,102 (0,2109) <i>0,4234</i>	0,453 \pm 0,023 (0,4318) <i>0,5421</i>		

Tabela 3.6. Taxas de erro esperadas para classificação dos pares de indivíduos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande, para os índices de Queller e Goodnight (1989) (*Q&G*) e Lynch and Ritland (1999) (*L&R*), estimadas como a proporção classificada erroneamente (*Class. como*) de 1.000 pares de não-relacionados (UR), meio-irmãos (HS) e irmãos-completos (FS), obtidos por simulação (*Relac. sim*), com base nas frequências alélicas observadas em amostras populacionais de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) (simulações realizadas de acordo com Russello e Amato, 2004).

		Colhereiros						Cabeça-seca				Garça-branca-grande			
		Amapá		Pantanal		Rio Grande do Sul		Amapá		Pantanal		Pantanal		Rio Grande do Sul	
<i>Estimador</i>		<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>
<i>Relac. sim.</i>	<i>Class. como</i>														
FS	UR	0,174	0,219	0,195	0,233	0,181	0,239	0,170	0,217	0,175	0,215	0,122	0,199	0,130	0,204
UR	FS	0,184	0,112	0,222	0,165	0,215	0,133	0,147	0,198	0,144	0,186	0,172	0,245	0,176	0,243
HS	FS	0,323	0,313	0,356	0,341	0,342	0,324	0,339	0,343	0,343	0,359	0,320	0,344	0,318	0,346
FS	HS	0,299	0,334	0,315	0,346	0,286	0,344	0,275	0,333	0,302	0,334	0,301	0,359	0,305	0,358
UR	HS	0,319	0,216	0,245	0,268	0,356	0,375	0,262	0,318	0,243	0,313	0,230	0,335	0,231	0,336
HS	UR	0,317	0,377	0,332	0,383	0,250	0,362	0,325	0,381	0,314	0,379	0,326	0,397	0,326	0,394

Tabela 3.7. Valores de corte para distinguir entre categorias de relacionamentos, para os índices de Queller e Goodnight (1989) (*Q&G*) e Lynch e Ritland (1999) (*L&R*), estabelecidos como os pontos médios entre as médias das curvas de distribuição dos valores de parentesco genético par-a-par para 1.000 pares não-relacionados (UR), meio-irmãos (HS), e irmãos-completos (FS), obtidos por simulação, com base nas frequências alélicas observadas em amostras populacionais de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) (simulações realizadas de acordo com Russello e Amato, 2004).

	Colhereiro						Cabeça-seca				Garça-branca-grande			
	Amapá		Pantanal		Rio Grande do Sul		Amapá		Pantanal		Pantanal		Rio Grande do Sul	
<i>Estimador</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>	<i>L&R</i>	<i>Q&G</i>
Relacionamentos														
UR-HS	0,129	0,125	0,131	0,127	0,134	0,127	0,130	0,132	0,127	0,131	0,124	0,123	0,125	0,121
UR-FS	0,255	0,252	0,253	0,252	0,263	0,249	0,260	0,259	0,252	0,255	0,372	0,368	0,372	0,367
FS-HS	0,377	0,375	0,375	0,377	0,374	0,371	0,373	0,384	0,371	0,373	0,251	0,245	0,251	0,247

3.3 Parentesco entre ninhegos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande

Os valores de parentesco genético entre pares de ninhegos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande, a categoria de relacionamento mais provável identificada por ML e o resultado dos testes de hipóteses para estabelecer significância dos relacionamentos sugeridos por ML estão apresentados nas tabelas E1 a E7 (Apêndice E). Com base nesses resultados e aplicando-se o critério de concordância entre os diversos métodos de análise, chegou-se numa classificação final dos pares de ninhegos analisados, conforme descrição abaixo.

Na amostra de cabeça-seca, foram classificados 14,95% dos pares de ninhegos analisados, incluindo 17,22% dos pares amostrados no Estado do Amapá, e 6,97% dos pares amostrados no Pantanal (Tabela 3.8 e Tabelas E1 e E2). O número de pares classificados como UR, FS e HS em cada região está apresentado na tabela 3.8. Em termos de ninhos, foram classificados todos os pares de ninhegos de cabeça-seca amostrados dentro de três ninhos no Pantanal (7,31% dos ninhos amostrados nessa região) e de sete ninhos no Estado do Amapá (11,11%).

Com relação aos colhereiros, foram classificados 25,17% dos pares de ninhegos analisados, incluindo 23,31% dos pares amostrados no Estado do Amapá, 30,43% dos amostrados no Pantanal e 25% dos pares amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 3.8, e Tabelas E3, E4 e E5). O número de pares classificados como UR, FS e HS em cada região está apresentado na tabela 3.8. Em termos de ninhos, foram classificados todos os pares de ninhegos amostrados dentro de quatro ninhos do Estado do Amapá, quatro ninhos do Pantanal e seis ninhos do Estado do Rio Grande do Sul.

Para a garça-branca-grande, foram classificados 36,23% dos pares de ninhegos analisados, incluindo 29,41% dos pares do Pantanal e 42,86% dos pares do Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 3.8 e Tabelas E6 e E7). O número de pares classificados como UR, FS e HS em cada região está apresentado na tabela 3.8. Dos ninhos amostrados no Pantanal, 10 (31,25%) tiveram todos os seus pares classificados em uma categoria de relacionamento (Tabela E6). No Estado do Rio Grande do Sul, 15 ninhos (71,43%) apresentaram todos os seus pares classificados em alguma categoria de relacionamento (Tabela E7).

Tabela 3.8. Número de pares de colhereiros, cabeça-seca e garça-branca-grande amostrados em colônias reprodutivas do Estado do Amapá, Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul, Brasil que foram analisados para parentesco genético. As categorias de relacionamento para cada par foram determinadas através da inspeção dos valores de parentesco genético, aplicação do método dos “valores de corte” (Blouin et al. 1996), determinação de vínculos por máxima verossimilhança e técnicas de reconstrução de relacionamentos (resultados nas tabelas B1 a B7). UR: não-relacionados, HS: meio-irmãos, FS: irmãos-completos.

Colhereiro					
Região	Pares estudados	Pares classificados	Relacionamento identificado		
			UR	HS	FS
Amapá	56	13	0	0	13
Pantanal	23	7	2	1	4
RS	68	17	7	1	9
Total	147	37	9	2	26
Cabeça-seca					
Região	Pares estudados	Pares classificados	Relacionamento identificado		
			UR	HS	FS
Amapá	151	26	19	0	7
Pantanal	43	3	3	0	0
Total	194	29	22	0	7
Garça-branca-grande					
Região	Pares estudados	Pares classificados	Relacionamento identificado		
			UR	HS	FS
Pantanal	34	10	0	0	10
RS	35	15	0	0	15
Total	69	25	0	0	25

3.4 Comparações intraespecíficas e interespecíficas dos valores de parentesco médio e das distribuições das categorias de relacionamento dos pares de ninhegos

O valor médio de parentesco genético entre indivíduos nas populações ecológicas pode indicar como se distribui a variabilidade genética nas mesmas. Se o valor de parentesco médio for maior do que o esperado para uma população de indivíduos agrupados ao acaso (ou seja, sem nenhuma preferência de agregação de parentes), poderá se inferir sobre o comportamento da espécie. No presente estudo comparamos para cada espécie,

os valores médios de parentesco obtidos dentro e entre ninhos amostrados em cada região. O valor de parentesco médio entre ninhos deveria refletir o esperado numa amostra de indivíduos não-relacionados, pois essa base amostral compreendia um indivíduo por ninho. O valor de parentesco médio dentro dos ninhos deveria refletir o esperado para irmãos-completos, segundo a nossa hipótese de monogamia genética nas três espécies estudadas.

Para o cabeça-seca, os valores de parentesco médio observados dentro dos ninhos não diferiram significativamente dos observados entre ninhos no Pantanal ($P = 0,1095$) nem no Estado do Amapá ($P = 0,9651$). O valor médio de parentesco genético observado dentro dos ninhos diferiram significativamente do esperado para FS e HS tanto no Pantanal quanto no Estado do Amapá (valores de $P < 0,0001$) (Tabela 3.9). Por outro lado, esses valores não diferiram significativamente do valor de parentesco entre indivíduos não-relacionados em nenhuma das regiões estudadas, de acordo com testes t de duas caudas (valores de P : Amapá = 0,1888; Pantanal = 0,0751).

Para os colhereiros, os valores de parentesco médios observados entre ninhos diferiram significativamente dos observados dentro dos ninhos no Pantanal ($P = 0,0011$), no Estado do Amapá ($P = 0,0087$), e no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,0064$). Os valores de parentesco genético observados dentro dos ninhos no Estado do Rio Grande do Sul não diferiram significativamente do esperado para UR ($P = 0,1809$) (Tabela 3.9). Ao contrário, os valores médios de parentesco genético observados dentro dos ninhos de colhereiro do Pantanal e do Estado do Amapá diferiram significativamente do esperado para UR (P : Amapá = 0,0039; Pantanal = 0,0008). Os valores médios de parentesco genético observados dentro dos ninhos amostrados no Pantanal e no Estado do Amapá não diferiram significativamente do r esperado para HS (P : Estado do Amapá = 0,2414; Pantanal = 0,5189). Ao contrário, os valores de parentesco médios observados dentro dos ninhos no Rio Grande do Sul diferiram significativamente do esperado para HS ($P = 0,0039$).

Para a garça-branca-grande, em ambas as regiões amostradas, os valores de parentesco médios observados dentro dos ninhos diferiram significativamente dos observados entre ninhos ($P < 0,0001$). Os valores observados dentro dos ninhos do Pantanal (Tabela 3.9) diferiram significativamente do esperado para FS e para UR (teste- t de duas caudas: $P < 0,0001$), mas não diferiram significativamente do esperado para HS ($P = 0,4118$). No Estado do Rio Grande do Sul, os valores de parentesco

genético observados dentro dos ninhos (Tabela 3.9) diferiram significativamente do esperado para UR ($P < 0,0001$), HS ($P = 0,0044$) e FS ($P = 0,0013$).

Tabela 3.9. Valores de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight 1989, $Q\&Gr$) \pm Erro Padrão (E.P.) observados dentro e entre ninhos em colônias de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande do Estado do Amapá, Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, estimados com base em locos de microssatélites.

Colhereiro		
Região		$Q\&Gr \pm E.P.$
Pantanal	Entre ninhos	$0,0072 \pm 0,0260$
	Dentro de ninhos	$0,3098 \pm 0,0766$
Amapá	Entre ninhos	$0,0152 \pm 0,0120$
	Dentro de ninhos	$0,1643 \pm 0,0609$
Rio Grande do Sul	Entre ninhos	$-0,0813 \pm 0,0057$
	Dentro de ninhos	$0,0355 \pm 0,0658$
Cabeça-seca		
Região		$r \pm E.P.$
Pantanal	Entre ninhos	$0,0052 \pm 0,0057$
	Dentro de ninhos	$-0,1090 \pm 0,0597$
Amapá	Entre ninhos	$-0,0653 \pm 0,0456$
	Dentro de ninhos	$-0,0600 \pm 0,0365$
Garça-banca-grande		
Região		$r \pm E.P.$
Pantanal	Entre ninhos	$-0,0150 \pm 0,0050$
	Dentro de ninhos	$0,2807 \pm 0,0369$
Rio Grande do Sul	Entre ninhos	$-0,0250 \pm 0,0110$
	Dentro de ninhos	$0,3664 \pm 0,0382$

As comparações intraespecíficas (Fig. 3.1a) entre regiões revelaram que a proporção de ninhos de cabeça-seca no Estado do Amapá com todos os seus pares classificados (11,11%) não diferiu significativamente da proporção de ninhos do Pantanal que tiveram todos os pares classificados (7,31%) ($P = 0,5359$). A proporção de ninhos de colhereiro que tiveram todos os seus pares classificados (Estado do Amapá = 13,33%; Pantanal = 23,52%; Estado do Rio Grande do Sul = 17,14%) foi semelhante em amostras das três regiões analisadas (P para as comparações: Estado do Amapá – Pantanal = 0,4620; Estado do Amapá – Estado do Rio Grande do Sul = 0,7149; Pantanal – Estado do Rio Grande do Sul = 0,6581). A proporção de ninhos de garça-branca-

grande do Estado do Rio Grande do Sul com todos os pares classificados não diferiu significativamente da proporção de ninhos do Pantanal que tiveram todos os pares classificados ($P = 0,0917$).

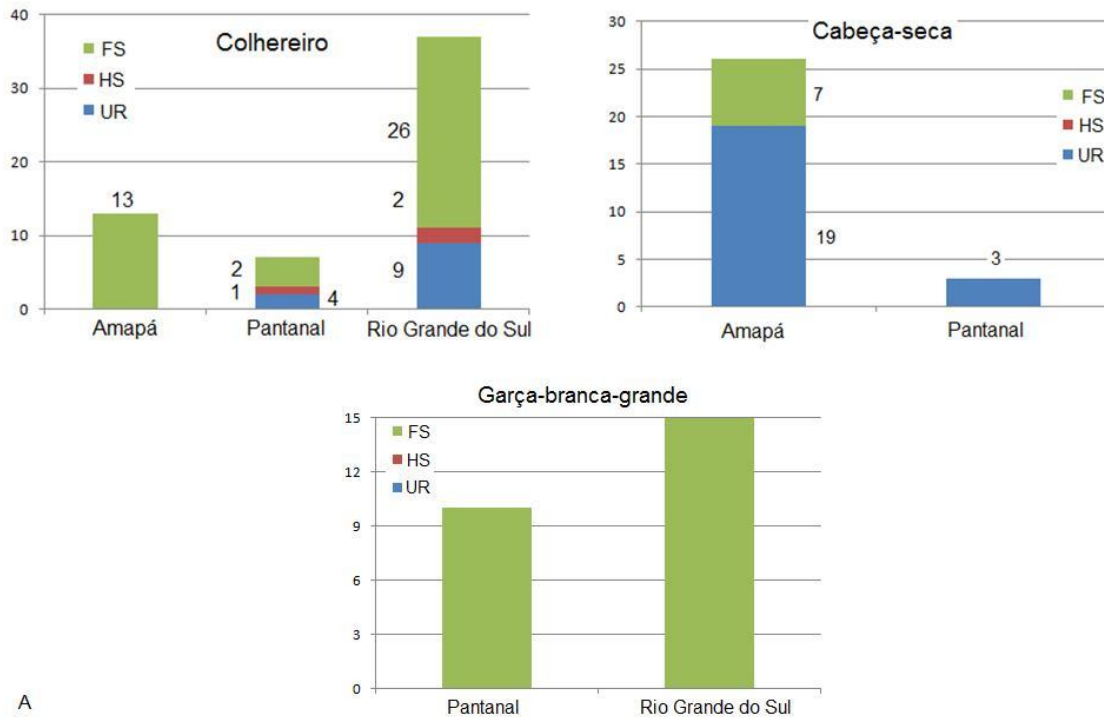
Para o cabeça-seca, a percentagem de pares amostrados no Estado do Amapá que foram classificados numa categoria de relacionamento não diferiu significativamente do número de pares classificados no Pantanal ($P = 0,1161$). Da mesma maneira, o número de pares classificados como UR no Estado do Amapá não diferiu do número de UR do Pantanal ($P = 0,3320$).

Para os colhereiros, o número total de pares do Estado do Amapá classificados numa categoria de relacionamento não diferiu significativamente do número de pares classificados no Pantanal ($P = 0,6124$), nem do número de pares classificados no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,8565$). O número de pares de ninhos de colhereiro amostrados no Pantanal que foram classificados numa categoria de relacionamento não diferiu significativamente do número de pares classificados no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,7018$). O número de pares classificados como UR no Pantanal não diferiu significativamente do número de UR no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,8383$). O número de pares FS no Estado do Amapá não diferiu significativamente do número de FS no Pantanal ($P = 0,6374$), nem do Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,2276$). O número de FS no Pantanal não diferiu significativamente do número de FS no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,6773$). O número de HS no Pantanal diferiu significativamente do número de HS no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,0129$).

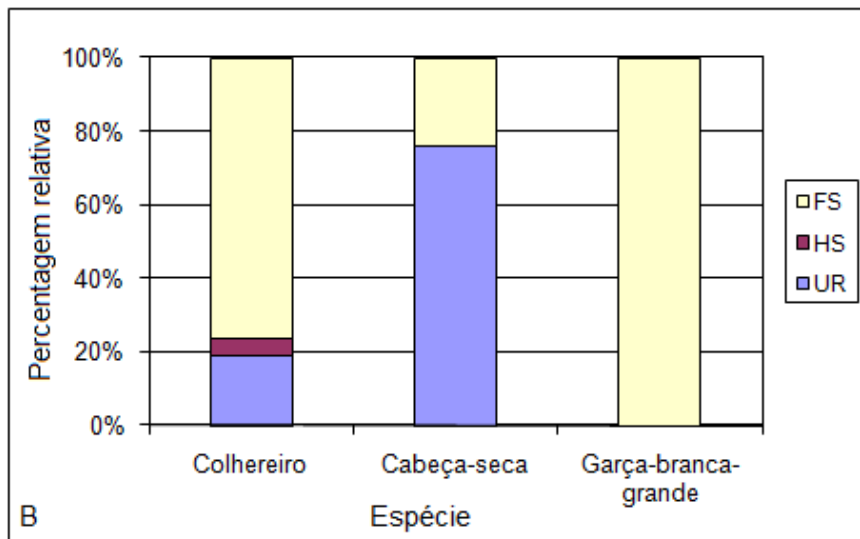
Para a garça-branca-grande, o número total de pares de ninhos classificados como FS no Pantanal não diferiu significativamente do obtido no Estado do Rio Grande do Sul ($P = 0,4244$). Nenhum par foi classificado como HS nem como UR por todos os métodos no Estado do Rio Grande do Sul, não sendo possível essa comparação entre regiões para essa categoria de relacionamento.

As comparações interespecíficas (Fig. 3.1b) revelaram que a percentagem de pares de cabeça-seca que foram classificados numa categoria de relacionamento não diferiu significativamente da percentagem de pares de colhereiros classificados ($P = 0,0535$), mas diferiu significativamente da percentagem de pares de garça-branca-grande classificados ($P = 0,0044$). A percentagem de pares de colhereiros

classificados numa categoria de relacionamento não diferiu significativamente da percentagem de pares de garça-branca-grande que foram classificados ($P = 0,2234$). A percentagem de pares de ninhegos de cabeça-seca classificados como UR (11,34%) não diferiu significativamente de percentagem em colhereiro (6,12%) ($P = 0,1211$). Não houve UR na garça-branca-grande.



A



B

Figura 3.1. A. Total de pares de ninhegos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande classificados como irmãos-completos (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (UR) por colônia; B. Por espécie, percentagens relativas de pares classificados em cada categoria de relacionamento (segundo dados da tabela 3.8).

3.5 Paternidade e parentesco genético em colhereiros de cativoiro

De acordo com informações fornecidas pelos zoológicos dos EUA nos quais foram amostradas famílias de colhereiro, as supostas mães estavam registradas para 72% dos 25 ninhegos disponíveis e os supostos pais estavam registrados para 84% desses ninhegos (Tabela 2.2). As análises baseadas em microssatélites e máxima verossimilhança confirmaram a maternidade e a paternidade para os machos e as fêmeas registrados no *studbook* dos zoológicos para as famílias #1, #2, #4, #8 e #17 e para os ninhegos DZ39 e DZ42 da família #14 (Tabelas 3.10 e 3.11). Nenhum dos métodos usados confirmou supostos genitores nas supostas famílias #11, #12 e #13 e para os ninhegos DZ40 e DZ41 da suposta família #14 (Tabelas 3.10 e 3.11).

Nos casos em que somente a suposta mãe estava registrada (quatro supostas famílias), uma análise de maternidade foi conduzida para se verificar se esse animal registrado no *studbook* estava, de fato, relacionado com o ninhego conforme uma relação de pai-filho (PO). Por exemplo: o indivíduo FW15 foi considerado como a mãe de FW19 e FW21, e FW19 foi registrado como a mãe mais provável de FW20 (Tabelas 2.2 e 3.10). Em algumas famílias, a suposta mãe listada no livro do zoológico não foi confirmada, como é o caso do indivíduo SCZ45 que não esteve relacionado conforme uma relação PO com o indivíduo, DZ30 (Tabela 3.10). Da mesma forma, nos casos em que somente o suposto pai estava registrado (quatro supostas famílias), a análise de paternidade confirmou a paternidade nos acasalamentos #3, #10 e para os ninhegos SCZ47 e SCZ48 no acasalamento #16 (Tabela 3.11).

Nos casos em que os indivíduos registrados nos zoológicos como sendo os parentais dos ninhegos não foram confirmados pela análise genética, ou em que os parentais não estavam registrados nos livros, foram realizadas análises genéticas para se identificar os pais mais prováveis dentre todos os candidatos. As análises encontraram as mães mais prováveis para os ninhegos das supostas famílias #3, #9, #10 e #16 (Tabela 3.10) e os pais mais prováveis nos grupos #5, #6 e #7 (Tabela 3.11). Em alguns casos, foi necessário encontrar o par de parentais mais prováveis e as análises genéticas baseadas em máxima verossimilhança indicaram esses pares nos grupos #11, #12, #13 e #14 (Tabelas 3.10 e 3.11).

As análises de parentesco também foram utilizadas nas amostras de cativeiro para se avaliar o grau de relacionamento genético entre indivíduos considerados irmãos-completos ou meio-irmãos (Tabela 3.12). Foi identificado que os indivíduos de quatro dos pares analisados não estavam relacionados entre si (Tabela

3.12). Somente 42.8% de sete pares de supostos irmãos registrados nos zoológicos foram confirmados como sendo FS (Tabela 3.12).

Tabela 3.10. Resultados da análise de maternidade para 25 ninhegos registrados nos *studbooks* de três zoológicos nos EUA, com base em locos de microssatélites e máxima verossimilhança. *Q&Gr*: índice de parentesco de Queller & Goodnight (1989); H_0/H_1 : hipótese nula/ hipótese alternativa; *P*: valor de probabilidade do teste de hipóteses ($P < 0.005$ implica que a hipótese alternativa está mais de acordo com os dados do que a hipótese nula); PO: progenitor-progênie; UR: não-relacionado; NA: não-disponível.

Grupo	Ninhego	Data de nascimento	Suposta mãe	Análise de maternidade	<i>Q&Gr</i> ^a	H_0/H_1	<i>P</i>	Mãe mais provável	<i>Q&Gr</i> ^b	H_0/H_1	<i>P</i>
#1	FW10	Junho 1981	FW15	Positiva	0,731	PO/U	0,0145				
#1	FW12	Junho 1981	FW15	Positiva	0,686	PO/U	0,0412				
#2	FW13	Maiο 1993	FW12	Positiva	0,755	PO/U	0,0043				
#3	FW16	Junho 1978	NA					FW15	0,791	PO/U	0,0183
#4	FW17	Maiο 1993	FW16	Positiva	0,391	PO/U	0,0109				
#5	FW19	Junho 1989	FW15	Positiva	0,568	PO/U	0,0212				
#6	FW20	Junho 1994	FW19	Positiva	0,768	PO/U	0,0245				
#7	FW21	Julho 1980	FW15	Positiva	0,590	PO/U	0,0093				
#8	DZ31	Agosto 1992	SCZ43	Positiva	0,563	PO/U	0,0459				
#9	DZ32	Julho 1994	NA					SCZ45	0,267	PO/U	0,0023
#10	DZ33	Julho 1995	NA					DZ28	0,348	PO/U	0,1880
#10	DZ34	Julho 1995	NA					DZ28	0,021	PO/U	0,2253
#11	DZ35	Julho 1996	SCZ43	Negativa	-0,095	U/PO	0,0000	DZ26	0,755	PO/U	0,0258
#12	DZ36	Junho 2000	DZ29	Negativa	-0,076	U/PO	0,0000	DZ26	0,755	PO/U	0,0005
#12	DZ37	Junho 2000	DZ29	Negativa	0,145	U/PO	0,0163	DZ26	0,510	PO/U	0,0297
#13	DZ38	Junho 2000	DZ28	Negativa	-0,057	U/PO	0,0000	DZ29	0,739	PO/U	0,0695
#14	DZ39	Junho 2000	DZ26	Positiva	0,530	PO/U	0,0238				
#14	DZ40	Junho 2000	DZ26	Negativa	0,002	U/PO	0,0044	DZ29	0,739	PO/U	0,0785
#14	DZ41	Junho 2000	DZ26	Negativa	-0,352	U/PO	0,0000	DZ34	1,000	PO/U	0,0001
#14	DZ42	Julho 2000	DZ26	Positiva	0,376	PO/U	0,0058				
#15	SCZ45	Junho 1988	DZ30	Negativa	-0,003	U/PO	0,0000	FW15	0,091	PO/U	0,3050
#16	SCZ47	Julho 1992	NA					SCZ43	0,550	PO/U	0,0794
#16	SCZ48	Julho 1994	NA					SCZ45	0,360	PO/U	0,0284
#16	SCZ49	Julho 1996	NA					SCZ43	0,203	PO/U	0,1379
#17	SCZ51	Fevereiro 2001	SCZ45	Positiva	0,730	PO/U	0,0107				

a Valor de parentesco genético para o ninhego e a mãe registrada nos *studbooks* dos zoológicos; *b* Valor de parentesco genético para o ninhego e a mãe mais provável (identificada pelas análises de maternidade realizadas no presente estudo).

Tabela 3.11. Resultados da análise de paternidade para 25 ninhegos registrados nos *studbooks* de três zoológicos nos EUA, com base em locos de microssatélites e máxima verossimilhança. $Q\&Gr$: índice de parentesco de Queller & Goodnight (1989); H_0/H_1 : hipótese nula/ hipótese alternativa; P : valor de probabilidade do teste de hipóteses ($P < 0.005$ implica que a hipótese alternativa está mais de acordo com os dados do que a hipótese nula); PO: progenitor-progênie; UR: não-relacionado; NA: não-disponível.

Grupo	Ninhego	Data de nascimento	Suposto pai	Análise de paternidade	$Q\&Gr^a$	H_0/H_1	P	Pai mais provável	$Q\&Gr^b$	H_0/H_1	P
#1	FW10	Junho 1981	FW11	Positiva	0,580	PO/U	0,0092				
#1	FW12	Junho 1981	FW11	Positiva	0,662	PO/U	0,0120				
#2	FW13	Maio 1993	FW10	Positiva	0,881	PO/U	0,0008				
#3	FW16	Junho 1978	FW11	Positiva	0,639	PO/U	0,0225				
#4	FW17	Maio 1993	FW21	Positiva	0,409	PO/U	0,0032				
#5	FW19	Junho 1989	NA					FW10	0,369	PO/U	0,0082
#6	FW20	Junho 1994	NA					FW11	0,365	PO/U	0,1672
#7	FW21	Julho 1980	NA					FW11	0,523	PO/U	0,8583
#8	DZ31	Agosto 1992	SCZ44	Positiva	0,380	PO/U	0,0210				
#9	DZ32	Julho 1994	SCZ46	Negativa	0,167	U/PO	0,0000	SCZ44	0,817	PO/U	0,0359
#10	DZ33	Julho 1995	SCZ44	Positiva	0,384	PO/U	0,0209				
#10	DZ34	Julho 1995	SCZ44	Positiva	0,311	PO/U	0,0229				
#11	DZ35	Julho 1996	SCZ44	Negativa	-0,498	U/PO	0,0000	SCZ46	0,255	PO/U	0,0042
#12	DZ36	Junho 2000	DZ32	Negativa	-0,246	U/PO	0,0000	DZ25	0,622	PO/U	0,1125
#12	DZ37	Junho 2000	DZ32	Negativa	-0,474	U/PO	0,0000	DZ25	0,245	PO/U	0,1360
#13	DZ38	Junho 2000	DZ33	Negativa	-0,194	U/PO	0,0000	DZ32	0,817	PO/U	0,0527
#14	DZ39	Junho 2000	DZ25	Positiva	0,697	PO/U	0,0373				
#14	DZ40	Junho 2000	DZ25	Negativa	-0,102	U/PO	0,0000	DZ32	0,450	PO/U	0,1047
#14	DZ41	Junho 2000	DZ25	Negativa	-0,372	U/PO	0,0000	DZ33	0,728	PO/U	0,0049
#14	DZ42	Junho 2000	DZ25	Positiva	0,716	PO/U	0,0073				
#15	SCZ45	Junho 1988	NA					DZ32	0,267	PO/U	0,3914
#16	SCZ47	Junho 1992	SCZ46	Positiva	0,388	PO/U	0,0295				
#16	SCZ48	Junho 1994	SCZ46	Positiva	0,500	PO/U	0,0317				
#16	SCZ49	Junho 1996	SCZ46	Negativa	0,007	U/PO	0,1508	SCZ44	0,487	PO/U	0,082
#17	SCZ51	Fevereiro 2001	SCZ48	Positiva	0,589	PO/U	0,0110				

a Valor de parentesco genético para o ninhego e o pai registrado nos *studbooks* dos zoológicos; *b* Valor de parentesco genético para o ninhego e o pai mais provável (identificado pelas análises de maternidade realizadas no presente estudo).

Tabela 3.12. Parentesco genético, relacionamento mais provável (*MLR*) e resultado dos testes de hipóteses para pares de ninhegos de colhereiro supostamente aparentados, de acordo com os registros dos zoológicos (#), ou de acordo com a análise genética realizada no presente trabalho (NR), com base em locos de microssatélites. *Q&Gr*: índice de parentesco de Queller & Goodnight (1989); *H₀/H₁*: hipótese nula/ hipótese alternativa; *P*: valor de probabilidade do teste de hipóteses ($P < 0.005$ implica que a hipótese alternativa está mais de acordo com os dados do que a hipótese nula); UR: não-relacionado.

<i>Grupo</i>	<i>Par de ninhegos</i>	<i>Q&Gr</i>	<i>MLR</i>	<i>H₀/H₁</i>	<i>P</i>
#1	FW10 – FW12	0.733	FS	FS/U	0.0243
#10	DZ33 – DZ34	0.483	FS	FS/U	0.0022
#12	DZ36 – DZ37	0.264	FS	FS/U	0.0763
#14	DZ39 – DZ40	0.079	UR	U/FS	0.0859
#14	DZ39 – DZ41	-0.311	UR	U/FS	0.0027
#14	DZ39 – DZ42	0.735	FS	FS/U	0.0127
#14	DZ40 – DZ41	-0.421	UR	U/FS	0.0066
#14	DZ40 – DZ42	-0.072	UR	U/FS	0.0202
#14	DZ41 – DZ42	-0.248	UR	U/FS	0.0048
#16	SCZ47 – SCZ48	-0.083	UR	FS/U	0.8456
#16	SCZ47 – SCZ49	-0.111	UR	FS/U	0.7987
#16	SCZ48 – SCZ49	0.188	UR	FS/U	0.5496
NR	FW10 – FW16	0.577	UR	FS/U	0.2157
NR	FW12 – FW16	0.510	FS	FS/U	0.3100
NR	DZ36 – DZ39	0.597	FS	FS/U	0.0430
NR	DZ36 – DZ42	0.731	FS	FS/U	0.0008
NR	DZ37 – DZ39	0.333	FS	FS/U	0.0962
NR	DZ37 – DZ42	-0.333	UR	U/FS	0.7748
NR	DZ38 – DZ40	0.213	FS	FS/U	0.0500

3.6 Diferenciação genética entre colônias reprodutivas da garça-branca-grande

Os parâmetros de variabilidade genética determinados nas colônias de garça-branca-grande do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul estão apresentados nas tabelas 3.3 e 3.4, respectivamente. Os padrões de distribuição de diversidade, descritos a seguir, foram estimados com base nesses parâmetros genético-populacionais. O procedimento Bayesiano de Rannala e Mountain (1997) para atribuição de indivíduos às populações, baseado em probabilidades genotípicas, revelou que 38,7% dos indivíduos foram corretamente atribuídos às suas colônias de origem. Quando as regiões foram consideradas nessa análise como unidades populacionais, a percentagem de indivíduos corretamente atribuídos subiu para 80,2%.

A abordagem Bayesiana do programa STRUCTURE foi usada para se determinar o número de populações de garça-branca-grande no centro/oeste brasileiro e para se avaliar se era possível detectar estruturação genética em ausência de informação geográfica. Independentemente do modelo de distribuição das frequências alélicas usado, a probabilidade posterior dos dados [$\ln P(D)$] foi maior para $K = 3$ (Fig. 3.2). No entanto, com base nas probabilidades individuais de atribuição de genótipos (Fig. 3.3), o número mais provável de unidades populacionais parece ser dois (Fig. 3.3a). Essa afirmação baseia-se no fato de que com $K = 3$ três das colônias reprodutivas do Pantanal (Tucum, Porto da Fazenda e Praiazinho) foram claramente distinguíveis das colônias reprodutivas do RS (SM, SE, MA e PG), enquanto que os indivíduos de BG e FI (Pantanal) foram assinalados às populações do RS com probabilidades mistas (Fig. 3.3b). Já com $K = 2$ a maioria dos indivíduos foi fortemente atribuída a um dos dois grupos populacionais (Fig. 3.3a), o qual seria indicativo da real estruturação populacional.

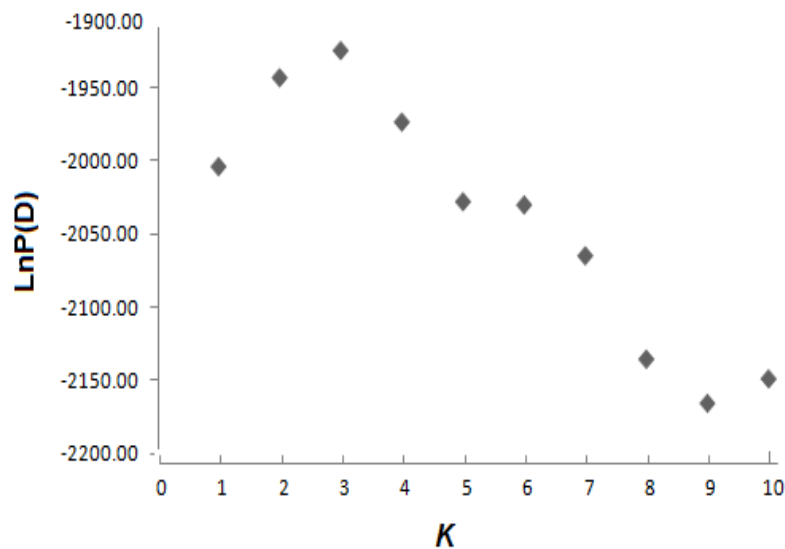


Figura 3.2. Resultado da análise Bayesiana de estruturação genética para a determinação do número de grupos em 142 indivíduos de *Ardea alba* de colônias reprodutivas do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Mostra-se o logaritmo da probabilidade média dos dados $\ln P(D)$ para cada K (1-10) em 20 corridas independentes do programa, indicando que três seria o número mais provável de grupos.

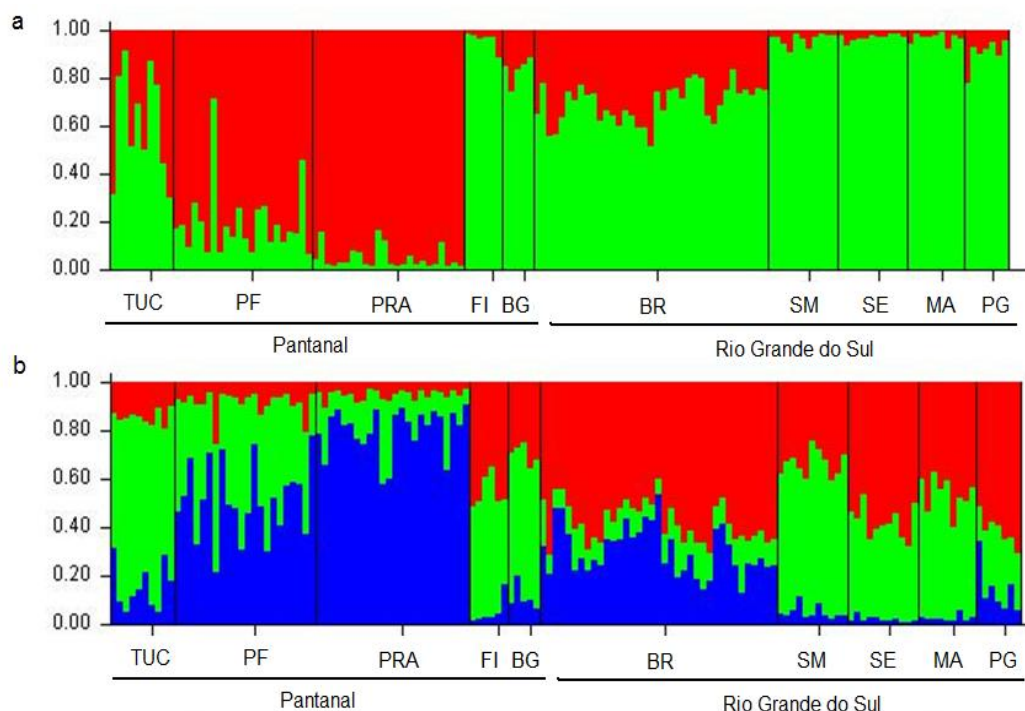


Figura 3.3. Probabilidades de atribuição de indivíduos, baseadas em seis locos de microsatélites, para **a** $K = 2$ e **b** $K = 3$. As barras representam, para cada indivíduo, as probabilidades de pertencimento aos grupos inferidos. Os indivíduos são representados como colunas e as linhas pretas separam as colônias analisadas neste estudo. As abreviações das colônias mostram-se na tabela 2.1.

O valor global de F_{ST} (0,062) foi estatisticamente significativo ($P < 0,001$) após correção para comparações múltiplas, revelando a existência de estruturação genética entre as populações de garça-branca-grande do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul. Os valores de F_{ST} par-a-par entre colônias foram calculados depois de se excluir o loco Ah522 da análise (com evidência de alelos nulos) e aplicando-se a correção para comparações múltiplas. Os valores obtidos revelam diferenciação genética significativa entre PRA e as colônias TUC e PO no Pantanal (Tabela 3.13); entre PRA e todas as colônias do Estado do Rio Grande do Sul; entre PF e todas as colônias do Estado do Rio Grande do Sul, exceto PG, e entre TUC e BR (Tabela 3.10).

Foi desenvolvida, também, uma análise da variância molecular (AMOVA) (Tabelas 3.14, 3.15 e 3.16). Em concordância com o revelado pelo F_{ST} , a AMOVA evidenciou que uma porção significativa da variabilidade genética (5,10%) encontra-se dividida entre as colônias do Estado do Rio Grande do Sul e o Pantanal (Tabela 3.16) e entre as colônias dentro das regiões (2,37%) (Tabela 3.16). A maior

parte da variabilidade genética está distribuída entre indivíduos dentro das colônias (Tabela 3.16).

Tabela 3.13. Valores de F_{ST} par-a-par (acima da diagonal) entre colônias da garça-branca-grande do Pantanal e do Rio Grande do Sul, Brasil. Valores de P (abaixo da diagonal) significativos após correção de Bonferroni mostram-se em negrito [nível ajustado de significância (5%) para comparações múltiplas: 0,001]. Os números de indivíduos analisados por colônia mostram-se em parênteses na diagonal. A abreviação de cada colônia é como se mostra na tabela 2.1.

Colônia	TUC	PF	PRA	FI	BG	BR	SM	SE	MA	PG
TUC	(10)	0,018	0,0002	0,078	0,1089	0,0002	0,0026	0,0593	0,0182	0,0017
PF	0,0311	(22)	0,0051	0,002	0,0940	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0017
PRA	0,1068	0,0304	(21)	0,0002	0,0033	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0004
FI	0,0571	0,1339	0,2067	(6)	0,6233	0,0228	0,5084	0,8788	0,4497	0,3911
BG	0,0012	0,0601	0,1224	-0,0247	(5)	0,3202	0,5871	0,7266	0,4304	0,2888
BR	0,0331	0,0326	0,0753	0,0546	0,0003	(37)	0,0024	0,0346	0,002	0,0944
SM	0,0653	0,1207	0,1823	0,0206	-0,0146	0,0415	(11)	0,7800	0,5026	0,2569
SE	0,0362	0,1144	0,1883	-0,018	-0,0258	0,0342	-0,0172	(11)	0,8515	0,7311
MA	0,0436	0,1218	0,1803	0,0125	-0,0228	0,0365	-0,0075	-0,0201	(9)	0,2426
PG	0,0524	0,0794	0,1365	-0,0041	0,0157	0,0171	0,0577	0,0104	0,0177	(7)

Tabela 3.14. Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para indivíduos de garça-branca-grande amostrados em cinco colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro. Fontes da variação, graus de liberdade (*g.l.*), percentagens da variância explicadas por uma componente específica, estatística *F* e probabilidades (*P*) dos testes para se detectar desvios da hipótese nula de não diferença na percentagem de variabilidade genética entre colônias com relação à população total.

Fonte da variação	<i>g.l.</i>	% Variância	Estatística <i>F</i>	<i>P</i>
Entre colônias	4	13%	0,126	0,010
Dentro das colônias	62	87%		
Total	66	100%		

Tabela 3.15. Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para indivíduos de garça-branca-grande amostrados em cinco colônias reprodutivas do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Fontes da variação, graus de liberdade (*g.l.*), percentagens da variância explicadas por uma componente específica, estatística *F* e probabilidades (*P*) dos testes para se detectar desvios da hipótese nula de não diferença na percentagem de variabilidade genética entre colônias com relação à população total.

Fonte da variação	<i>g.l.</i>	% Variância	Estatística <i>F</i>	<i>P</i>
Entre colônias	4	4%	0,039	0,010
Dentro das colônias	70	96%		
Total	74	100%		

Tabela 3.16. Análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para indivíduos de garça-branca-grande amostrados em colônias reprodutivas do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Fontes da variação, graus de liberdade (*g.l.*), percentagens da variância explicadas por uma componente específica, estatística *F* e probabilidades (*P*) dos testes para se detectar desvios da hipótese nula de não diferença na percentagem de variabilidade genética entre colônias e regiões com relação à população total.

Fonte da variação	<i>g.l.</i>	% Variância	Estatística <i>F</i>	<i>P</i>
Entre regiões	1	2,37%	0,074	0,0000
Entre colônias dentro de regiões	8	5,10%	0,052	0,0000
Dentro das colônias	274	92,53%	0,023	0,0244
Total		100%		

A figura 3.4 mostra um gráfico das distâncias genéticas corrigidas par-a-par [$F_{ST}/(1 - F_{ST})$] versus a distância geográfica entre as colônias amostradas no Pantanal e Estado do Rio Grande do Sul. Não foi encontrada correlação significativa entre as medidas de distância geográfica e de distância genética pela análise de RMA

(teste de Mantel), resultado esse que indica que a distância geográfica entre as colônias não pode, por si só, explicar a distância genética observada entre elas ($r^2 = 0,043$, $P = 0,2980$).

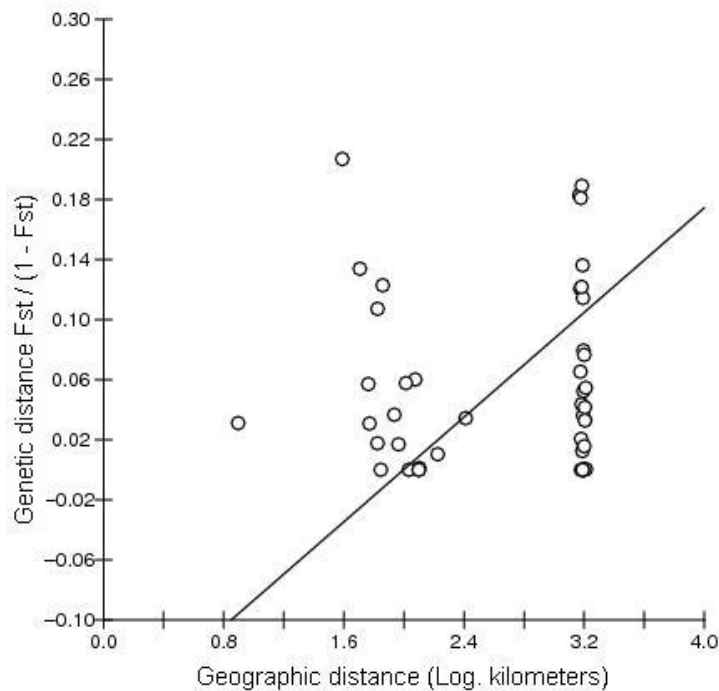


Figura 3.4. Relação entre a distância genética par-a-par (F_{ST}) e a distância geográfica, em quilômetros, entre colônias reprodutivas de *Ardea alba* do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (teste de correlação de Mantel, $r^2 = 0,0433$, $P = 0,2980$).

O teste de Wilcoxon para detecção de sinais genéticos de gargalos populacionais, realizado assumindo um modelo misto de mutação dos microssatélites, não revelou nenhuma evidência genética de redução de tamanho nas populações analisadas (todos os valores de $P > 0,05$). O teste baseado na distribuição das frequências alélicas diferiu significativamente do esperado para populações estáveis, mostrando diferença significativa do modelo de distribuição com forma de “L” nas colônias TUC e FI (Pantanal) e em PG (Estado do Rio Grande do Sul). O índice médio de Garza-Williamson foi 0,477 em TUC e 0,499 em FI, e 0,548 em PG.

Capítulo 4
Discussão

Estudos que objetivam caracterizar o sistema de acasalamento dos indivíduos nas populações com base na informação genética geralmente comparam os genótipos dos adultos (par reprodutivo) com os genótipos da progênie da qual eles cuidam. É possível inferir se a progênie pode ser explicada pelos genótipos dos adultos amostrados junto a ela por meio dessa comparação baseada nas leis Mendelianas de herança. No caso dos genótipos da progênie não serem compatíveis com os dos supostos pais, outros adultos estão envolvidos na produção da mesma. Esse tipo de estudo não tem sido realizado em populações naturais de Ciconiiformes, devido à dificuldade de se coletar amostras de famílias completas para genotipagem, pois os adultos de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande se afastam dos ninhos quando se sentem ameaçados. Esse comportamento é observado, por exemplo, quando pesquisadores entram nas colônias reprodutivas para realizar a coleta de amostras. Nessa ocasião os adultos voam para longe dos ninhos, inviabilizando a obtenção das amostras biológicas dos mesmos. Na proposta inicial deste estudo, foi sugerido o emprego de métodos de amostragem não-invasiva, como, por exemplo, a coleta de penas dos adultos nos ninhos, para se obter amostras de famílias completas, já que os ninhegos seriam amostrados com a coleta de sangue ou penas em crescimento. Esse método de amostragem, no entanto, não funcionou na prática. O acesso aos ninhos em colônias reprodutivas de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande restringe-se ao período em que os ninhegos apresentam de 2 a 4 semanas e, nessa época, não mais encontramos penas dos adultos nos ninhos. O esfregaço da superfície externa dos ovos para obtenção de DNA materno (SCHMALTZ et al., 2006), é outra técnica cuja viabilidade poderá ser testada nas colônias reprodutivas brasileiras de Ciconiiformes. A amostragem não-invasiva através do esfregaço dos ovos requer o acesso às colônias reprodutivas logo após a oviposição (1 a 2 dias) e, nesse período, a entrada dos pesquisadores nas colônias causa maiores distúrbios do que no período em que ninhegos possuem de 2 a 4 semanas. Soma-se a isto o fato de predadores aéreos (por ex., o Caracará, *Caracara plancus*; o urubu-de-cabeça-preta, *Coragyps atratus*; o gavião-preto, *Buteogallus urubitinga*) estarem presentes na maioria das colônias reprodutivas brasileiras de aves aquáticas, em especial no Pantanal (BOUTON, 1999). Essas aves predam ovos e ninhegos mais novos. Segundo Bouton (1999) o gavião-preto pode agir ainda na presença dos adultos nos ninhos, enquanto que o caracará e o urubu agem quando os adultos se afastam dos ninhos. Como os adultos deixam os ninhos desprotegidos se houver presença de humanos na colônia, a entrada dos pesquisadores nas colônias logo após a oviposição

poderá aumentar o risco de predação dos ovos. Assim, esse risco maior de perda de ninhos poderá inviabilizar a aplicação do método do esfregaço dos ovos. Além disso, esta técnica requer a manipulação dos ovos, operação essa que requer a permanência dos pesquisadores nas colônias por algum tempo, estendendo o período em que os ovos estariam expostos não só aos predadores, mas também às condições climáticas adversas (calor ou frio em excesso). De qualquer maneira, a real viabilidade da aplicação do método de esfregaço de ovos em colônias reprodutivas de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande ainda precisa ser avaliada. Testes futuros em populações naturais dessas espécies poderão ser prioritariamente realizados onde a ameaça de predadores aéreos é menor, como nas colônias da América do Norte.

No presente estudo, procurou-se inferir sobre o sistema genético de acasalamento, do colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande, sem informação genética dos parentais, examinando-se o grau de relacionamento genético entre ninhegos amostrados dentro dos mesmos ninhos. O método empregado apresentou limitações (discutidas na seção 4.1), mas permitiu identificar ninhegos não-relacionados dentro dos ninhos de colhereiro e cabeça-seca, amostrados em diferentes colônias reprodutivas (ver seção 4.2). As mesmas análises realizadas em garça branca grande, detectaram, com suporte estatístico, apenas a presença de irmãos-completos dentro dos ninhos (ver seção 4.2). As implicações dos nossos achados para o sistema genético de acasalamento das espécies estudadas discutem-se na seção 4.2.

As ferramentas da genética molecular foram também utilizadas para verificar as relações de parentesco entre adultos e filhotes e entre supostos irmãos em famílias de colhereiro mantidas em cativeiro, em zoológicos dos EUA (seção 4.3). Por meio de análises de atribuição de paternidade e maternidade e de parentesco entre ninhegos foram detectados erros nos registros dos zoológicos, resultantes da identificação de vínculos biológicos com base nas observações comportamentais. Foram identificados acasalamentos entre indivíduos aparentados que não tinham sido identificados pelo pessoal dos zoológicos. Com relação a isso, o problema pode estar na forma como estas observações foram feitas. Se as observações foram em sessões, e não contínuas, pode ser que a cópula fora do par não tenha sido identificada. As implicações dos nossos achados para a manutenção da diversidade genética das populações de cativeiro discutem-se na seção 4.3.

Para subsidiar as análises específicas de parentesco genético, foram estimados parâmetros genético-populacionais nas três espécies estudadas. Na garça-branca-grande foi realizado um estudo mais aprofundado de genética de populações, que permitiu identificar o número de grupos genéticos que compõem a população analisada, atribuir os indivíduos às populações de origem e detectar diferenciação genética entre colônias reprodutivas do Pantanal e do Rio Grande do Sul (ver seção 4.4). As possíveis causas e implicações dessa estruturação genética para a conservação dessas populações discutem-se na seção 4.4.

4.1 Validação e avaliação das limitações dos métodos empregados na determinação do parentesco genético em populações naturais de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande

A estimativa da probabilidade dos dados (genótipos) sob diferentes categorias de relacionamento foi selecionada por ser uma estratégia valiosa para se determinar o relacionamento entre pares de ninhegos em populações naturais de aves (BLOUIN, 2003). A essa abordagem foi acrescida a análise de probabilidade e de máxima verossimilhança (conduzidas com os programas CERVUS e ML-RELATE) que permitem extrair a maior quantidade de informação possível dos genótipos observados (BLOUIN, 2003; MILLIGAN, 2003; WEIR et al., 2006). Os métodos de verossimilhança e de fracionamento (como os usados na análise de parentesco dos colhereiros de cativeiro) compensaram as possíveis deficiências do conjunto de dados disponível (JONES E ARDREN, 2003). Modificações recentes e melhoras nas equações para o cálculo dos estimadores de parentesco e das probabilidades de relacionamentos foram incorporadas nos programas de análise utilizados neste estudo (KALINOWSKI et al., 2007). Ressalta-se ainda que as abordagens por simulação (como as conduzidas com o programa IREL e CERVUS) foram essenciais para estabelecer significância estatística nas análises de parentesco e na atribuição de paternidade (QUELLER E GOODNIGHT, 1989; MARSHALL, 1998).

O desempenho dos estimadores de parentesco genético tem sido avaliado independentemente por vários autores que utilizaram organismos com diversos sistemas de acasalamento e estruturas sociais, assim como diversos conjuntos de dados (simulações computacionais e dados empíricos) e estruturas genético-populacionais

diferentes (LYNCH E RITLAND, 1999; RITLAND, 2000; BLOUIN, 2003; MILLIGAN, 2003; VAN DE CASTEELE et al., 2001; CSILLÈRY et al., 2006). Nesses estudos, foi observado que o desempenho dos estimadores é influenciado pelo número de locos, pelo polimorfismo dos mesmos e pelo padrão de distribuição das frequências alélicas na população de referência. Estudos de genética de populações e parentesco em populações naturais são limitados, na maioria das vezes, pela inexistência de um número desejável de marcadores genéticos espécie-específicos (BLOUIN, 2003). No grupo das aves, em particular, existe um número limitado de locos variáveis de microssatélites e a abundância de sequências de microssatélites nos genomas das aves é menor do que, por exemplo, nos mamíferos (PRIMMER et al., 1997). A hipótese para explicar essa menor ocorrência de microssatélites compara as aves com o ancestral comum dos amniotos (SHEDLOCK et al., 2007) e propõe ter havido uma perda geral de sequências repetitivas na linhagem das aves, o que teria levado à evolução de um genoma “minimalista” do grupo (BRANDSTRÖM E ELLEGREN, 2008).

Quando não há marcadores específicos da espécie de interesse disponível para uso, uma estratégia interessante é o uso de marcadores heterológos. No presente estudo foram usados em garça-branca-grande (*Ardea alba*) locos descritos para *Ardea herodias* (MCGUIRE E NOOR, 2002), padronizados por Souza (2008). O uso desse tipo de marcadores implica, às vezes, numa maior probabilidade de incidência do fenômeno dos “alelos nulos” (CALLEN et al., 1993). Esse fenômeno é um obstáculo metodológico que, se não identificado, pode dificultar a interpretação dos dados genético-populacionais e até induzir conclusões errôneas nas análises de paternidade e parentesco (WAITS et al., 2001; HOFFMAN E AMOS, 2005). A ocorrência de alelos nulos é causada geralmente por um evento mutacional no sítio de hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA molde (ISHIBASHI et al., 1996), levando a uma falha durante a amplificação por PCR de um dos alelos dos indivíduos e à identificação errônea de heterozigotos como homozigotos. A frequência desse evento e o seu efeito nas estimativas de parentesco podem ser avaliados supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg na população analisada (BROOKFIELD, 1996; KALINOWSKI, 2006).

A análise dos microssatélites de *Ardea herodias*, neste estudo, revelou evidências de alelos nulos no loco Ah522. Esse loco é o mais informativo do conjunto de marcadores disponíveis em *Ardea alba*, pois apresentou o maior número de alelos (16) (ver mais abaixo nesta seção). Segundo Wagner et al. (2006), o cálculo das

estimativas de parentesco genético será mais preciso com inclusão dos locos com alelos nulos nas análises, do que excluindo esses dados. A justificativa para a inclusão desses locos se baseia na quantidade de informação que eles podem aportar à análise (WAGNER et al., 2006). Para incluir locos com alelos nulos nas análises de parentesco, entretanto, devem ser realizadas correções adequadas nos métodos empregados. No presente trabalho, a análise de parentesco foi conduzida com um programa que já possui a correção metodológica correspondente (programa ML-Relate) e cujo uso foi validado por estudos com diversos organismos e conjuntos de dados (KALINOWSKI et al., 2006). Para verificar se o loco Ah522 não estaria causando estimativas enviesadas de parentesco, calculou-se também o parentesco entre ninhegos excluindo-se esse loco da base de dados. A comparação entre os resultados obtidos com e sem o loco Ah522 revelou que, embora os valores absolutos de parentesco genético par-a-par tenham se alterado em valor absoluto, essas mudanças não implicaram em mudanças na classificação dos pares de ninhegos. Concluiu-se, portanto, que o uso do loco Ah522, mesmo com alelos nulos, não alterou nossas inferências sobre parentesco genético em populações naturais da garça-branca-grande.

A análise do polimorfismo nos locos de microssatélites usados no colhereiro (cinco locos), cabeça-seca (nove) e garça-branca-grande (sete) revelou que as populações das três espécies apresentaram entre 27 e 50 alelos, com uma média de 3 alelos por loco no cabeça-seca, 7,2 no colhereiro e 7,1 na garça-branca-grande (Tabelas 3.1 a 3.4). O loco mais polimórfico (Ah522, garça-branca-grande) apresentou 16 alelos. Duas populações se apresentaram monomórficas na garça-branca-grande, uma para o loco Ah211 e a outra para o loco Ah630. Desconsiderando essas populações, a H_E média por loco variou, em todas as populações e espécies, entre 0,086 e 0,938. A probabilidade de exclusão dos marcadores usados nas três espécies foi alta (0,95% - 0,99%) e semelhante à reportada em outros estudos de parentesco, paternidade e sistemas de acasalamento (por exemplo, WHITTINGHAM et al., 2003; CHIVER et al., 2008).

Para maximizar o número de locos de microssatélites nos estudos futuros de genética de populações e parentesco para colhereiro e garça-branca-grande poderão ser incluídos alguns dos 23 locos recentemente descritos por Yeung et al. (2009), em *Platalea minor* (Ciconiiformes: Treskhiornithidae). De acordo com esses pesquisadores, os locos apresentaram entre três e 18 alelos em *P. minor* e dez deles amplificaram em

um indivíduo de *Ardea alba*. Poderão ainda ser incluídos alguns dos 12 locos de microssatélites descritos na garça *Egretta rufescens* que possuem entre 2 e 10 alelos por loco (A. Hill e C. Green, comunicação pessoal).

O grau de parentesco médio da população de referência (*background relatedness*) também influencia a estimativa de relacionamento genético entre indivíduos além do número e do grau de polimorfismo dos marcadores moleculares usados (CSILLÉRY et al., 2006). Nas simulações conduzidas neste estudo para avaliar a percentagem de variância do estimador que pode ser explicada pela variância de parentesco nas populações estudadas verificou-se que até 27,70% da variância do estimador pode corresponder à variação nas populações (ver primeiro parágrafo da seção 3.2). Esse nível de variância intrínseca parece ser característico do estimador de Queller e Goodnight (1989) (CSILLÉRY et al., 2006). O aumento do número de marcadores moleculares usados nas estimativas de parentesco pode abaixar um pouco a variância dos estimadores, mas a verdadeira composição da amostra, em termos da proporção de indivíduos com diferentes categorias de relacionamento, estabelece um limite por cima do qual mesmo analisando um grande número de marcadores, a variância não diminuirá (CSILLÉRY et al., 2006). Determinar a percentagem da variância do estimador explicada pela verdadeira natureza do parentesco da amostra é um passo importante quando o valor de parentesco genético par-a-par vai ser a única, ou a principal, variável explanatória na análise.

Em situações em que o número e/ou o grau de polimorfismo dos marcadores genéticos é limitado, como no presente estudo, uma análise do desempenho dos estimadores de parentesco genético no contexto específico das populações que estão sendo estudadas se faz necessária e é importante para ajudar a classificar melhor os indivíduos de acordo com o seu grau de parentesco (BLOUIN, 2003; VAN DE CASTEELE et al., 2001; RUSSELLO E AMATO, 2004). As análises de desempenho dos índices de parentesco realizada no contexto do nível de informação genética disponível nas amostras de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca grande revelaram que o poder dos marcadores utilizados para distinguir entre categorias adjacentes de relacionamento (UR-HS e HS-FS) foi relativamente baixo (taxas esperadas de sucesso entre 64,4% e 72,5%, como inferido da Tabela 3.6). Por outro lado, as taxas de sucesso esperadas para se identificar indivíduos não-relacionados foram maiores (77,8% - 87,8%, como inferido da Tabela 3.6), o que resulta importante no contexto da nossa

análise, pois as nossas inferências subsequentes estiveram baseadas na presença de ninhegos não-relacionados nos ninhos. Os valores obtidos para taxa de sucesso na distinção de pares de ninhegos não-relacionados foram semelhantes aos reportados por Van Horn et al. (2008) num estudo sobre a habilidade de se inferir relacionamentos biológicos a partir do índice de parentesco par-a-par. Nesse estudo, foi calculado o índice de parentesco genético de Queller e Goodnight (1989) para indivíduos cuja genealogia era conhecida, tendo os autores encontrado entre 88,34% e 100% de sucesso na detecção de indivíduos não-relacionados na amostra. Em estudos independentes, Van Horn et al (2008) e Csilléry et al. (2006), avaliaram o desempenho dos estimadores de parentesco genético em populações de vertebrados usando simulações e concluíram que, quando marcadores moleculares são utilizados nas estimativas de parentesco, erra-se menos na classificação de indivíduos não relacionados do que na identificação dos pares relacionados em primeiro grau. Podemos afirmar, portanto, que a partir das evidências obtidas no presente estudo e com base no demonstrado anteriormente por outros autores (VAN HORN et al., 2008; CSILLÉRY et al., 2006) que mesmo com o uso de um conjunto limitado de microssatélites pode-se ter bom suporte estatístico para os pares de ninhegos não-relacionados da amostra estudada.

Conforme o discutido acima, o valor de parentesco genético par-a-par possibilita a classificação dos pares de ninhegos como não-relacionados com bom suporte estatístico. Apesar da taxas altas de sucesso na classificação dos pares de ninhegos, optou-se por um critério mais rigoroso a fim de minimizar a possibilidade de erro na classificação dos ninhegos, uma vez que as inferências subsequentes sobre os sistemas genéticos de acasalamento e comportamento reprodutivo das espécies estudadas estão embasadas nesses resultados. Para tal fim, incluíram-se outros parâmetros além das estimativas do parentesco genético par-a-par na classificação da categoria de relacionamento entre os pares de ninhegos amostrados. O uso de diferentes metodologias na classificação dos indivíduos em categorias de relacionamento tem sido estimulado (VAN HORN et al, 2008), pois embora possa ser um critério exigente, provê maior confiança nos relacionamentos inferidos e embasa melhor as conclusões subsequentes. O critério usado neste trabalho incluiu a concordância entre os resultados obtidos por metodologias baseadas em abordagens teóricas diferentes (máxima verossimilhança, probabilidades conjuntas e probabilidades simples). Como a aplicação desse critério, as proporções de pares de ninhegos classificados numa certa categoria de

relacionamento neste trabalho foram relativamente baixas: colhereiros: 25,17%, cabeça-seca: 14,95%, garça-branca-grande: 36,23%. Essas baixas proporções revelaram que existiram discordâncias entre as metodologias empregadas com relação à identificação do relacionamento entre ninhegos, possivelmente devidas ao limitado poder do conjunto de marcadores moleculares utilizados neste estudo.

De forma geral, os resultados obtidos no presente estudo ressaltam a importância de uma análise cuidadosa dos parâmetros genético-populacionais, assim como do desempenho do conjunto de marcadores genéticos usados, no contexto específico da amostra disponível, para depois se elaborar hipóteses a respeito de aspectos importantes da biologia dos organismos (VAN HORN et al., 2008).

4.2 Parentesco entre ninhegos dentro dos ninhos e implicações para os sistemas genéticos de acasalamento do colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande

O presente trabalho revelou, através do uso de ferramentas genéticas, a presença de ninhegos não-relacionados dentro dos ninhos de colhereiro (6,12% dos pares analisados) e de cabeça-seca (11,34%) (Fig. 3.1). A existência de meio-irmãos foi detectada só em ninhos de colhereiro (1,36%). Embora tenha havido evidência genética de pares de ninhegos não-relacionados também em ninhos de garça-branca-grande, esse resultado não apresentou suporte estatístico suficiente segundo o critério de classificação de pares aplicado neste trabalho. Considerando o rigor na classificação dos pares usado nesse estudo, pode-se inferir que há, de fato, ocorrência de pares não-relacionados dentro dos ninhos nas populações naturais de cabeça-seca e de colhereiro. A quantificação desse padrão em cada espécie, entretanto, pode ter sido distorcida pelas limitações do número de marcadores. Estariam esses dados refletindo o padrão dos sistemas de acasalamento dessas espécies ou refletindo o comportamento desses ninhegos? As coletas foram realizadas quando os ninhegos não tinham muita mobilidade e não temos evidência de que ninhegos de diferentes ninhos tivessem sido misturados durante a amostragem em campo. Além disso, na espécie em que foi encontrada maior proporção de ninhegos não aparentados, o cabeça-seca, os ninhegos permanecem nos ninhos. Os ninhegos de colhereiro apesar de terem maior mobilidade do que os de cabeça-seca, na idade da amostragem não tinham mobilidade suficiente

para sair dos seus ninhos e pular para dentro de ninhos vizinhos. Descartada a hipótese de mistura de ninhegos de ninhos diferentes, a ocorrência de ninhegos não-relacionados e meio-irmãos nos mesmos ninhos pode ser interpretada como resultante de um sistema de acasalamento genético diferente da monogamia nessas espécies. Parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) e paternidade extra-par (PEP) são dois comportamentos reprodutivos que podem explicar nossos achados. De qualquer forma, como a frequência de UR detectados foi baixa, não invalida a monogamia como estratégia adotada pela espécie.

Apesar de nem todas as cópulas extra-par (CEP) resultarem em PEP, uma fração delas pode ser bem sucedida e resultar em fertilização e produção de progênie. Observações comportamentais em algumas espécies de Ciconiiformes na natureza dão suporte à ocorrência de cópulas extra-par: *Platalea leucorodia* (AGUILERA E ÁLVAREZ, 1989); *Ardea cinerea* (RAMO, 1993; GLADSTONE, 1979), *Ardea alba* (WIESE, 1976; KREBS et al., 2004), *Eudocimus albus* (KUSHLAN, 1973; FREDERICK et al., 1987), *Bulbucus ibis* (FUYIKOA E YAMAGISHI, 1981; MCKILLIGAN, 1990; SCHWAGMEYER et al., 1999), *Eudocimus ruber* (OLMOS E SILVA E SILVA, 2003; ELBIN E BURGER, 2005) e *Egretta eulophotes* (WEI et al., 2005).

Poucos estudos baseados em observações comportamentais têm sido realizados para investigar ocorrência de PNI nos Ciconiiformes, pois para identificar um evento de parasitismo é preciso um investimento muito alto no trabalho de campo. Os ovos e os filhotes resultantes de um evento de parasitismo intra-específico são muito difíceis (e em alguns casos impossíveis) de serem distinguidos morfológicamente dos filhos de um determinado casal de aves. Não se tem até o momento, por exemplo, estudos que avaliem se é possível a distinção morfológica entre ovos parasíticos e não parasíticos nas espécies enfocadas nesse estudo. No cabeça-seca, há registros de ninhadas maiores do que a média e de ninhadas adicionais (ou seja, filhotes que nasceram uma ou duas semanas depois da primeira eclosão) e essas observações têm sido interpretadas como evidência de parasitismo de ninho intraespecífico (COULTER et al, 1999). Na mesma espécie, ninhadas de até quatro ninhegos de tamanhos bem distintos entre um e outro já foram observadas nas colônias reprodutivas do Amapá (Brasil) (S. N. Del Lama, com pessoal). Essas diferenças de tamanho entre ninhegos no mesmo ninho têm sido interpretadas em outras espécies de aves como evidência indireta

da ocorrência tanto de PNI quanto de PEP (ÅDAHL et al., 2004; PAILLISSON et al., 2008).

Apesar das dificuldades associadas ao estudo do PNI na natureza, alguns estudos que utilizaram metodologias moleculares conjuntamente com técnicas de campo e observações comportamentais têm revelado que esse comportamento é mais comum do que se pensava até pouco tempo atrás (LYON E EADIE, 2008; EADIE et al, 2010). Mais de 230 espécies de aves mostram esse tipo de comportamento (EADIE 1998; YOM-TOV 2001) sendo especialmente comum nos Anseriformes (SAYLER, 1992) e nos Ciconiiformes (HOOGLAND E SHERMAN, 1976; ROHWER E FREEMAN, 1989; BROWN E BROWN, 1996; YOM-TOV, 2001). Observações comportamentais na natureza já evidenciaram a existência de parasitismo de ninho intraespecífico em seis espécies coloniais de Ciconiiformes: *Ardea purpurea*, *Ardeola ralloides*, *Egretta rufescens*, *Ciconia maguari*, *Eudocimus albus* (FREDERICK, 1986; KUSHLAN E BILDSTEIN, 1992; YOM-TOV, 2001), *Eudocimus ruber* (HASS, 1996; OLMOS E SILVA E SILVA, 2003). O PNI foi também reportado em outras aves aquáticas, como os patos (*Aix sponsa*, 96% dos ninhos com PNI, SEMEL E SHERMAN, 1986) e nas andorinhas-do-mar (*Chlidonias hybrida*, até 26,7% das ninhadas parasitadas numa colônia, PAILLISON et al., 2008).

Foi também revelado no presente trabalho que os valores médios de parentesco observados entre ninhos nas populações naturais de cabeça-seca do Pantanal e do Amapá diferiram significativamente dos observados dentro dos ninhos. Esse padrão de parentesco está concordante com a presença de pares de ninhegos não-relacionados dentro dos ninhos (como se discute mais abaixo nesta seção). Em colhereiro, os valores médios de parentesco observados entre e dentro dos ninhos também diferiram significativamente. Em colhereiro, foi observada uma tendência de diferenciação entre regiões quanto ao valor médio de parentesco observado dentro dos ninhos, com valores mais próximos do esperado para irmãos-completos no Pantanal, meio-irmãos no Amapá e não-relacionados no Rio Grande do Sul. Essa tendência apontaria para a existência de uma variação intraespecífica no sistema genético de acasalamento do colhereiro, o que já foi observado para outras espécies de aves (GRIFFITH, 2002; NEUDORF, 2004). Essa variação intraespecífica pode ser uma resposta comportamental frente a pressões ambientais distintas nas regiões onde as populações se reproduzem (HAU, 2008). Estudos futuros poderão auxiliar na

investigação mais profunda da existência de variação intraespecífica relacionada a diferenças ambientais no colhereiro.

4.2.1 Fatores que contribuem para uma maior ocorrência de paternidade extra-par (PEP) e parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) em Ciconiiformes

As espécies de Ciconiiformes estudadas no presente trabalho exibem características que podem não favorecer a monogamia genética. Uma dessas características é a reprodução em colônias. A “colonialidade” em aves pode ser definida como a reprodução de um grupo de indivíduos num espaço mais ou menos centralizado, do qual os residentes partem, de tempos em tempos, à procura de alimento (BROWN E BROWN, 2001). Este tipo de comportamento social é o segundo mais comum nas aves (BROWN E BROWN, 2001) e é especialmente comum nas aves aquáticas como os Ciconiiformes. A reprodução em colônias aumenta as oportunidades de alguns integrantes do grupo usufruir dos esforços reprodutivos de outros da mesma espécie (BROWN E BROWN, 2001; GEFFEN E YOM-TOV, 2001; PAILLISSON et al., 2008; LYON E EADIE, 2008). As probabilidades de que um indivíduo possa endereçar os seus cuidados parentais à prole de outro indivíduo não-aparentado são maiores nas colônias do que em outros tipos de sistemas sociais (BROWN E BROWN, 1996). O “cuidado parental mal endereçado” pode ocorrer dentro de colônias de aves, por exemplo, quando há cópula extra-par (CEP, i.e., acasalamento com parceiros distintos dos parceiros sociais) com resultante paternidade extra-par (PEP) e quando há parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) (BROWN E BROWN, 2001). Esses comportamentos têm sido comumente explicados do ponto de vista do indivíduo “parasitado”, mas podem desempenhar um papel muito importante na evolução do comportamento social de tipo “agrupamento” (BROWN E BROWN, 2001).

A proposta de que a cópula extra-par ocorre com maior frequência em espécies com comportamento reprodutivo colonial do que em espécies solitárias é antiga (GLADSTONE, 1979; MØLLER, 1985). Estudos mais recentes baseados tanto em observações comportamentais quanto em evidências genético-moleculares, têm confirmado essa hipótese (PAILLISONS et al., 2008). A colonialidade contribuiria, nesse caso, porque oferece uma maior disponibilidade de parceiros reprodutivos ativos

(MØLLER E BIRKHEAD 1992; YOM-TOV, 2001), reduzindo os custos individuais resultantes da procura de parceiros reprodutivos distintos do parceiro social e favorecendo a CEP (WESTNEAT et al., 1990; THUSIUS, 2001). A nidificação em colônias apresenta muitas oportunidades para os indivíduos engajarem-se em cópulas extra-par e a observação de que a CEP é mais freqüente em espécies coloniais sugere que a maior proximidade espacial dos potenciais parceiros sexuais nas espécies favorece esse comportamento (WESTNEAT E SHERMAN, 1997; BROWN E BROWN, 2001). A freqüência de CEP geralmente aumenta quanto maior for o tamanho da colônia e sua densidade (HOOGLAN E SHERMAN, 1976; MØLLER 1985; BROWN E BROWN, 1996; MØLLER E BIRKHEAD, 1993). A CEP pode resultar em custos e benefícios para diferentes indivíduos dentro de uma colônia; o estudo de como machos e fêmeas podem se beneficiar da CEP e de como essas vantagens podem explicar a evolução da colonialidade tem sido intenso (BROWN E BROWN, 1996). O argumento da redução dos custos reprodutivos associados à CEP nas colônias foi proposto para explicar o grau alto de CEP observado numa população espanhola da garça *Ardea cinerea* (Ciconiiformes) (RAMO, 1993). A importância de se estudar a CEP em espécies coloniais com ferramentas genético-moleculares se deve ao fato de que só com esses dados genéticos será possível definir se a CEP resultou em PEP.

Outro fator que pode promover tanto CEP quanto PNI em aves coloniais e que também está associado à colonialidade é o agrupamento dos integrantes da colônia num espaço limitado (BIRKHEAD E MØLLER, 1992; STUTCHBURY E MORTON, 1995). Isto porque a colonialidade implica em associação de indivíduos de uma mesma espécie e do uso de um espaço comum para a reprodução delimitada no tempo. Assim quando se estabelece uma colônia reprodutiva, pode-se incrementar a incidência de CEP. Esse argumento foi proposto para explicar as taxas altas de CEP e PEP no tiziu (*Volatinia jacarina*) um Passeriforme tropical socialmente monogâmico (CARVALHO et al., 2006). O tiziu, assim como o colhereiro, o cabeça-seca e a garça-branca-grande, reproduz-se durante períodos de tempo limitados, determinados pela disponibilidade alimentar. Essa característica favorece o agrupamento de indivíduos em territórios também delimitados – a colônia no caso das aves aquáticas e os locais de forrageio no caso do tiziu – e aumenta as chances de CEP.

As colônias reprodutivas brasileiras de cabeça-seca do Pantanal foram estimadas em até 10.728 indivíduos (MORRISON et al., 2008), com ninhos distantes

uns dos outros de 1 -3 m. (Del Lama, dados não publicados). Nas colônias dos EUA, já foram observados até 25 ninhos numa só árvore (COULTER et al., 1999), número semelhante ao observado em colônias reprodutivas brasileiras (S. N. Del Lama et al., dados não publicados). O agrupamento de ninhos em espaços limitados aumenta a chance das fêmeas colocarem ovos em ninhos de outras fêmeas da mesma espécie. Dados disponíveis para uma colônia reprodutiva do Rio Grande do Sul reportam 2.500 casais de oito espécies diferentes de Ciconiiformes nidificando numa área de dois hectares, o que ilustra a situação de muitos casais num pequeno espaço de colônia (GIANUCA et al., 2009). Nessas situações de agrupamento, a competição pelo recurso de nidificação pode ser alta, levando a que mais indivíduos possam ter suas chances de reprodução limitadas. Aqueles indivíduos que não foram bem sucedidos na nidificação podem tentar copular com parceiros sociais de outros indivíduos e depois colocar seus ovos em ninhos alheios. Portanto, o agrupamento delimitado no tempo e no espaço, associado à alta competição por recursos, pode favorecer tanto a CEP quanto o PNI.

Outro fator que contribui para ocorrência de PEP e PNI diz respeito à sincronia “em escala fina” dos indivíduos dentro da colônia. Quando uma colônia se estabelece, percebe-se que há entre seus integrantes uma maior sincronia entre os indivíduos quanto ao ciclo da reprodução, porém nem todos os indivíduos colocarão seus ovos no mesmo exato momento, logo, sempre haverá certa assincronia dentro da colônia. Dados quantitativos detalhados com relação à sincronia dos integrantes das colônias brasileiras de colhereiro, cabeça-seca e garça-branca-grande precisam ser ainda analisados. Em cabeça-seca há dados reportados nas colônias da América do Norte que sugerem que as colônias com maior número de indivíduos permanecem ativas durante períodos mais longos e são, portanto, menos sincrônicas (no sentido “fino”) do que as colônias menores (KAHL, 1964). Rodgers (1987) encontrou que quanto maior o número de integrantes, menor a sincronia das colônias em termos de desvio padrão no tempo de eclosão. No presente trabalho, não foram detectadas diferenças significativas na percentagem de indivíduos não-relacionados encontrados dentro dos ninhos nas colônias de cabeça-seca e colhereiro do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul (comparações intraespecíficas, ver seção 3.4). Esse resultado sugere que, se houver alguma diferença entre essas colônias com relação à sincronia, isso não se refletiu no nível de PNI nas mesmas. De qualquer maneira, para esclarecer se há relação entre a

duração do ciclo reprodutivo e a frequência de PNI e/ou CEP nessas espécies, estudos detalhados futuros devem incluir a quantificação do nível de sincronia intra-colonial.

4.2.2 Implicações evolutivas da ocorrência de cópula extra-par e parasitismo de ninho intraespecífico em Ciconiiformes

Que ganhos teriam os indivíduos que se engajam em cópulas extra-par? Sabe-se que fatores como a mortalidade dos adultos (quando alta), os níveis de cuidado parental, as características morfológicas dos indivíduos, a diversidade genética das populações, entre outros fatores menos estudados, são variáveis importantes que já têm sido relacionadas a esse comportamento reprodutivo (PETRIE E MØLLER, 1991; WESTNEAT E STEWART, 2003; PETRIE E KEMPENAERS, 1998; MAYS E HILL, 2004). A CEP tem alguns custos para os indivíduos que a protagonizam, pois pode aumentar o risco de retaliação por parte dos parceiros sociais, com conseqüências negativas para a reprodução “intra-par” e/ou sobrevivência dos filhotes “intra-par”. Devido aos custos altos associados à CEP, as fêmeas somente se envolvem nesse tipo de acasalamento se os benefícios forem realmente grandes (AKÇAY E ROUGHGARDEN, 2007). Dentre os possíveis benefícios de uma cópula extra-par estão os benefícios genéticos; duas hipóteses principais tentam explicar como a CEP traz benefícios genéticos: a “dos genes bons” e a “dos genes compatíveis” (NEIFF E PITCHER, 2005). A “hipótese dos genes bons” supõe uma hierarquia que classifica machos da melhor a pior “qualidade genética”, sendo os machos de maior qualidade os mais atrativos às fêmeas. A “hipótese da incompatibilidade de genes” supõe a interação entre as contribuições genômicas paterna e materna e afirma que as fêmeas envolver-se-ão em CEPs para garantir uma contribuição paternal compatível com a materna. Outros benefícios da CEP levam em conta aspectos ecológicos, como o direito da fêmea de forragear nos territórios dos machos extra-par (GRAY, 1997), a oportunidade de investigar possíveis parceiros futuros (CÉZILLY E NAGER, 1995) e o resguardo por parte da fêmea de uma possível infertilidade do parceiro social (GRIFFITH, 2007). Os machos, por sua vez, obtêm benefícios nas CEPs aumentando seu sucesso reprodutivo sem investimento parental adicional (WESTNEAT et al., 1990; BIRKHEAD E MØLLER, 1992). O papel da seleção sexual na evolução da cópula extra-par também tem sido investigado (WESTNEAT E STEWART, 2003; NEIFF E PITCHER, 2005).

Segundo alguns autores, no caso dos Ciconiiformes os benefícios genéticos seriam mais importantes do que os ecológicos para os indivíduos que se engajarem em CEPs, já que em geral nem o território nem o alimento resultam recursos atraentes para os parceiros que procuram CEPs nas aves coloniais (AGUILERA E ÁLVAREZ, 1989). Com relação aos custos da CEP, num estudo em *Platalea leucorodia*, os autores propõem que nenhum dos custos associados a esse comportamento seria importante para essa espécie (AGUILERA E ÁLVAREZ, 1989). Nesse estudo não foi observado abandono do ninho por parte do parceiro social, nem agressão aos parceiros “infieis”, nem competição ou agressão entre ninhegos (como seria esperado em consequência do menor grau de parentesco entre eles) (AGUILERA E ÁLVAREZ, 1989). Extrapolando essas observações às espécies estudadas no presente estudo, pode-se pensar que os benefícios das CEPs seriam maiores do que os custos para essas espécies, o que poderia favorecer a ocorrência desse comportamento reprodutivo nas mesmas, como sugerido pelas evidências genéticas.

Com relação ao PNI, quais seriam os ganhos das fêmeas com esse comportamento? Pela PNI a fêmea aumenta o seu sucesso reprodutivo relativo, pelo incremento do número de ovos que possam, eventualmente, produzir ninhegos (ZINK, 2000; YOM-TOV, 2001). Dentro de uma colônia, uma fêmea pode usufruir dos esforços reprodutivos de outra fêmea ao colocar seus ovos no ninho dela. A proximidade espacial e a sincronia dos ninhos dentro de uma colônia reprodutiva podem aumentar o acesso das fêmeas “parasíticas” às suas potenciais hospedeiras e isso tem levado à hipótese de que o PNI deve ser maior em espécies coloniais do que em espécies com nidificação isolada (BROWN E BROWN, 1996). Foi proposto que o parasitismo de ninho intraespecífico poderia contribuir com o aumento do sucesso reprodutivo dos indivíduos, em espécies com custos altos associados ao cuidado parental. A sobrevivência dos adultos nesses casos poderia ser afetada negativamente pelos custos altos associados ao intenso cuidado parental dos filhotes. Dessa forma, para um determinado adulto, o parasitismo de ninho intraespecífico poderia representar uma maneira de reduzir os custos e, assim, aumentar o seu sucesso reprodutivo (ANDERSSON, 1984; YOM-TOV, 1980; ZINK, 2000). Além do mais, pela postura de ovos em ninhos de outras fêmeas da mesma espécie, uma fêmea pode incrementar as chances de que seus filhotes recebam um cuidado parental adequado, durante o desenvolvimento, incluindo a proteção frente a predadores (PAYNE, 1977). O

parasitismo de ninho intraespecífico, portanto, representa uma alternativa interessante quando são grandes as probabilidades de perda de ovos e/ou filhotes por predação. Dados disponíveis para uma colônia reprodutiva de colhereiro do Rio Grande do Sul indicam que no pulso reprodutivo 2008/2009 houve uma falha nos ninhos de 54%, sendo que 29% dos ninhos falharam durante a incubação e 25% falharam durante o desenvolvimento dos filhotes (GIANUCA et al., 2009). A predação foi a causa que explicou a maior parte da falha após-eclosão (73%) (GIANUCA et al., 2009). Apesar de não existirem dados dessa natureza para as colônias de colhereiro analisadas no presente trabalho, pode se pensar que, em se tratando da mesma espécie e da mesma região geográfica estudada, a pressão de predação está presente nelas em nível semelhante do que o observado nos estudos acima mencionados. Dados disponíveis para uma colônia reprodutiva do Pantanal, a colônia de Porto da Fazenda, mencionam 16 potenciais predadores das aves pernaltas e de seus ninhos e filhotes (BOUTON, 1999). Dentre os predadores encontram-se mamíferos, répteis, e aves, sendo as aves de rapina as que maiores distúrbios causariam nas colônias. Em resposta à pressão de predação, para incrementar as chances dos seus filhotes sobreviverem, as fêmeas podem colocar alguns dos seus ovos em ninhos alheios e cuidar dos outros ela mesma. O parasitismo de ninho intraespecífico também foi identificado como resposta a situações com competição acirrada pelos recursos de nidificação, pois em condições não favoráveis para o estabelecimento do seu próprio ninho as fêmeas parasíticas transferem seus esforços de cuidado parental para as fêmeas melhores sucedidas, garantindo uma prole mínima (LYON E EVERDING, 1996).

O parasitismo de ninho intraespecífico não é outra coisa que um tipo de parasitismo no qual o recurso explorado pela espécie parasita que usufrui do cuidado parental da espécie parasitada (DANCHIN et al., 2008). O nível de cuidado parental de uma espécie, portanto, pode se relacionar com o nível de PNI que ela apresenta e supõe-se que o PNI tenha evoluído somente em espécies que requerem de cuidado parental (DANCHIN et al., 2008). Considerando a relação entre PNI e cuidado parental, a diferença observada no presente trabalho quanto às proporções de pares de ninhos não-relacionados encontradas no cabeça-seca e no colhereiro estão de acordo com esperado pelo padrão de cuidado parental dessas duas espécies: cabeça-seca apresenta maior nível de cuidado parental e apresentou um maior grau de PNI; O colhereiro, que não tem seu sucesso reprodutivo tão diminuído pelo cuidado parental, pois seu nível de

cuidado parental é intermediário entre cabeça-seca e garça-branca-grande, apresentou pouco PNI; Na garça, que apresenta o nível mais baixo de cuidado parental, não foram observados ninhegos não relacionados dentro dos ninhos. As diferenças quanto às proporções de pares de ninhegos não-relacionados observadas no nosso trabalho também poderiam ser explicadas pelo poder diferencial do conjunto de marcadores utilizados, mas concordam com as diferenças ecológico-comportamentais das espécies estudadas.

O parasitismo de ninho intraespecífico é um comportamento dinâmico nas populações, pois já que os indivíduos de uma mesma espécie são os hospedeiros de outros, esse comportamento não pode se fixar numa população (ou seja, não pode ser a única estratégia reprodutiva exibida pelos indivíduos). As vantagens do PNI são maiores quando esse comportamento existe numa relativamente baixa frequência na população já que muitos ninhos estarão disponíveis para serem parasitados. O sucesso reprodutivo dos indivíduos que exibem PNI estará sujeito a uma dinâmica evolutiva dependente da frequência (VALPINE E EADIE, 2008). Níveis altos de PNI podem diminuir o sucesso reprodutivo total da população, já que poderão contribuir a incrementar os níveis de abandono dos ninhos e/ou diminuir o sucesso na eclosão dos ovos ou na revoada dos ninhegos (EADIE et al., 1998). A seleção do PNI como estratégia evolutivamente estável (EES), portanto, não será possível em longo prazo nessas condições (EADIE et al., 1998). Se confirmada a existência de PNI numa espécie e/ou população, é importante que esse comportamento reprodutivo seja considerado no contexto da dinâmica da população na qual ocorre (VALPINE E EADIE, 2008). No planejamento de programas de manejo e conservação dessas populações deve ser considerar a existência de PNI, em especial quando recursos como alimento e lugares de nidificação são limitados. Nessas situações, a frequência de PNI pode aumentar e isso pode levar, em longo prazo, à diminuição do tamanho efetivo das populações (EADIE et al., 1998).

4.3 Paternidade e maternidade em populações de colhereiros de cativoiro

No presente trabalho foram realizadas análises de paternidade e maternidade com base na informação genética para checar dados genealógicos dos *studbook* para famílias de colhereiro mantidas em cativoiro. Os resultados obtidos a partir dessas análises

indicaram que uma relação do tipo progenitor-progênie foi confirmada para 61,5% dos supostos parentais registrados nos zoológicos, a maternidade foi confirmada para 61,1% dos pares mãe-filho registrados (Tabela 3.10) e a paternidade confirmada para 61,9% dos pares pai-filho registrados (Tabela 3.11). Em 75% das situações nas quais somente a mãe estava registrada, a maternidade foi confirmada. De maneira análoga, a paternidade foi confirmada em 71,4% dos casos em que somente o pai estava registrado. Esses resultados revelaram o grau de erro na atribuição de paternidade e maternidade dos filhotes de colhereiro nascidos em cativeiro.

O intercâmbio entre zoológicos de aproximadamente 500 colhereiros mantidos em cativeiro nos EUA tem sido usado como estratégia para preservar a diversidade genética dos grupos *ex-situ* e como forma de salvaguardar o sucesso reprodutivo dos animais por nascer (SAWYER E BENJAMIN, 2006). Essa metodologia de manejo requer que a identificação dos indivíduos e das relações de parentesco entre eles seja precisa, pois indivíduos menos aparentados deverão ser escolhidos para a reprodução se o objetivo é o de preservar a diversidade genética. Fatores como a falta de dimorfismo sexual secundário aparente no colhereiro podem dificultar a identificação de pares reprodutivos e o registro correto de informação genealógica. Além disso, o agrupamento dos indivíduos dificulta as observações detalhadas sobre seu comportamento e, em consequência, a construção de genealogias familiares precisas. Outras limitações, como a falta de pessoal responsável pelos registros nos *studbooks* e de tempo para se realizar observações comportamentais, podem conduzir a erros na montagem desses registros que, se não detectados e corrigidos a tempo, podem ter consequências fatais para o desenho e desenvolvimento de programas de manejo de populações de cativeiro.

O uso de informações genealógicas junto com informação genética incrementa o poder para selecionar indivíduos nos programas de manejo, minimiza a perda de variabilidade genética e aperfeiçoa os programas de conservação (WANG, 2002). Dados genéticos devem ser utilizados, sempre que possível, para se verificar relações genealógicas (VAN HORN et al., 2008). Análises genéticas da população de colhereiros de cativeiro ajudaram a identificar a maternidade e paternidade de sete ninhegos nascidos em 2000 (Tabelas 3.10 e 3.11), cujos registros eram ambíguos. Identificou-se que um par de adultos era responsável por quatro ninhegos, outro par tinha gerado um ninhego e um terceiro par gerou os outros dois

ninhegos. Além disso, as análises genéticas conduzidas no presente trabalho identificaram corretamente uma atribuição errônea de paternidade resultante de um erro de determinação do sexo por endoscopia realizada em um dos zoológicos (SAWYER, 2002). Uma das contribuições mais importantes da análise genética dos colhereiros de cativeiro foi a identificação dos pares de indivíduos mais prováveis de serem progenitores dos filhotes que não tinham nenhum registro associado, seja de paternidade como de maternidade. Esse procedimento revelou que alguns adultos tinham se acasalado diversas vezes e produzido progênie, mas que essas progênies não estavam registradas nos *studbooks*. Outro resultado importante do presente trabalho foi a identificação de que um dos colhereiros adultos era responsável por um par de ninhegos que, pela sua vez, tinham se acasalado e produzido progênie. Ambos os exemplos ilustram casos de endocruzamento não identificados previamente pelo pessoal dos zoológicos. Tais situações podem conduzir à perda de diversidade genética e à expressão de alelos deletérios recessivos (HUNTER E GIBBS, 2007) na população de colhereiros de cativeiro. Esse efeito pode ser ainda maior nas populações norte americanas de colhereiro porque seus níveis intrínsecos de diversidade podem ter sido afetados pelo evento de redução demográfica datada entre 1890-1920 (DUMAS, 2000).

Em conclusão, os resultados acima descritos mostram que a inclusão da informação genética pode aumentar a precisão da atribuição de paternidade e maternidade em populações de colhereiro mantidas em cativeiro. O exemplo demonstra que análises genéticas podem ser conduzidas nos zoológicos nos quais os colhereiros se encontram, para manter ou aumentar a diversidade genética dessas populações. Essas análises podem ser úteis também para as populações de cativeiro de outras espécies de Ciconiiformes, como *Platalea minor* que está criticamente ameaçada na natureza (YEUNG et al, 2006). Com essa abordagem, maximizar-se-á a preservação da diversidade genética em cativeiro, requisito essencial para o sucesso de futuras translocações em locais com habitat viável e/ou restaurado, mas nos que as espécies tenham sido extintas.

4.4 Estruturação genética em populações brasileiras da garça-branca-grande

Com o objetivo de caracterizar o nível de diversidade genética em populações naturais de garça-branca-grande e de detectar sinais genéticos de processos demográficos, foram utilizadas, neste estudo, métodos bem validados na literatura (e.g, PEARSE E CRANDALL, 2004). A análise da diversidade genética nos locos de microsatélites nas colônias reprodutivas da garça-branca-grande do Pantanal e do Rio Grande do Sul (Brasil) revelou que os valores médios de heterozigosidade observada (Tabelas 3.3 e 3.4) não indicam que essas populações tenham passado por eventos recentes de gargalo populacional (ver mais abaixo). As colônias reprodutivas de garça-branca-grande possuem aproximadamente 10.000 indivíduos (MORRISON et al., 2008) e não há evidências documentadas de redução demográfica recente nelas. Mesmo que não existam dados referentes a censos populacionais para as colônias de garças do Estado do Rio Grande do Sul, essas possuiriam também um número grande de indivíduos, segundo observações ecológicas (S. N. Del Lama, comunicação pessoal). De acordo com esse dado, o tamanho populacional estimado para as colônias de garça-branca-grande do Estado do Rio Grande do Sul, usando DNA mitocondrial (DNAm_t) foi de aproximadamente 44.000 indivíduos (CORRÊA, 2009).

O método de detecção de redução demográfica baseada na distribuição das frequências alélicas indicou diferenciação significativa do esperado em populações estáveis para duas colônias do Pantanal (TUC e FI) e uma do Estado do Rio Grande do Sul (PG). Em concordância com esse achado, os valores do índice de $G-W$ nessas três colônias foram menores do que 0,68, indicando evidência genética de redução do tamanho populacional (GARZA E WILLIAMSON, 2001). No entanto, os níveis de diversidade genética observados (em termos de H_o) nessas três colônias e a evidência de expansão demográfica encontrada no Pantanal e no Estado do Rio Grande do Sul pelo uso do DNAm_t (CORRÊA, 2009), não sugerem que a redução demográfica seja uma hipótese plausível de ter ocorrido nessas populações. Uma explicação alternativa para a distribuição de frequências alélicas diferente do esperado para populações estáveis e do valor baixo do índice de $G-W$ poderia estar relacionada com a dinâmica dessas populações de garça. Devido à alta dependência das colônias reprodutivas do regime de chuvas, pode ter acontecido um menor recrutamento de indivíduos nessas colônias durante algum período anterior à amostragem deste estudo e as conseqüências genéticas desse evento foram evidenciadas na nossa análise.

A análise dos padrões de distribuição da diversidade genética baseada nos locos de microssatélites (medida pelo F_{ST}) evidenciou que as colônias de garça-branca-grande do Pantanal encontram-se diferenciadas geneticamente das colônias do Estado do Rio Grande do Sul (F_{ST} entre regiões = 0,062, $P = 0,001$ e Tabela 3.13). Em concordância com o F_{ST} , a análise hierárquica AMOVA indicou que uma porção significativa da variação genética (5,10%) pode ser atribuída às diferenças entre as duas regiões e (2,37%) pelas diferenças entre as colônias dentro das regiões (Tabela 3.16). A hipótese de diferenciação genética entre regiões também ficou evidenciada pela significância estatística do índice de fixação de Wright ($F_{CT} = 0,074$) e pelas análises de atribuição de indivíduos às suas populações de origem com base nas suas probabilidades genotípicas. Quando as regiões, ao invés das colônias, foram consideradas como unidades populacionais nessa última análise, houve um incremento de 41,5% na proporção de indivíduos corretamente atribuídos às populações de origem. A análise Bayesiana de estruturação populacional também reforçou a diferenciação genética entre regiões (Fig. 3.3). Apesar da diferenciação genética entre as populações do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul ter sido baixa, ela foi significativa e não se pode descartar a possibilidade de que maiores graus de estruturação genética sejam evidenciados com um incremento no número de locos de microssatélites analisados.

Um padrão do tipo fluxo gênico restrito pela distância geográfica não pode, por si só, explicar a diferenciação genética significativa, detectada entre as colônias do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul (teste de Mantel não significativo). Uma hipótese para explicar essa diferenciação propõe que a mesma pode ser resultante da colonização recente do Estado do Rio Grande do Sul por um grupo de garças cujas constituições genéticas diferiam da constituição das populações do Pantanal. Essa proposta está de acordo com o observado por Corrêa (2009) que analisou um fragmento de 586 pb da região controladora do Domínio I do DNA mitocondrial da garça-branca-grande e encontrou um tempo mais recente de expansão populacional no Estado do Rio Grande do Sul, com relação ao Pantanal. Segundo essa autora, o Rio Grande do Sul teria sido colonizado pelas garças 24.814 anos depois do que o Pantanal (CORRÊA, 2009). A garça-branca-grande é bem conhecida pela sua distribuição cosmopolita e pelo seu grande potencial de colonização de novas áreas (KUSHLAN E HANCOCK, 2005).

Os padrões de distribuição da diversidade genética descritos acima levantam importantes questões a respeito da caracterização das potenciais unidades populacionais para a conservação de espécies com ampla distribuição geográfica, mas com colônias reprodutivas estabelecidas em locais bem definidos, como sugerido no estudo de Bouzat et al. (2009) com o pingüim *Spheniscus maguellanicus*. Para o pingüim, esses autores propuseram um modelo de metapopulações, no qual as colônias reprodutivas individuais com maior número de indivíduos atuam como fontes de recrutamento de casais reprodutivos para as colônias menores (BOUZAT et al., 2009). Esse modelo pode também ser aplicado a outras aves aquáticas cuja reprodução ocorre em colônias e que exibem ampla dispersão pós-reprodutiva, como é o caso da garça-branca-grande.

No presente estudo foram encontradas evidências genéticas de que as populações brasileiras da garça-branca-grande localizadas no Pantanal e no Estado do Rio Grande do Sul seriam unidades populacionais independentes e, como tal, deveriam ser consideradas separadamente no planejamento de programas de manejo para a conservação da diversidade genética total da espécie. Tal medida de conservação, ao mesmo tempo em que ajudaria a preservar a diversidade genética de populações com constituições alélicas diferentes nos locos nucleares, também permitiria a conservação de genótipos submetidos a diferentes pressões de seleção. O Pantanal e o Rio Grande do Sul têm biomas diferentes (ver seção 2.1 no Capítulo 2) e com dinâmicas ecológicas distintas que podem promover diversas respostas adaptativas nos organismos que neles habitam. Para conservar efetivamente a biodiversidade como um todo é de interesse não somente conservar a componente genética dessa diversidade, senão também os processos e padrões ecológico-evolutivos que a produzem (REUSCH et al., 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo têm implicações importantes para a conservação das populações brasileiras de garça-branca-grande. Pelo evidenciado a partir do uso de marcadores genéticos, as populações do Estado do Rio Grande do Sul teriam uma constituição genética diferente das populações do Pantanal. A diversidade genética fornece o material para a evolução por seleção natural, portanto, para que as populações possam responder a pressões de seleção diferentes é necessário que a maior quantidade de alelos diferentes esteja disponível para a seleção agir (PETIT et al., 1998). Na biologia da conservação existe o “princípio de complementaridade” que objetiva maximizar o número de espécies protegidas e dos recursos naturais disponíveis

(CABEZA E MOILANEN, 2001). Por exemplo, se houver um conjunto de ecossistemas com diferente representatividade de espécies, todos eles deverão ser conservados, pois eles são complementares no sentido de que maximizam a diversidade de espécies a serem conservadas (MORITZ, 2002). O princípio de complementaridade foi aplicado à conservação da diversidade intraespecífica por Moritz (2002) e Bonin et al. (2007). Uma característica importante desse conceito é que as populações não são consideradas independentemente pela sua diversidade genética intrínseca, mas são avaliadas comparativamente (em relação umas a outras) (BONIN et al., 2007). É proposta do presente trabalho que esse princípio seja aplicado à conservação das populações de garça-branca-grande do Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul, pois elas diferem significativamente nas suas constituições alélicas e essa abordagem maximizaria a conservação da diversidade da espécie. Como sugerido por Reusch et al. (2005) e Bonin et al. (2007), além da importância da conservação da diversidade genética intraespecífica para a persistência das populações, espécies e ecossistemas, essa diversidade permite a complementaridade de diferentes genótipos para os processos de adaptação ecológica.

Conclusões

A concretização dos objetivos estabelecidos no início do presente trabalho permitiu:

- ❖ Estimar parâmetros genético-populacionais em colônias reprodutivas brasileiras de cabeça-seca (*Mycteria americana*), colhereiro (*Platalea ajaja*) e garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*), com base em marcadores moleculares nucleares de tipo microssatélites que serviram para subsidiar as análises de parentesco e genética de populações;
- ❖ Evidenciar que o valor médio de parentesco genético entre indivíduos (de ninhos diferentes) de colônias reprodutivas brasileiras de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca-grande, estimado com base nos seus genótipos em múltiplos locos de microssatélites, não diferiu do esperado para não-relacionados. Esses resultados apontam para a não-existência de padrões do tipo “agrupamento de parentes” (*kin clustering*) nessas espécies;
- ❖ Estabelecer que o uso combinado de abordagens metodológicas diferentes para estimativa de relacionamentos e identificação de vínculos, conjuntamente com a análise do desempenho dos estimadores utilizados no contexto específico da amostra em estudo devem ser prioridade em estudos com objetivos semelhantes aos do presente trabalho;
- ❖ Desenvolver uma metodologia de análise de dados com aplicabilidade geral em estudos de parentesco genético, tanto em populações naturais quanto de cativeiro, no contexto de informação genealógica limitada e/ou amostras familiares incompletas;
- ❖ Evidenciar que o grau de parentesco genético entre filhotes amostrados dentro dos mesmos ninhos, estimado com base nos seus genótipos em múltiplos locos de microssatélites, diferiu significativamente do esperado para irmãos-completos em cabeça-seca e em colhereiro. Isso aponta para a existência de um sistema genético de acasalamento diferente da monogamia nessas espécies;
- ❖ Demonstrar que o uso de informação genética pode auxiliar na identificação de indivíduos, paternidade, maternidade e vínculos de parentesco em populações de cativeiro e que o uso dessa ferramenta é de grande importância no planejamento e desenvolvimento de programas de manejo dessas populações;
- ❖ Detectar diferenciação genética significativa entre as colônias reprodutivas de garça-branca-grande do Pantanal e do Rio Grande do Sul, a qual deve ser levada

em conta no momento da definição de unidades populacionais e têm importantes implicações para a conservação e o manejo dessa espécie.

Referências

- ADAHL, E. *et al.* Can intraspecific brood parasitism be detected using egg morphology only? *Journal of Avian Biology*, v. 35, n. 4, p. 360-364, 2004.
- AGUILERA, E.; ÁLVAREZ, F. Copulation and mate guarding of the Spoonbill (*Platalea leucorodia*). *Behavior*, v. 110, p. 1-4, 1989.
- AKCAY, E.; ROUGHGARDEN, J. Extra-pair paternity in birds: review of the genetic benefits. *Evolutionary Ecology Research*, v. 9, n. 5, p. 855-868, 2007.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 4, p. 957-966, Nov 2008.
- ALLEN, R. P. *The Roseate Spoonbill*. New York, NY: Dover Publ., 1942.
- AMERICAN ORNITHOLOGISTS' UNION. *Check-list of North American Birds*. 7th ed. Washington, D.C.: American Ornithologists' Union, 1998.
- ANDERSSON, M. Brood parasitism within species. In: BARNARD, C.J. *Producers and scroungers: strategies of exploitation and parasitism*. New York, NY: Chapman & Hall, 1984.
- ANTAS, P. T .Z. Migration and other movements among the lower Paraná river valley wetlands, Argentina, and the south Brazil/Pantanal wetlands. *Bird Conservation International*, v. 4, p. 181- 190, 1994.
- ARANTES DE SOUZA, E. *et al.* *Aves do Parque Nacional do Cabo Orange: guia de campo*. Amapá, AP: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2008.
- ARAYA, B.; CHESTER, S. *The birds of Chile*. Santiago, Chile: Latour., 1993.
- AUSTIN Jr., O.; STINGER, A. *Birds of the World*. New York: Golden Press. 1983.
- AVELAR, L. H. S.; MIÑO, C. I.; DEL LAMA, S.N. Estratificação dos ninhos de Ciconiiformes em colônias reprodutivas do Amapá. In: SIMON, J. E. *et al.* *Biogeografia de aves da Mata Atlântica: livro de resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ornitologia*. São Paulo, SP: Tec Art., 2009.
- AVISE, J. C. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. *Ibis*, v. 138, n. 1, p. 16-25, Jan 1996.
- AVISE, J. C. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2004.
- BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. Introdução. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. *Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul*. Brasília: MMA / SBF, 2006a. cap. 1. p. 10 – 18.
- BECKER, F. G. *et al.* Biodiversidade – Síntese e Conservação. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. de A. *Biodiversidade. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de*

Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul. Brasília: MMA / SBF, 2006b. cap. 24. p. 368 – 384.

BELKHIR, K. *et al.* IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes*, v. 2, n. 4, p. 611-614, Dec 2002.

BENCKE, G. A. *et al.* Aves. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. de A. *Biodiversidade*. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul. Brasília: MMA / SBF, 2006. cap. 22. pp. 316 – 355.

BENNETT, P ; OWENS, I. *Evolutionary Ecology of Birds: Life Histories, Mating systems, and Extinction*. Oxford University Press. 2002.

BERG, E. C. *et al.* Reverse sex-biased philopatry in a cooperative bird: genetic consequences and a social cause. *Molecular Ecology*, v. 18, n. 16, p. 3486-3499, 2009.

BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. *Sperm Competition in Birds: Evolutionary Causes and Consequences*. London: Academic Press. 1992.

BJORK, R. D.; POWELL, G. V. N. Roseate Spoonbil. In: RODGERS, J. A. *Rare and endangered biota of Florida*. Florida University Press. 1996. p. 295-308.

BJORK, R. D.; POWELL, G. V. N. *Relations between hydrologic conditions and quality and quantity of foraging habitat for Roseate Spoonbills and other wading bird in the C-111 basin*. Homestead, FL: Everglades National Park. 1994. National Audubon Society Final report to South Florida Research Center.

BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 18, n. 10, p. 503-511, 2003.

BLOUIN, M. S. *et al.* Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, v. 5, n. 3, p. 393-401, 1996.

BOUTIN-GANACHE, I. *et al.* M13-Tailed Primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *BioTechniques* v. 31, p. 25-27, 2001.

BONIN, A. *et al.* Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology*, v. 21., n. 3, p. 697-708, 2007.

BOUTON, S. N.; FREDERICK, P.C. Stakeholders' perceptions of a wading bird colony as a community resource in the Brazilian Pantanal. *Conservation Biology*, v.17, p. 297-306, 2003.

BOUZAT, J. L. *et al.* Regional genetic structure in the Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*) suggests metapopulation dynamics. *Auk*, v. 126, n. 2, p. 326-334, 2009.

- BRANDSTRÖM, M.; ELLEGREN, H. Genome-wide analysis of microsatellite polymorphism in chicken circumventing the ascertainment bias. *Genome Research*, v. 18, p. 881-887, 2008.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 453-455, 1996.
- BROWN, C. R.; BROWN, M. B. *Coloniality in the Cliff Swallow: the effect of group size on social behavior*. Chicago, IL: University of Chicago Press. 1996.
- BROWN, C. R.; BROWN, M. B. Avian coloniality: progress and problems. In: NOLAN Jr, V.; THOMPSON, C. F. *Current ornithology*. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2001. v. 16.
- BROWN, M. B.; LAWES, M. J. Colony size and nest density predict the likelihood of parasitism in the colonial Southern Red Bishop *Euplectes orix* – Diderick Cuckoo *Chrysococcyx caprius* system. *Ibis* v. 149, p. 321-327, 2007.
- BROWN, C. R. Laying eggs in a neighbor's nest: benefit and cost of colonial nesting in swallows. *Science* v. 22, p. 518-519, 1984.
- BRYAN, A. L. *et al.* Foraging strategies and energetic costs of foraging flights by breeding storks. *Condor*, v. 97, n. 1, p. 133-140, Feb 1995.
- BRYAN Jr, A. L. *et al.* Satellite Tracking Large-scale Movements of Wood Storks Captured in the Gulf Coast Region. *Waterbirds*, v. 31, p. 35-41, 2008.
- CABEZA, M.; MOILANEN, A. Design of reserve networks and the persistence of biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, p. 242-248, 2001.
- CALLEN, D. F. *et al.* Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, v. 52, p. 922-927, 1993.
- CAPARROZ, R. *Filogeografia, estrutura e variabilidade genética da Arara-canindé (Ararauna, Psittaciformes: Aves) no Brasil baseadas na análise de DNA mitocondrial e de DNA nuclear*. 2003. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade de São Paulo, 2003.
- CARO, T. The behaviour-conservation interface. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 14, n. 9, p. 366-369, Sep 1999.
- CARO, T. Behavior and conservation: a bridge too far? *Trends in Ecology & Evolution*, v. 22, n. 8, p. 394-400, Aug 2007.
- CARVALHO, C. B. V.; MACEDO, R. H. E.; GRAVES, J. A. Breeding strategies of a socially monogamous Neotropical passerine extra-pair fertilizations, behaviour and morphology. *Condor* v. 108, p. 579-590, 2006.
- CEBALLOS, G. *et al.* Conservation Challenges for the Austral and Neotropical America Section. *Conservation Biology*, v. 23, p. 811-817, 2009.

- CHIVER, I.; STUTCHBURY, B. J. M.; MORTON, E. S. Do male plumage and song characteristics influence female off-territory forays and paternity in the hooded warbler? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 62, n. 12, p. 1981-1990, 2008.
- CLOBERT, J. et. al. *Dispersal*. Oxford University Press: Oxford, UK. 2001.
- COCONIER, E. Reporte final: aves acuáticas en Argentina. *Wetlands International*, 2006.141 p. <Disponível em: <http://www.wetlands.org>>. Acessado em: 17 jun. 2010.
- CONSERVATION INTERNATIONAL BRASIL. *Corredor da Biodiversidade do Amapá*. São Paulo: Ipsis. 2007.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, 1996.
- CORNUET, J. M. *et al.* New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, v. 153, n. 4, p. 1989-2000, 1999.
- CORRÊA, T. C. *Histórico-demográfico e filogeografia em populações brasileiras de Ardea alba egretta*. 2009. 107 pp. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- COULTER, M. C. et. al. 1999. Wood Stork (*Mycteria americana*). In: POOLE, A. *The birds of North America Online*. Disponível em: <<http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/409>>. Acessado em: 20/10/2010.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2004.
- CRANDALL, K. A. *et al.* Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 15, n. 7, p. 290-295, Jul 2000.
- CSILLERY, K. *et al.* Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics*, v. 173, n. 4, p. 2091-2101, 2006.
- CUSTER, T. W.; OSBORN, R. G. *Wading birds as biological indicators: 1975 colony survey*. Special Scientific Report-Wildlife No. 206. Washington, DC: United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1977.
- DANCHIN, E.; GIRALDEAU, L-A.; CÈZILLY, F. *Behavioral Ecology*. New York: Oxford University Press, Inc. 2008.
- DARWIN, C. *The descent of man and selection in relation to sex*. London: John Murray. 1871.
- DAVIES, N.B. Mating systems. In: KREBS, J.R.; DAVIES, N.B. *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Blackwell Scientific Publications, 1991. pp. 263-294.
- DE LUCA, A.; DEVELEY, P.; OLMOS, F. *Waterbirds in Brazil*. Brasília: Wetlands International, 2006. Final Report.

- DEWOODY, J. A. Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: Practical applications for wild animals. *Journal of Wildlife Management*, v. 69, n. 4, p. 1400-1418, Oct 2005.
- DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. *Handbook of the birds of the world*. Barcelona: Lynx Edicions, 1992.
- DOUBLE, M. C.; PEAKALL, R.; BECK, N. R.; COCKBURN, A. Dispersal, philopatry, and infidelity: Dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*). *Evolution*, v. 59, n. 3, p. 625-635, Mar 2005.
- DUMAS, J. V. 2000. The Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*). In: POOLE, A. *The birds of North America Online*. Disponível em: <<http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/409>>. Acessado em: 20/10/2010.
- EADIE, J. M.; SHERMAN, P. W.; SEMEL, B. Conspecific brood parasitism, population dynamics, and the conservation of cavity-nesting birds. In: T. CARO. *Behavioral Ecology and Conservation Biology*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 1998. pp. 306–40.
- ELBIN, S.B.; BURGER, J. Is extra-pair copulation a mating strategy or a by-product of sexual activity in Scarlet Ibis? In: ANNUAL MEETING OF THE PACIFIC SEABIRD GROUP, 32.; ANNUAL MEETING OF THE WATERBIRD SOCIETY, 27., 2005. Portland. *Proceedings...* Portland, OR: The Waterbird Society, 2005. p. 55
- EMLEN, S. T.; ORING, L. W. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* v. 197, n. 4300, p. 215 – 223, 1977.
- ERWIN R. M. et. al. Reproductive success, growth and survival of Black-crowned Night-Heron (*Nycticorax nycticorax*) and Snowy Egret (*Egretta thula*) chicks in Coastal Virginia. *Auk* v. 113, p. 119–130, 1996.
- ERWIN, R M. Foraging decisions, patch use, and seasonality in egrets (Aves: Ciconiiformes). *Ecology* v. 66, p. 837-844, 1985.
- EVANNO, G *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L. *et al.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FASOLA, M. Opportunistic use of foraging resources by heron communities in southern Europe. *Ecography* v. 17, p. 113-123, 1994.
- FERREIRA, C. *Filogenia dos Ciconiiformes (aves) com ênfase em Threskiornithidae*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, 2007.
- FRANCISCO, M. R. *et al.* Patterns of individual relatedness at Blue Manakin (*Chiroxiphia caudata*) leks. *Auk*, v. 126, n. 1, p. 47-53, 2009.
- FRASER, D. J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, v. 10, p. 2741-2752, 2001.

- FREDERICK, P. C.; MEYER, K. D. Longevity and size of Wood Stork (*Mycteria americana*) colonies in Florida as guides for an effective monitoring strategy in the southeastern United States. *Waterbirds*, v. 31, p. 12-18, 2008
- FREDERICK, P. C.; OGDEN, J. C. Philopatry and nomadism: contrasting long-term movement behavior and population dynamics of White Ibises and Wood Storks. *Colonial Waterbirds* v. 20, p. 316-323, 1997.
- FREDERICK, P. C.; COLLOPY, M. W. Nesting success of five ciconiiform species in relation to water conditions in the florida everglades. *Auk* v. 106, p. 625-634, 1989.
- FREDERICK, P. C. Extrapair copulations in the mating system of white ibis (*Eudocimus albus*). *Behaviour* v. 100, p.170–201, 1987.
- FREDERICK, P. C. Suspected intraspecific egg dumping in the White Ibis (*Eudocimus albus*). *Wilson Buletin* v. 98, p. 476-478, 1986.
- FREDERICK, P. *et al.* The White Ibis and Wood Stork as indicators for restoration of the everglades ecosystem. *Ecological Indicators*, v. 9, p. S83-S95, 2009.
- FRIESEN, V. L. Population genetics and the spatial scale of conservation of colonial waterbirds. *Colonial Waterbirds* v. 20, p.353–368, 1997.
- FRIESEN, V. L.; BURG, T. M.; MCCOY, K. D. Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 9, p. 1765-1785, 2007.
- FUJIKOA, M.; YAMAGISHI, S. Extramarital and pair copulations in the Cattle Egret. *Auk* v. 98, p.134-144, 1981.
- GARBER, R. A.; MORRIS, J. W. General equations for the average power of exclusion for genetic systems of n codominant alleles in one parent and no parent cases of disputed parentage. In: WALKER, R. H. *Inclusion probability in parentage testing*. Arlington, VA: American Association of Blood Banks, 1983. pp. 277-280.
- GARZA, J. G.; WILLIAMSON, E. G.. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, v. 10, n. 2, p. 305-318, 2001.
- GEFFEN, E.; YOM-TOV, Y. Factors affecting the rates of intraspecific nest parasitism among Anseriformes and Galliformes. *Animal Behaviour*, v. 62, p. 1027-1038, 2001.
- GIANUCA, D.; VOOREN, A.; GIANUCA, A.T. Abundância e reprodução do colhereiro (*Platalea ajaja*) durante o pulso de 2008/2009 em uma colônia de Ciconiiformes no estuário da Lagoa dos Patos, RS. In: SIMON, J.E. et. al. *Biogeografia de aves da Mata Atlantica: livro de resumos / XVII Congresso Brasileiro de Ornitologia*. São Paulo: Tec Art. 2009.
- GIL P. D.; SLATER, J. B.; GRAVES, J. A. Extra-pair paternity and song characteristics in the willow warbler *Phylloscopus trochilus*. *Journal of Avian Biology*], v. 38, n. 3, p. 291-297, 2007.
- GILL, S. A.; STUTCHBURY, B. J. M. Long-term mate and territory fidelity in neotropical buff-breasted wrens (*Thryothorus leucotis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* v. 61, p. 245-253, 2006.

- GIMENES, M. R.; ANJOS, L. Influence of Lagoons Size and Prey Availability on the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* **15**, 2541–2555. 2006.
- GLADSTONE, D. E. Promiscuity in monogamous colonial birds. *American Naturalist*, v. 114, n. 4, p. 545-557, 1979.
- GOBUSH, K. *et al.* Genetic relatedness and disrupted social structure in a poached population of African elephants. *Molecular Ecology*, v. 18, n. 4, p. 722-734, 2009.
- GOMEZ-UCHIDA, D. *et al.* Interaction of landscape and life history attributes on genetic diversity, neutral divergence and gene flow in a pristine community of salmonids. *Molecular Ecology*, v. 18, n. 23, p. 4854-4869, 2009.
- GONÇALVES DA SILVA, A.; RUSSELLO, M. A. iREL: software for implementing pairwise relatedness estimators and evaluating their performance. *Conservation Genetic Resources* doi. 10.1007/s12686-010-9292-4, in press.
- GONZÁLEZ, J. A. Densidad y dinámica espacio-temporal de las poblaciones de cigüeñas (Ciconiidae) en los Llanos inundables de Venezuela. *Ornitología Neotropical* v. 7, p. 177-183, 1996.
- GONZÁLEZ, J. A. Seasonal variation in the foraging ecology of the wood stork in the southern Llanos of Venezuela. *Condor* v. 99, p. 671-680, 1997.
- GONZÁLEZ-MARTIN, M.; RUIZ, X. Brood Parasitism in Herons. *Colonial Waterbirds*, v. 19, n. 1, p. 31-38, 1996.
- GOODNIGHT, K. F.; QUELLER, D. C. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* v. 8, p. 1231-1234, 1999.
- GOTTGENS, J. F.; FORTNEY, R. H. Neotropical wetlands: building links among wetland scientists. *Wetlands Ecology and Management* v. 12, p. 543–546, 2004.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.
- GAUFFRE, B. *et al.* Sex-biased dispersal patterns depend on the spatial scale in a social rodent. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v. 276, n. 1672, p. 3487-3494, 2009.
- GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behavior* v. 28, p. 1140-1162, 1980.
- GRIFFITH, S. C. The role of multiple mating and extra-pair paternity in creating and reinforcing boundaries between species in birds. *Emu*, v. 110, n. 1, p. 1-9, 2010.
- GRIFFITH, S.C., OWENS, I.P.F.; THUMAN, K.A. 2002. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, v. 11, n. 11, p. 2195-2212, 2002.
- GUADAGNIN, D. L. *et al.* Spatial and temporal patterns of waterbird assemblages in fragmented wetlands of Southern Brazil. *Waterbirds* v. 28, p. 261–272, 2005.

- GUADAGNIN, D. L.; MALTCHIK, L. Habitat and landscape factors associated with neotropical waterbird occurrence and richness in wetland fragments. *Biodiversity Conservation* v. 16, p. 1231–1244, 2007.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.
- HAMILTON, W. The genetical evolution of social behaviour. *International Journal of Theoretical Biology*, v. 7, p. 1–16, 1964.
- HANCOCK, M.J; KUSHLAN, J. A; KAHL, M.P. *Storks, Ibises and Spoonbills of the World*. New York: Academic Press, 1992.
- HARRIS, M. B. et. al. Safeguarding the Pantanal wetlands: Threats and conservation initiatives. *Conservation Biology*], v. 19, n. 3, p. 714-720, Jun 2005.
- HARRIS, M. B. et. al. *Estimativas de perda da área natural da Bacia do Alto Paraguai e Pantanal Brasileiro*. Brasília: Conservation International Brazil, 2005.
- HASS, A. *Biologia comportamental de Eudocimus ruber (Aves, Threskiornithidae) em manguezais da Ilha do Cajual, Maranhão: reprodução e alimentação*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- HAU, M. Timing of breeding in variable environments: Tropical birds as model systems. *Hormones and Behavior*, v. 40, n. 2, p. 281-290, 2001.
- HAVERSCHMIDT, R.; MEES, G F. *Birds of Suriname*. Paramaribo, Suriname: VACO, 1994.
- HENSHAW, M. T. *et al.* The independent origin of a queen number bottleneck that promotes cooperation in the African swarm-founding wasp, *Polybioides tabidus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 48, n. 6, p. 478-483, Nov 2000.
- HERBINGER, C. M. *Pedigree 2.2 Help Manual*. 2005. Disponível em: <<http://herbinger.biology.dal.ca:5080/Pedigree>>. Acessado em: 20/10/2010.
- HERBINGER, C.M.; O'REILLY, P. T.; VERSPOOR, E. Unravelling first-generation pedigrees in wild endangered salmon populations using molecular genetic markers. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 2261 – 2275, 2006.
- HILTY, S. L.; BROWN, W.L. *A guide to the birds of Colombia*. New Jersey: Princeton University Press, 1986.
- HOFFMAN, J. I.; AMOS, W. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* v. 14, p. 599–612, 2005.
- HOOGLAND, J. L.; SHERMAN, P. W. Advantages and disadvantages of bank swallow (*Riparia riparia*) coloniality. *Ecological Monographs*, v. 46, n. 1, p. 33-58, 1976.
- HOWELL, S. N. G.; WEBB, S. *A guide to the birds of Mexico and northern Central America*. New York: Oxford University Press, 1995.

- HUNTER, M. L.; GIBBS, J. P. *Fundamentals of conservation biology*. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2007.
- HYLTON, R. A. *et al.* Effects of nestling health on postfledging survival of wood storks. *Condor*, v. 108, n. 1, p. 97-106, 2006
- INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE. 2008. Red list of threatened species Disponível em: <http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red_list/>. Acessado em: 05/07/2010.
- ISHIBASHI, Y.; SAITOH, T.; ABE, S.; YOSHIDA, M. C. Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 589-590, 1996.
- JAMIESON, A.; TAYLOR, S. S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, v. 28, n. 6, p. 397-400, 1997.
- JENSEN, J. L. *et al.* Isolation by distance, web service. *Bmc Genetics*, v. 6, Mar 2005.
- JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, v. 12, n. 10, p. 2511-2523, 2003.
- JONES, A.G. *et al.* A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 1, p. 6-30, 2010.
- JONES, O.R.; WANG, J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* v. 3, n. 10, p. 551-555, May 2010.
- JUNK, W. J. Ecology of floodplains – a challenge for tropical limnology. In: SCHEIMER, F.; BOLAND, K. T. *Perspectives in Tropical Limnology*. Amsterdam: SPB Academic Publishers, 1996.
- JUNK, W. J. *et al.* Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences*, v. 68, n. 3, p. 278-309, Oct 2006.
- KAHL, M.P. 1964. Foraging ecology of the Wood Stork (*Mycteria americana*). *Ecological Monographs*, v. 34, p. 97-117, 1964.
- KAHL, M. P. Comparative ethology of the Ciconiidae. Part 3. The Wood Storks (genera *Mycteria* and *Ibis*). *Ibis* v. 114, p. 15 – 29, 1972.
- KAHK, M. P. Food ecology of the Wood Stork (*Mycteria americana*) in Florida. *Ecological Monographs*, v. 34, p. 97–117, 1964.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER M. L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics* v. 7, p. 991–995, 2006.
- KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A.P.; TAPER M. L. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, n. 2, p. 576-579, 2006.

- KALINOWSKI, S. T. *et al.* Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.
- KEOGH, J. S. Evolutionary, behavioural and molecular ecology must meet to achieve long-term conservation goals. *Molecular Ecology*, v. 18, n. 18, p. 3761-3762, Sep 2009.
- KOENIG, W. D., D. VAN VUREN, P. N. HOOGE. Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* v. 11, p. 514-517, 1996.
- KONOVALOV, D.A.; MANNING, C.; HENSHAW, M.T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 4, p. 779-782, 2004.
- KONOVALOV, D.A.; HEG, D. A maximum-likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 256-263, 2008.
- KREBS, E A.; HUNTE, W.; GREEN, D. J. Plume variation, breeding performance and extra-pair copulations in the cattle egret. *Behaviour*, v. 141, p. 479-499, 2004.
- KUSHLAN, J. A. Promiscuous mating behavior in white-ibis. *Wilson Bulletin*, v. 85, n. 3, p. 331-332, 1973.
- KUSHLAN, J. A. Wading bird predation in a seasonally fluctuating pond. *Auk*, v. 93, p. 464-476, 1976.
- KUSHLAN, J. A. Resource use strategies of wading birds. *Wilson Bulletin*, v. 93, p. 145-163, 1981.
- KUSHLAN, J. A. Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colonial Waterbirds*, v. 16, n. 2, p. 223-251, 1993.
- KUSHLAN, J. A.; MORALES, G.; FROHRING, P. C. Foraging niche relations of wading birds in tropical wet savannas. In: BUCKLEY, P.A. *et al.* (Ed.). *Neotropical ornithology*. Washington, DC: The American Ornithologists' Union, 1985. p. 663-682. (Ornithological Monographs; 36).
- KUSHLAN, J. A.; HANCOCK, J. A. Herons. In: PERRINS, C. M.; BOCK, W. J.; KIKKAWA, J. *Bird Families of the World*. New York: Oxford University Press, 2005. v. 14.
- KUSHLAN, J. A.; BILDSTEIN, K.L. White Ibis (*Eudocimus albus*). In: POOLE, A.; GILL, F. *The Birds of North America*. Washington, DC: The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia & The American Ornithologists' Union, 1992. no. 9.
- KUSHLAN, J. A. Feeding ecology and prey selection in the White Ibis. *Condor*, v. 81, p. 376-389, 1979.
- KUSHLAN, J. A.; OGDEN, J. C.; TILMANT J. L. Relation of water level and fish availability to Wood Stork reproduction in the southern Everglades, Florida. U.S. Geological Survey Open File Rep. 75-434, 1975.

- LACK, D. *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. London: Methuen, 1968.
- LACY, R. Managing genetic diversity in captive populations of animals. In: BOWLES, M.; WHELAN, J. C. *Restoration of Endangered Species: Conceptual Issues, Planning and Implementation*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994.
- LEHMANN, L.; PERRIN, N. Inbreeding avoidance through kin recognition: Choosy females boost male dispersal. *American Naturalist*, v. 162, p. 638–652, 2003.
- LI, C.; WEEKS, D.; CHAKRAVARTI, A. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity*, v. 43, p. 45–52, 1993.
- LIGON, J. D. *The evolution of avian breeding systems*. New York: Oxford University Press, 1999.
- LIVEZEY, B.; ZUSI, R. Higher-order phylogenetics of modern Aves based on comparative anatomy. *Netherlands Journal of Zoology*, v. 51, p. 179–206, 2001.
- LORENZ, J. J. et. al. Roseate spoonbill reproduction as an indicator for restoration of the Everglades and the Everglades estuaries. *Ecological Indicators* v. 9, n. 6[S1], p. S96-S107, Nov 2009.
- LYNCH, M. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, v. 5, p. 584-599, 1988.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, v. 152, n. 4, p. 1753-1766, 1999.
- LYNCH, M.; WALSH, J. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998.
- LYON, B. E.; EADIE, J. M. Conspecific Brood Parasitism in Birds: A Life-History Perspective. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, v. 39, p. 343-363, 2008.
- MACEDO, R. H.; KARUBIAN, J.; WEBSTER, M.S. Extrapair paternity and sexual selection in socially monogamous birds: are tropical birds different? *Auk*, v. 125, n. 4, p. 769-777, Oct 2008.
- MACEDO, R. H. Neotropical model systems: Social and mating behavior of birds. *Ornitologia Neotropical*, v. 19, p. 85-93, 2008.
- MANTEL, N. Detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Bird conservation in Brazil. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 665-671, Jun 2005.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON J. M.. Statistic confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, v. 7, n. 5, p. 639-655, 1998

- MATHEU, E.; DEL HOYO, J. Family Threskiornithidae. In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. *Handbook of the Birds of the World*. Barcelona: Lynx Ediciones, 1992. v. 1.
- MATOCQ, M. D.; LACEY, E. A. Philopatry, kin clusters, and genetic relatedness in a population of woodrats (*Neotoma macrotis*). *Behavioral Ecology*, v. 15, p. 647–653, 2004.
- MAYS, H. L.; HILL, G. E. Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends Ecology and Evolution*, v. 19, p. 554–559, 2004.
- MCCRIMMON, D. A. JR.; OGDEN, J. C.; BANCROFT, G. T. Great Egret (*Ardea alba*). In: POOLE, A.; GILL, F. *The Birds of North America*. Philadelphia, PA: The Birds of North America, Inc., 2001. no. 570.
- MCGUIRE, H. L.; NOOR, M. A. F. Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes*, v. 2, n.2, p. 170 – 172, 2002.
- MCKILLIGAN, N. G. Promiscuity in the Cattle Egret *Bulbucus ibis*. *Auk*, v. 107, n. 2, p. 334-341, 1990.
- MCMASTER, D. G.; SEALY, S. G. Do brown-headed cowbird hatchlings alter adult Yellow Warbler behavior during the hatching period? *Journal of Field Ornithology*, v. 70, n. 3, p. 365-373, Sum 1999.
- MCVAY, J. D. et. al. Evidence of Multiple Paternity in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, Inferred From Microsatellite Markers. *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology*, v. 309A, n. 10, p. 643-648, Dec 2008.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R. *A guide to the birds of South America*. Philadelphia: Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1982.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R.; PHELPS, W. H Jr. *A guide to the birds of Venezuela*. Princeton: Princeton University Press, 1978.
- MILLER, H. *et al.* Influence of major histocompatibility complex genotype on mating success in a free-ranging reptile population. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v. 276, n. 1662, p. 1695-1704, 2009.
- MILLIGAN, B. G. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, v. 163, n. 3, p. 1153-1167, 2003.
- MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO AMAPÁ. *Atlas Unidades de Conservação do Estado do Amapá*. Disponível em: < <http://www.mp.ap.gov.br/portal/atlas/1.php>>. Acessado em: 20/10/2010.
- MIÑO, C. I. *Estrutura genética e Relações de parentesco em populações naturais de colhereiro (Aves: Threskiornithidae)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- MIÑO, C. I.; DEL LAMA, S. N. Genetic structure in Brazilian breeding colonies of the Roseate Spoonbill (*Platalea ajaja*, aves : threskiornithidae). *Genetics and Molecular Research* v. 6, n. 2, p. 338-347, 2007.

- MIÑO, C. I.; DEL LAMA, S. N. 2009. Sistemas de acasalamento e biologia reprodutiva em aves aquáticas neotropicais. *Oecologia Brasiliensis* v. 13, p. 141-152.
- MIÑO, C. I. et. al. Parentage and Relatedness in Captive and Natural Populations of the Roseate Spoonbill (Aves: Ciconiiformes) Based on Microsatellite Data. *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology* v. 311A, n. 6, p. 453-464, 2009.
- MOCK, D. W. Pair formation displays of the Great Egret. *Condor*, v. 80, p. 159-172, 1978.
- MOLLER, A. P.; BIRKHEAD, T. R A pairwise comparative method as illustrated by copulation frequency in birds. *American Naturalist*, v. 139, p. 644-656, 1992.
- MOLLER, A. P.; BIRKHEAD, T. R Cuckoldry and sociality: a comparative study of birds. *American Naturalist*, v. 142, n. 1, p. 118-140, 1993.
- MORALES, G. Herons in South America. In: KUSHLAN J. A.; HAFFER H. *Heron Conservation*. London: Academic Press, 2000.
- MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, v. 51, p. 238–254, 2002.
- MORRISON, R.I.G.; SERRANO, I.L.; ANTAS P.T.Z.; ROSS, K. *Migratory birds in the Pantanal: distribution of neartic shorebirds and water species in the Pantanal*. Brasília: WWF – Brazil, 2008.
- MOURÃO, G. et. al. O Pantanal Mato-grossense. In: SEEDLIGER, U.; CORDAZZO, C.; BARBOSA, F. A. R. *Os sites e o programa brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração*. Belo Horizonte: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2002. p. 29-47
- MOUSSEAU, T. A.; RITLAND, K.; HEATH, D. D. A novel method for estimating heritability using molecular markers. *Heredity*, v. 80, p. 218-224, 1998.
- NAROSKY, T.; YZURIETA, D. *Birds of Argentina and Uruguay*. A Field Guide. Buenos Aires: Vazquez Mazzini Editores, 2003.
- NEFF, B. D.; PITCHER, T. E. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 19–38. 2005.
- NEI, M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, v. 106, p. 283-291, 1972.
- NEIFF, J.J. Humedales de la Argentina: sinopsis, problemas y perspectivas futuras. In: CIRELLI, A. F. *El Agua en Iberoamerica, Funciones de los humedales, calidad de vida y agua segura*. Argentina: CYTED, 2001. p. 83-112.
- NEUDORF, D. L. H. Extrapair paternity in birds: Understanding variation among species. *Auk*, v. 121, n. 2, p. 302-307, Apr 2004.

- OGDEN, J. C.; KALE, I. I. H. W; NESEITT, S. A. The influence of annual variation in rainfall and water levels on nesting by Florida populations of wading birds. *Trans. Linnaean Soc. New York*, v. 9, p. 115-126, 1980.
- OKLAND, J. M. *et al.* A method for defining management units based on genetically determined close relatives. *Ices Journal of Marine Scienc*, v. 67, n. 3, p. 551-558, Apr 2010.
- OLIEHOCK, P. A. *et al.* Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics*, v. 173, n. 1, p. 483-496, 2006.
- OLMOS, F.; SILVA E SILVA, R. *Guará: Ambiente, Flora e Fauna dos Manguezais de Santos-Cubatão*. São Paulo: Empresa das Artes, 2003.
- OLSON, D. *et. al.* *Freshwater biodiversity of Latin America and the Caribbean: a conservation assessment*. Washington, D.C. Biodiversity Support Program: World Wildlife Fund, 1998.
- OREN, D. C. Aves do Estado do Maranhão, Brasil. *Goeldiana Zoologica*, v. 9, p. 1-55. 1991.
- ORTEGA, J. *et. al.* Male dominance, paternity, and relatedness in the Jamaican fruit-eating bat (*Artibeus jamaicensis*). *Molecular Ecology*, v. 12, p. 2409–2415, 2003.
- PAETKAU, D. *et. al.* Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, v. 3, n. 5, p. 489-495, Oct 1994.
- PAILLISSON, J.M. *et. al.* Indirect evidence of conspecific nest parasitism in the colonial whiskered tern (*Chlidonias hybrida*). *Comptes Rendus Biologies*, v. 331, n. 7, p. 559-567, 2008.
- PALMER, R. S. *Handbook of North American birds*. New Haven, CT: Yale University Press, 1962.
- PARSONS, K. M. *et. al.* Kinship as a basis for alliance formation between male bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the Bahamas. *Animal Behavior* v. 66, p. 185-194, 2003.
- PAYNE, R.B. The ecology of brood parasitism in birds. *Annual Review in Ecology and Systematics*, v. 8, p. 1-28, 1977.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E.. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.
- PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, v. 5, p. 585–602, 2004.
- PEMBERTON, J. M. Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 275, n. 1635, p. 613-621, 2008.
- PERRIN, N; GOUDET, J. Inbreeding, kinship, and the evolution of natal dispersal. In *Dispersal* (CLOBERT, J.; DANCHIN, E.; DHONDT, A. A.; NICHOLS, J. D.). Oxford, UK: Oxford University Press, 2001.

- PETIT, R. J.; PONS, O. Bootstrap variance of diversity and differentiation estimators in a subdivided population. *Heredity*, v. 80, p. 56-61, 1998.
- PETRIE, M.; KEMPENAERS, B. Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 13, p. 52-58, 1998.
- PHELPS W.; PHELPS, W. Jr. Lista de Aves de Venezuela y su Distribución. No Passeriformes. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales*. v. 19, p 1-317. 1958
- PIRY, S. *et al.* GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of HereditY*, v. 95, n. 6, p. 536-539, 2004.
- POMILLA, C.; ROSENBAUM, H. C. Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on two wintering grounds of the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 9, p. 2541-2555, 2006.
- PRIMMER, C. R. *et al.* Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, v. 7, p. 471 – 482, 1997.
- PRITCHARD, J. K. *et al.* Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- PRATT, H. *Herons and Egrets of Audubon Canyon Ranch*. California: Audubon Canyon Ranch, 1993.
- PUSEY, A.; WOLF, M. Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, p. 201–206, 1996.
- QUADER, S. Mate choice and its implications for conservation and management. *Current Science*, v. 89, n. 7, p. 1220-1229, 2005.
- QUELLER, D. C. Genetic relatedness in viscous populations. *Evolutionary Ecology* v. 8, p. 70-73, 1994.
- QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, v. 43, n. 2, p. 258-275, 1989.
- QUELLER, D. C. 1985. Kinship, reciprocity and synergism in the evolution of social behavior. *Nature* 318: 366 – 367.
- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R.. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 8, n. 8, p. 285-&, 1993.
- RAMO, C. Extra-pair copulations of gray herons nesting at high densities. *Ardea*, v. 81, n. 2, p. 115-120, 1993.
- RAMSAR CONVENTION. 1993. Pantanal National Park Information Sheet. <<http://www.wetlands.org/reports/ris/6BR001en.pdf>>. Assesado em: 20/05/2010.

- RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 17, p. 9197-9201, 1997.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.
- REUSCH, T. et. al. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature*, v. 414, p. 300–302, 2001.
- REYNOLDS, J. D. Animal breeding systems. *Trends Ecology and Evolution*, v. 11, p. 68-72, 1996.
- RICE, W. R. Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989.
- RICHARDSON, D. S.; KOMDEUR, J.; BURKE, T. Inbreeding in the Seychelles warbler: environment-dependent maternal effects. *Evolution*, v. 58, p. 2037–2048. 2004.
- RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, v. 67, n. 2, p. 175-185, 1996.
- RITLAND, K. Marker inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, v. 9, n. 9, p. 1195-1204, 2000.
- RODGERS JA; SCHWIKERT JR ST; SHAPIRO-WENNER A. 1996. Nesting habitat of Wood Storks in north and central Florida, USA. *Colonial Waterbirds* v. 19, p. 1-2, 1996.
- ROHWER, F. C.; FREEMAN, S. The distribution of conspecific nest parasitism in birds. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, v. 67, n. 2, p. 239-253, 1989.
- ROUSSET, F. Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measure? *Heredity*, v. 88, p. 371-380, May 2002.
- ROCHA,C. D.; DEL LAMA,S. N.; REGITANO,L. C. A. Lack of Genetic Structuring among Tropical Brazilian Wood Stork Populations and Low Genetic Differentiation from North American Populations. *Biotropica*, v. 36, p. 248-258, 2004.
- RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, v. 13, n. 9, p. 2829-2840, 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTOS, M. S. et. al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*: Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, n. 2, p. 307-309. 2005.
- SANTOS, M. H. et al. Population genetic study of mitochondrial DNA in Roseate spoonbill (Aves; Platalea ajaja) breeding colonies from the Pantanal wetlands, Brazil. *Biochemical Genetics*, v. 46, n. 7-8, p. 492-505, Aug 2008.

- SAWYER, G. M.; BENJAMIN, R. C. Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, n. 3, p. 677-679, 2006.
- SAWYER, GM. *DNA profiling of captive Roseate Spoonbill (Ajaia ajaja) populations as a mechanism of determining lineage in colonial nesting birds*. 2002. Tese (Doutorado em Ciências) University of North Texas, 2002.
- SAYLER, R. D. Ecology and evolution of brood parasitism in waterfowl. In: BATT, D. J. *et al. Ecology and management of breeding waterfowl*. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1992.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.
- SCHWAGMEYER, P. L. *et al.* Species differences in male parental care in birds: A reexamination of correlates with paternity. *Auk*, v. 116, n. 2, p. 487-503, 1999.
- SEFC, K. M. *et al.* High frequency of multiple paternity in broods of a socially monogamous cichlid fish with biparental nest defence. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 10, p. 2531-2543, 2008.
- SEMEL, B.; SHERMAN, P. W. Dynamics of nest parasitism in wood ducks. *Auk*, v. 103, n. 4, p. 813-816, 1986.
- SEMEL, B.; SHERMAN, P. W. Intraspecific parasitism and nest-site competition in wood ducks. *Animal Behavior*, v. 61, p. 787-803, 2001.
- SHEDLOCK, A. M. *et al.* Phylogenomics of nonavian reptiles and the structure of the ancestral amniote genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 8, p. 2767 – 2772, 2007.
- SHELDON, F. H.; SLIKAS, B. Phylogeny in studies of bird ecology, behavior, and morphology. In: MINDELL, D. P. *Avian molecular evolution and systematics*. London: Academic Press, 1997.
- SIBLEY, C.; AHLQUIST, J.. *Phylogeny and Classification of Birds: A Study in Molecular Evolution*. New Haven & London: Yale University Press, 1990.
- SIBLEY, DA. *The Sibley Guide to Bird Life and Behavior*. New York: Alfred A. Knopf, 2001.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- SILVA, J. D. S. V. D.; ABDON, M. M. Delimitação do pantanal Brasileiro e as suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, p.1703-1711, 1998.
- SILVA, C. J. *et al.* Biodiversity in the Pantanal Wetland, Brazil. In: GOPAL, B.; JUNK, W. J.; DAVIS, J. A. *Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation*. Leiden, Holanda: Backhuys Publishers, 2001. p. 187-215.

- SILVA, C.J. da. Políticas e programas de conservação para o Pantanal. In: ARAÚJO, E. L. et. al. Biodiversidade, conservação e uso sustentado da flora do Brasil. Recife: UFPE/Imprensa Universitária, 2002. p. 68-70.
- SILVA, F.; BELLO FALLAVENA, M. A. Movimentos de dispersão de *Platalea ajaja* (Aves: Threskiornithidae) detectados a través de anilhamento. *Revista Ecológica Latinoamericana*, v. 2, p. 19-21, 1995.
- SKUTCH, A. The Appreciative Mind. In: SKUTCH, A. *A Bird Watcher's Adventures in Tropical America*. Austin, TX: University of Texas Press, 1977.
- SMITH, B. R.; HERBINGER, C. M.; MERRY, H. R. Accurate partition of individuals into full-sib families from genetic data without parental information. *Genetics*, v. 158, n. 3, p. 1329-1338, 2001.
- SOUZA, J. R. *Estrutura genética populacional da garça-branca-grande (Ardea alba egretta) revelada pelo uso de microssatélites*. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, 2008.
- STILES, F. G.; SKUTCH, A. F. *A guide to the birds of Costa Rica*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1989.
- STUTCHBURY, B. J.; MORTON, E. S. The effect of breeding synchrony on extra-pair mating systems in songbirds. *Behaviour*, v. 132, p. 675-690, 1995.
- STUTCHBURY, B. J. M.; MORTON, E. S. Recent advances in the behavioral ecology of tropical birds - The 2005 Margaret Morse Nice Lecture. *Wilson Journal of Ornithology*, v. 120, n. 1, p. 26-37, 2008.
- STUTCHBURY, B. J. M.; MORTON, E. S.; WOOLFENDEN, B. Comparison of the mating systems and breeding behavior of a resident and a migratory tropical flycatcher. *Journal of Field Ornithology*, v. 78, p. 40-49, 2007.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.
- TEMPLE, H. J.; HOFFMAN, J. I.; AMOS, W. Dispersal, philopatry and intergroup relatedness: fine-scale genetic structure in the white-breasted thrasher, *Ramphocinclus brachyurus*. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 3449-3458, 2006.
- THOMAS, S. C.; HILL, W. G.. Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, v. 155, p. 1961-1972, 2000.
- THOMPSON, E. A. The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics*, v. 39, p. 173 - 188. 1975.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A. M. et. al. Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, v. 3, n. 4, p. 563-566, 2003.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A. M. *Populações de Mycteria americana L. (Aves; Ciconiiformes) da América do Norte e do Pantanal Brasileiro: Estruturação genética, razão*

- sexual e assimetria flutuante*. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, 2004.
- TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. In: CAMPBELL, B. *Sexual selection and the descent of man, 1871-1971*. Chicago, IL: Aldine, 1972. pp 136–179.
- TUBELIS, D. P.; TOMAS, W M.. Bird species of the Pantanal wetland, Brazil. *Ararajuba*, v. 11, p. 5–37, 2003.
- TÚNEZ, J. I. et. al. Relatedness and social organization of coypus in the Argentinean pampas. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 147–155, 2009.
- UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC, AND CULTURAL ORGANIZATION – UNESCO. *Título do material*. Brasília, 2001.
- VALPINE, P.; EADIE, J. M. Conspecific Brood Parasitism and Population Dynamics.. *The American Naturalist*, v. 172, n. 4, p. 547-562, 2008.
- VAN DE CASTEELE, T.; GALBUSERA, P.; MATTHYSEN, E. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, v. 10, n. 6, p. 1539-1549, 2001.
- VAN HORN, R. C. *et al.* Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Animal Behaviour*, v. 75, p. 1173-1180, 2008.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004..
- VAN TUINEN, M.; BUTVILL, D.; KIRSCH, J.; HEDGES, S. Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 268, p. 1345-1350, 2001.
- WAGNER, A. P.; CREEL, S.; KALINOWSKI, S. T. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, v. 97, n. 5, p. 336-345, 2006.
- WAITS, L.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, v. 10, n. 1, p. 249-256, 2001.
- WANG, J.; SANTURE, A. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, v. 181, p. 1–16, 2009.
- WANG, J. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, v. 160, n. 3, p. 1203-1215, 2002.
- WANG, J. Estimating pairwise relatedness from dominant genetic markers. *Molecular Ecology*, v. 13, n. 10, p. 3169-3178, 2004.
- WATERBIRD CONSERVATION FOR THE AMERICAS. Report 2007. Disponível em: <<http://www.waterbirdconservation.com>>. Acessado em: 05/07/2010.

- WEATHERHEAD, P. J.; YEZERINAC, S. M. Breeding synchrony and extra-pair mating in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 43, n. 3, p. 217-219, 1998.
- WEBSTER, M. S.; REICHART, L. Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B*, v. 395, p. 222-238, 2005
- WEI, G. A. *et al.* Copulations and mate guarding of the Chinese Egret. *Waterbirds*, v. 28, n. 4, p. 527-530, 2005.
- WEIR, B.; COCKERHAM, C. C.. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.
- WEIR, B. S.; ANDERSON, A. D.; HEPLER, A. B. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews on Genetics*, v.7, p. 771 – 780, 2006.
- WERLE, E.; SCHNEIDER, C.; RENNER, M.; VÖIKER, M.; FIEHN, W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 20, p. 4354-4355, 1994.
- WESTNEAT, D. F.; WEBSTER, M. S. Molecular analyses of kinship in birds: Interesting questions and useful techniques. In: SCHIERWATER, B. *et. al.* *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994. p. 91-126.
- WESTNEAT, D.F., SHERMAN, P.W. & MORTON, M.L. The ecology and evolution of extrapair paternity in birds. *Current Ornithology*, v. 7, p. 331-369, 1990.
- WESTNEAT, D. F. Genetic parentage in the indigo bunting: a study using DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 27, p. 67-76, 1990.
- WESTNEAT, D. F.; STEWART, I. R. K. Extra-pair paternity in birds: causes, correlates and conflict. *Annual Reviews in Ecology and Evolutionary Systematics*, v. 34, p. 365-96, 2003
- WESTNEAT, D. F.; SHERMAN, P. W. Density and extra-pair fertilization in birds: a comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 41, n. 4, p. 205-215, 1997.
- WHITE, D. H.; MITCHELL, C. A.; CROMARTIE, E. Nesting ecology of Roseate Spoonbills at Nueces Bay, Texas. *Auk*, v. 99, p. 275-284, 1982.
- WHITTINGHAM, L.; DUNN, P. O. Effects of extra-pair and within-pair reproductive success on the opportunity for selection in birds. *Behavioral Ecology*, v. 16, n. 1, p. 138-144, 2003.
- WIESE, J. H. Courtship and pair formation in the great egret. *Auk*, v. 93, p. 709-724, 1976.
- WILBERG, M. J.; DREHER, B. P. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 4, p. 783-785, Dec 2004.
- WRIGHT, S. *Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v. 15, p.323–354, 1951.
- YA-JIE, J.; YU-DI, L.; CHANG-QING, D.; DE-XING, Z. Eight polymorphic microsatellite loci for the critically *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 615–617, 2004.
- YAMASHITA, C.; VALLE, M. P. Sobre ninhais de aves do Pantanal do município de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Vida Silvestre Neotropical*, v. 2, p. 59-63, 1990.
- YEUNG, C. K. L. *et al.* Assessment of the historical population size of an endangered bird, the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) by analysis of mitochondrial DNA diversity. *Animal Conservation*, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2006.
- YOM-TOV, Y. Intraspecific nest parasitism in birds. *Biological Reviews*, v. 55, p. 93-108, 1980.
- YOM-TOV, Y. An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds. *Ibis*, v. 143, n. 1, p. 133-143, 2001.
- ZEYL, E.; AARS, J.; EHRICH D.; WIIG, Ø. Families in space: relatedness in the Barents Sea population of polar bears (*Ursus maritimus*). *Molecular Ecology* v. 18, p. 735–749, 2009.
- ZINK, A. G. The evolution of intraspecific brood parasitism in birds and insects. *American Naturalist*, v. 155, n. 3, p. 395-405, Mar 2000.

Apêndices

Apêndice A

Descrição da composição da amostra coletada durante uma expedição, em 2007, às colônias localizadas no Amapá (AP), Brasil. Foram coletadas amostras de ninhegos de 105 ninhos de cabeça-seca. Entre esses ninhos, 1,92% apresentavam quatro ninhegos, 29,52% três ninhegos, 46,66% dois ninhegos, e 21,90% um único filhote (Fig. A1a). Somente 1,92% ninhos de cabeça-seca coletados nas colônias do Amapá teve quatro filhotes (Fig. A1a). Os ninhos pertenciam a quatro colônias: Macacoari (45,71%), Fazenda Nova Zelândia (9,52%), Fazenda Alegria (3,82%), e Se Cria (40,95%) (Figura A1a). Os ninhegos de cabeça-seca coletados no Amapá constituíram 151 pares de supostos irmãos. Na expedição ao Pantanal foram amostrados 104 ninhos de cabeça-seca, dos quais 85,71% possuíam um ninhego e 14,29% dois ninhegos (Fig. A1b). Os ninhegos coletados no Pantanal constituíram 42 pares de supostos irmãos.

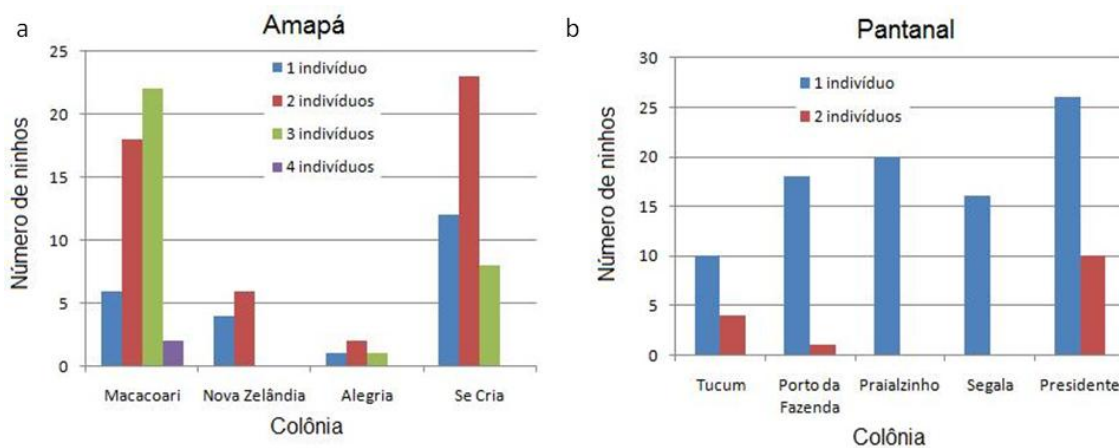


Figura A1. Descrição da amostra coletada em termos do número de ninhos de cabeça-seca com um, dois, três e quatro ninhegos, amostrados por colônia no a) Amapá e b) Pantanal, em 2007 e 2008.

Dos 39 ninhos de colhereiro coletados no Amapá em 2007, 61,53% foram coletados no ninhal Se Cria e 36,46% na Fazenda Nova Zelândia (Figura A2a). Dos ninhos amostrados 43,59% apresentava dois ninhegos, 35,90% três filhotes e 20,51% um ninhego (Fig. A2a). Os ninhegos de colhereiro do Amapá constituíram 56 pares de supostos irmãos. Na colônia Fazenda das Flores (RS), foram acessados 61 ninhos de colhereiro, dos quais 42,62% conteve um ninhego, 37,70% dois ninhegos, 14,75% três ninhegos e 4,93% quatro ninhegos (Fig. A2b). Os ninhegos estudados do RS formavam 68 pares de supostos irmãos. No Pantanal, foram amostrados, em 2008, 38 ninhos de colhereiro, dos quais 55,26% apresentavam um ninhego, 36,84% dois ninhegos e 7,90%

três ninhegos (Fig. A2c). Os ninhegos estudados do Pantanal constituíam 23 pares de supostos irmãos.

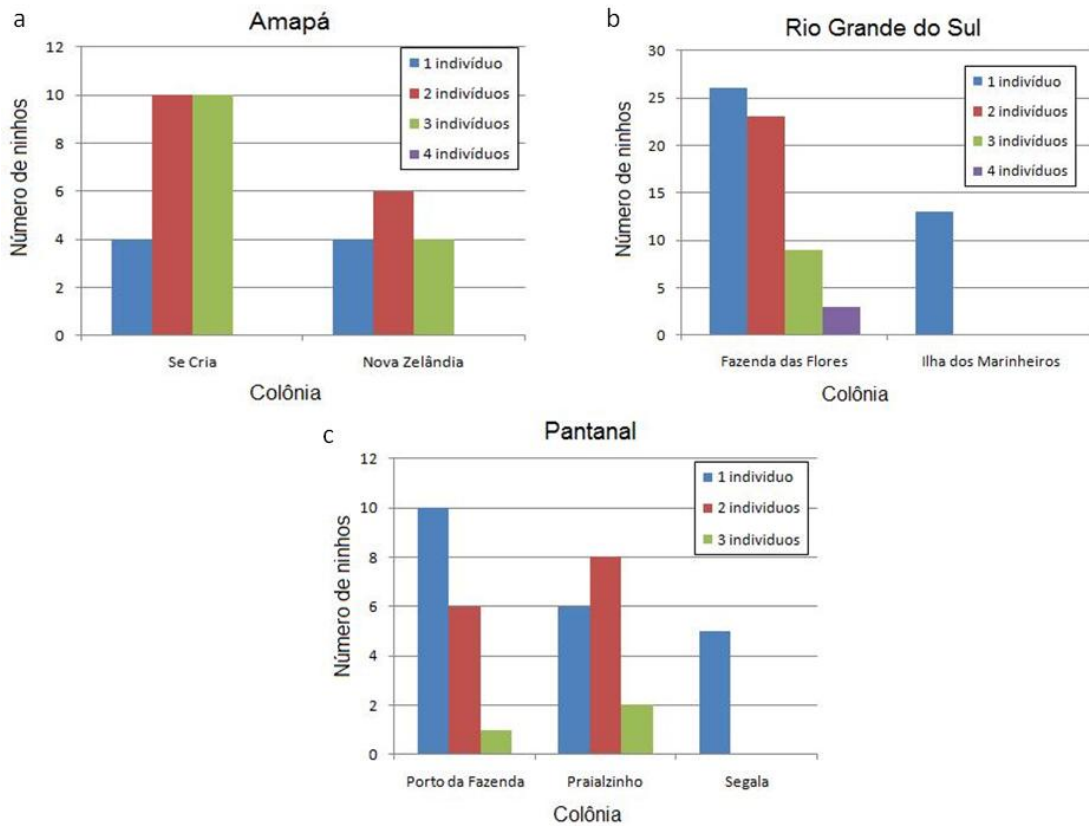


Figura A2. Descrição da amostra estudada em termos dos número de ninhos de colhereiro com um, dois, três e quatro ninhegos, referentes às colônias do a) Amapá, b) Rio Grande do Sul e c) Pantanal, em 2007 e 2008.

Seis ninhos de garça-branca-grande foram coletados no Amapá em 2007, dos quais quatro ninhos continham dois ninhegos cada um (quatro pares de supostos irmãos) (Fig. A3a). Esses ninhos pertenciam a duas colônias: Macacoari (33,33%) e Fazenda Nova Zelândia (66,67%) (Figura A3a). No Rio Grande do Sul, foram coletados 142 ninhos de garça-branca-grande, dos quais 86,62% possuíam um ninhego, 7,75% dois ninhegos, e 5,63% três ninhegos (Fig. A3b). Esses ninhos pertenciam a cinco colônias: Barra do Ribeira (28,87%), Santa Maria (23,94%), Serrinha (19%), Mariante (16,19%) e Pântano Grande (12%). Os ninhegos de garça-branca-grande do Rio Grande do Sul constituíram 35 pares de supostos irmãos. No Pantanal, foram coletados 60 ninhos de garça-branca-grande, dos quais 50% continham um ninhego, 46,66% dois ninhegos, e 3,34% três ninhegos (Fig. A3c). Esses ninhos se referem a cinco colônias: Tucum (16,68%), Porto da Fazenda (36,67%), Praialzinho (36,67%), Segala (8,34%), e

Presidente (1,64%) (Figura A3c). Os ninhegos de garça-branca-grande do Pantanal constituíram 34 pares de supostos irmãos.

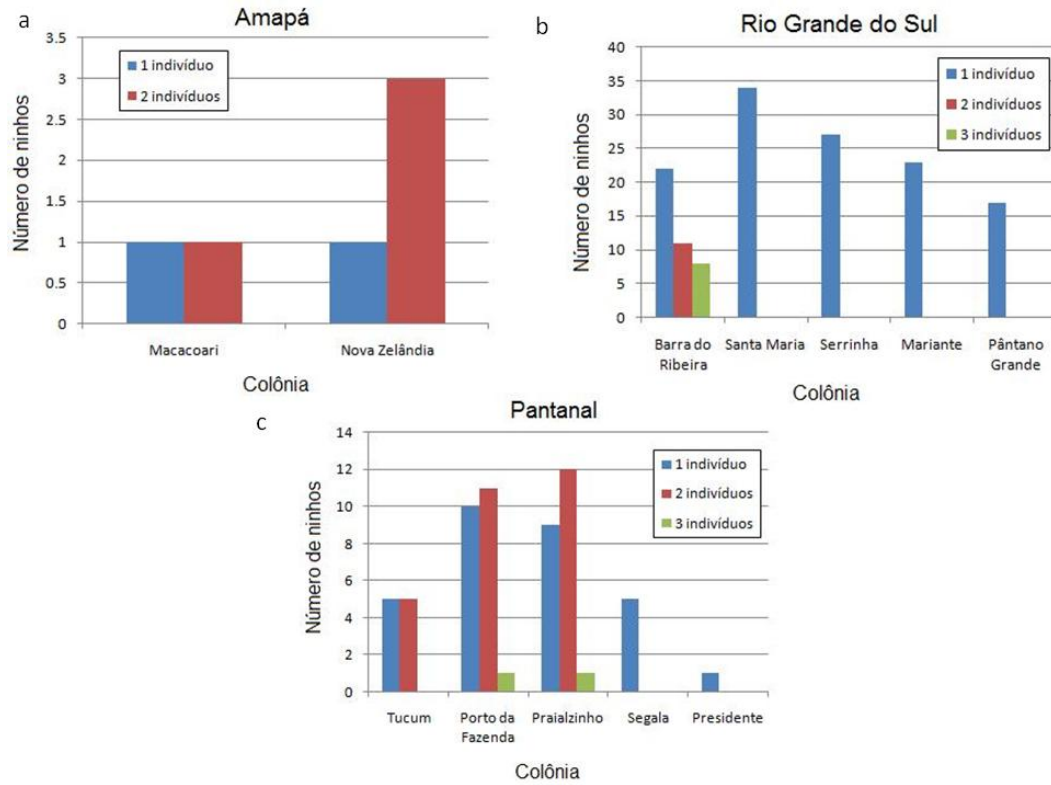


Figura A3. Descrição da amostra analisada em termos do número de ninhos de garça-branca-grande com um, dois, três e quatro ninhegos, nas colônias do: a) Amapá, b) Rio Grande do Sul, e c) Pantanal, em 2007 e 2008.

Apêndice B

Procedimento de extração de DNA das amostras de sangue e pena canhão

Amostras de 20 µl de sangue ou o conteúdo do raquis das penas canhão foram incubados em banho-maria a 55°C por 12-16 horas, com 220 µl de tampão de lise TNE (50 mM Tris-HCl, pH 8,5 25°C; 100 mM NaCl; EDTA 6,3 mM pH 7,5 25°C) e 10 µl de Proteinase K (10 mg/ µl) (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA). O isolamento do DNA genômico iniciou-se com a adição de 250 µl de Fenol (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) em cada tubo, seguida de agitação manual suave por 10 min. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 10 min. a 11.988 g (12.000 rpm), após o qual a fase superior da solução (sobrenadante) foi transferida para um tubo de 2,0 ml estéril e misturada com uma solução de Fenol-Clorofórmio (1:1) (250 µl de solução por tubo) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Repetiram-se os passos de agitação e centrifugação acima descritos. A fase superior da solução resultante após centrifugação foi transferida para um novo tubo estéril e acrescida de 250 µl de ma mistura de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Após vagarosa agitação por 10 min. e centrifugação por 10 min. a 11.988 g, os sobrenadantes resultantes desse último passo foram transferidos para tubos limpos, aos quais se adicionou Acetato de Sódio 3M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (10% do volume final) e Etanol Absoluto gelado (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (250% do volume final). Após leve agitação, a mistura foi deixada em freezer a -20°C durante 12 horas (ou uma noite) para que o DNA precipitasse. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 30 min. a 12.000 rpm em centrífuga refrigerada (modelo 5417R Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) para que precipitado de DNA ficasse no fundo do tubo. O sobrenadante resultante deste último passo (álcool) foi descartado e o precipitado deixado a temperatura ambiente a fim de que o restante do Etanol evaporasse. Após esse processo foram acrescentados entre 100 e 200 µl, dependendo do tamanho do precipitado, de água deionizada estéril para colocar o DNA em solução. A possível ocorrência de contaminação durante o procedimento de extração de DNA foi monitorada colocando, em cada conjunto de extrações realizado, um tubo sem material biológico, ao qual se efetuaram os mesmos procedimentos que aos demais tubos. A manipulação de reagentes químicos tóxicos e/ou daninhos à saúde foi realizada dentro de uma capela de exaustão e utilizando-se avental de proteção individual e luvas descartáveis.

Apêndice C

Descrição da metodologia de marcação fluorescente dinâmica

A metodologia de marcação fluorescente dinâmica envolve a adição da sequência M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') ao iniciador *forward* específico do par de oligonucleotídeos iniciadores que se quer marcar (STEFFENS et al., 1993; OETTING et al., 1995). Na reação de PCR, os iniciadores *forward* e *reverse* são utilizados em conjunto com um iniciador que possui a sequência M13, conjugada a um fluorocromo na porção 5'. Esse último iniciador é a única fonte de fluorescência, e pode ser utilizado em combinação com quaisquer iniciador *forward* que tenha a sequência M13, para gerar um produto de amplificação fluorescente (ver Figura 24). Os produtos de PCR obtidos com os iniciadores com a “cauda” M13 são exatamente equivalentes àqueles obtidos com os iniciadores sem a sequência M13, como demonstrado para mais de 40 marcadores investigados por Boutin-Ganache e cols. (2001). Essa metodologia permite reduzir custos financeiros, aumentar a especificidade e diminuir o tempo de trabalho no laboratório, pois permite padronizar reações nas quais mais de um marcador é amplificado numa única reação (BOUTIN-GANACHE et al., 2001). A concentração final do iniciador com a “cauda” M13 (*forward*) na PCR deve ser inferior à metade da concentração do iniciador *reverse* e do iniciador “universal”, para garantir que, durante os primeiros ciclos da reação, o fragmento amplificado seja o específico do loco de microssatélite. Nesse protocolo o iniciador universal M-13 será incorporado aos fragmentos somente depois que o iniciador *forward*-M13 fosse completamente utilizado. Nas reações de amplificação dos marcadores em garça-branca-grande, com volume final de 15 µl foram incluídos: tampão para PCR [75 mM Tris HCL pH 9,0 25°C; 50 mM KCL; 20 mM (NH₄)₂SO₄; (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, Espanha)], 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 1U *Taq* DNA Polimerase (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, Espanha), 0,20 µM do iniciador *forward* com adição da sequência M13, 0,80 µM do iniciador *reverse*, 0,80 µM do iniciador M-13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') com marcação fluorescente variável (TET, HEX ou FAM; Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canadá) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico como molde. Para a hibridação do iniciador *forward*-M13 conjugado com o fluorocromo o programa de amplificação requer a adição de oito ciclos finais a 53°C para (SCHUELKE 2000; e Fig. 24). Dessa forma, a amplificação seguiu o seguinte programa: 94°C por 5 min.; 30 ciclos de: 94°C por 30 s., temperatura de hibridação específica do iniciador usado por 45 s. com redução de 0,1°C por ciclo (*touchdown*) e 72°C por 45 s.; oito ciclos de: 94°C por 30 s., hibridação do

iniciador M13-fluorocromo por 45 s. à 53°C e extensão à 72°C por 45 s.; seguida de um passo final de extensão à 72°C por 10 min., e posterior manutenção dos tubos à 4°C até a sua retirada do aparelho termociclador.

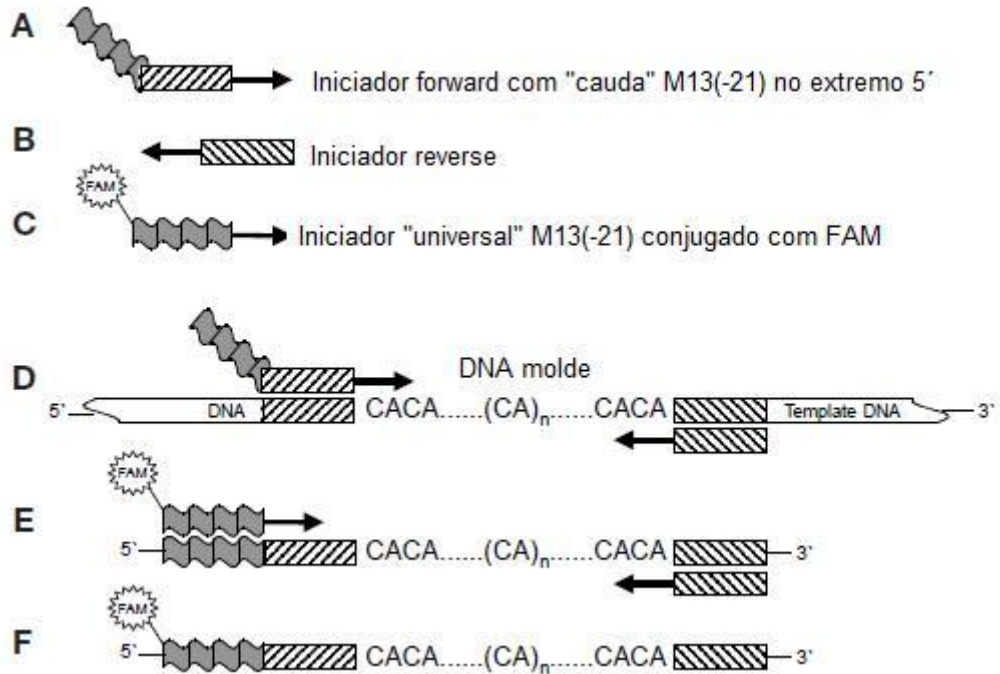


Figura C1. Esquema representativo de uma reação de amplificação de um fragmento de DNA realizada com iniciadores com adição da sequência M13. Durante os primeiros ciclos de amplificação, o iniciador marcado com a sequência M13 é incorporado ao produto de PCR (D). Esses produtos são alvos de hibridação com o iniciador marcado com o fluorocromo (na figura, FAM), o qual é incorporado ao produto de amplificação durante os últimos ciclos da PCR à 53 °C (E). O produto final de amplificação pode ser analisado em um sistema de detecção laser (F). (Figura adaptada de Schuelke 2000, *Nature Biotechnology*, 18: 233-234).

Apêndice D

Gráficos de distribuição dos valores de parentesco genético (r) par-a-par, estimados pelos índices de Queller e Goodnight (1989) ($Q\&G$) e de Lynch e Ritland (1999) ($L\&R$), para 1.000 pares simulados de indivíduos não relacionados (UR), meio-irmãos (HS), e irmãos-completos (FS), e para os pares de ninhegos amostrados dentro dos mesmos ninhos em colônias reprodutivas de cabeça-seca (*Mycteria americana*), colhereiro (*Platalea ajaja*) e garça-branca-grande (*Ardea alba*) do Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul, Brasil. As simulações fizeram-se com base nas freqüências alélicas em locos de microssatélites observadas para cada população e espécie.

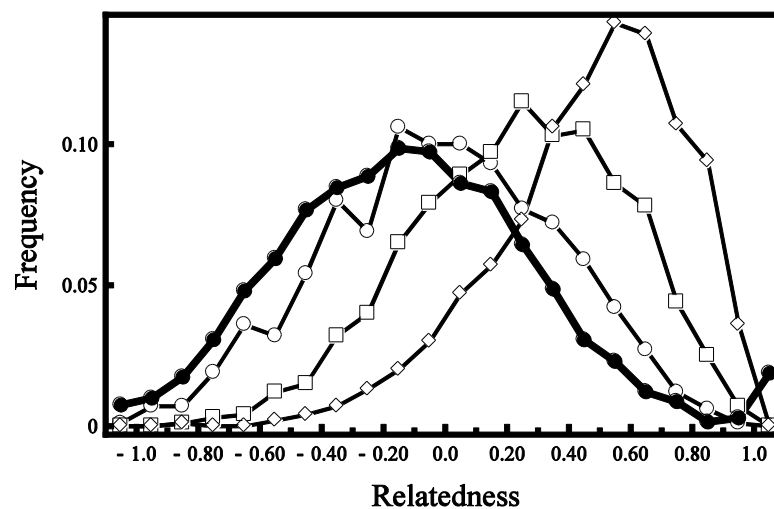


Figura D1. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de $Q\&G$ para pares simulados de *Mycteria americana*, com base nas freqüências alélicas observadas no Estado do Amapa.

Observados: ●; FS: ◊; HS: □; UR: ○.

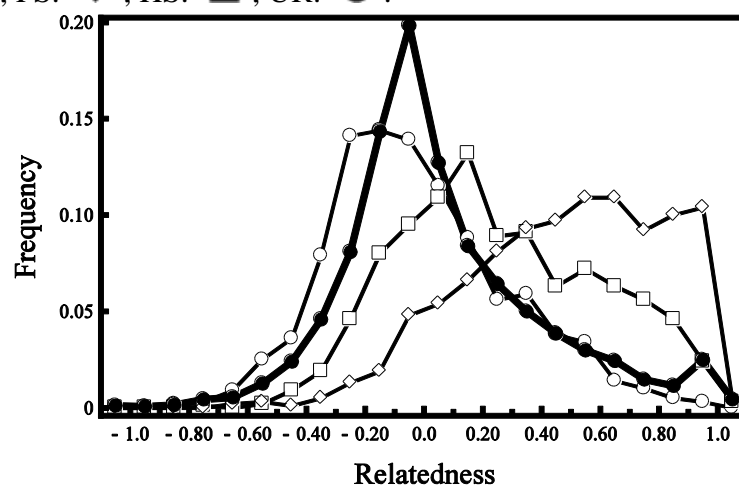


Figura D2. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de $L\&R$ para pares simulados de *Mycteria americana*, com base nas freqüências alélicas observadas no Estado do Amapa.

Observados: ●; FS: ◊; HS: □; UR: ○.

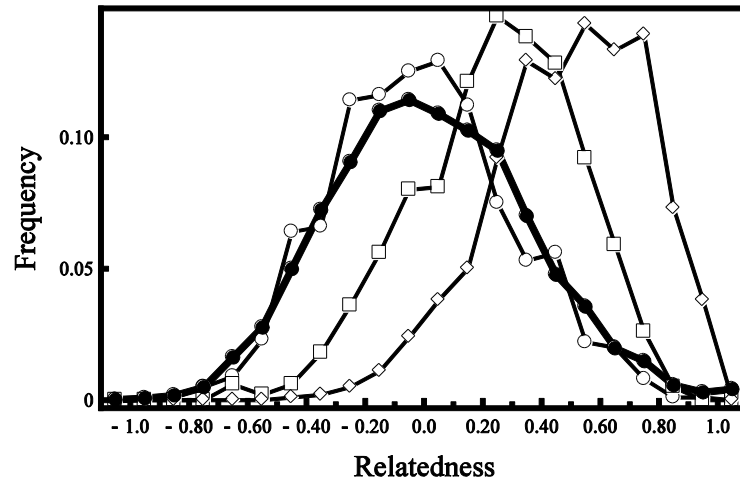


Figura D3. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *Q&G* para pares simulados de *Mycteria americana*, com base nas frequências alélicas observadas no Pantanal. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

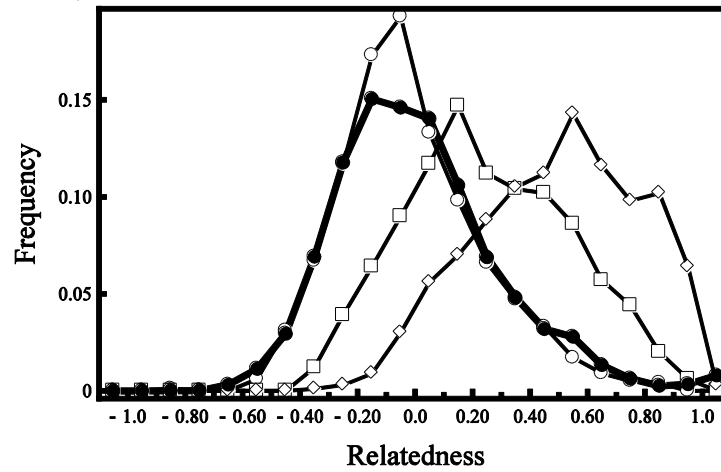


Figura D4. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *L&R* para pares simulados de *Mycteria americana*, com base nas frequências alélicas observadas no Pantanal. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

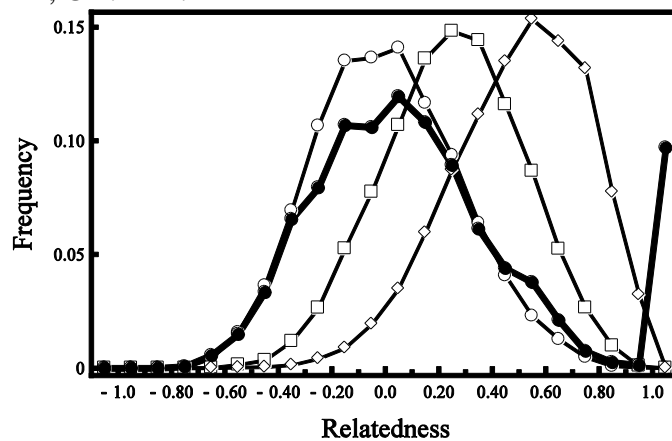


Figura D5. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *Q&G* para pares simulados de *Platalea ajaja*, com base nas frequências alélicas observadas no Estado do Amapá. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

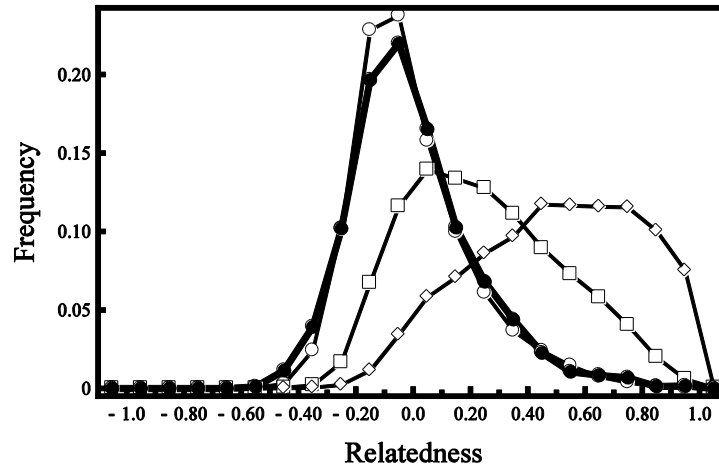


Figura D6. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *L&R* para pares simulados de *Platalea ajaja*, com base nas frequências alélicas observadas no Estado do Amapá. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

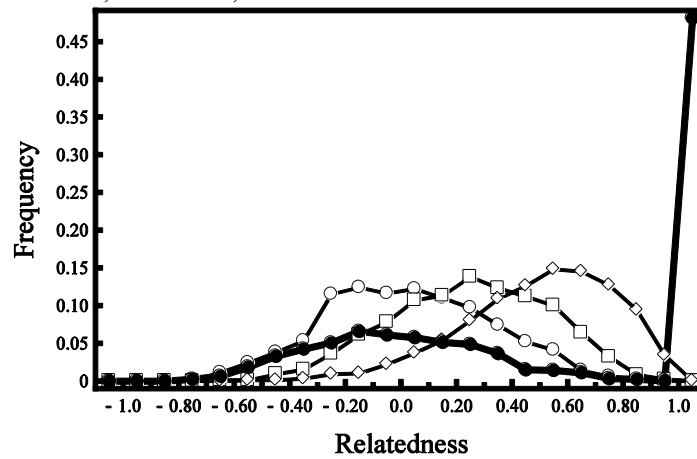


Figura D7. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *Q&G* para pares simulados de *Platalea ajaja*, com base nas frequências alélicas observadas no Estado do Rio Grande do Sul. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

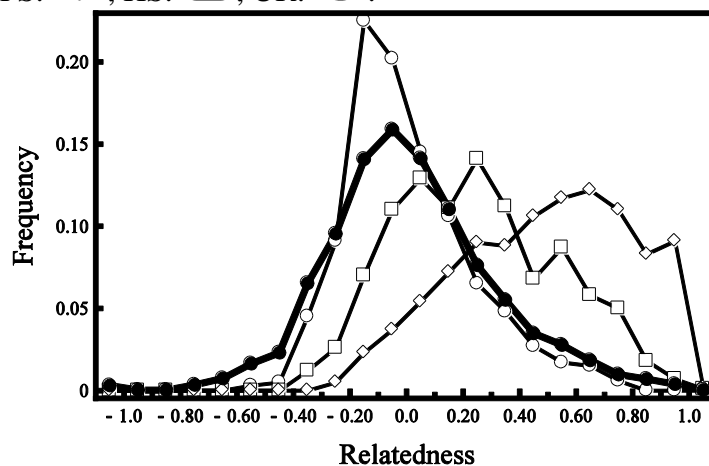


Figura D8. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *L&R* para pares simulados de *Platalea ajaja*, com base nas frequências alélicas observadas no Estado do Rio Grande do Sul. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

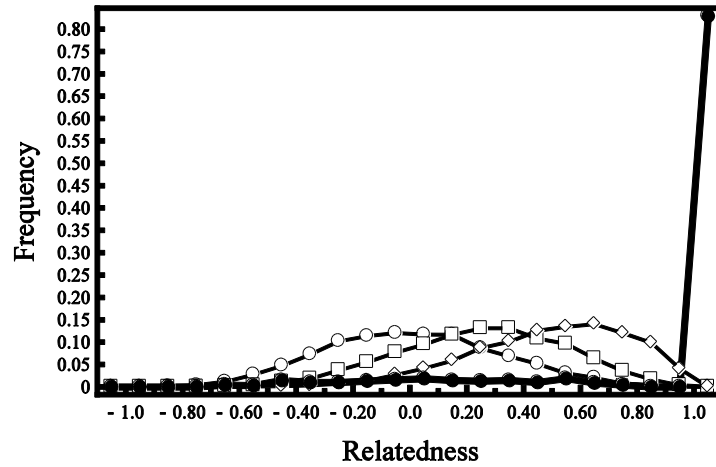


Figura D9. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *Q&G* para pares simulados de *Platalea ajaja*, com base nas freqüências alélicas observadas no Pantanal. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

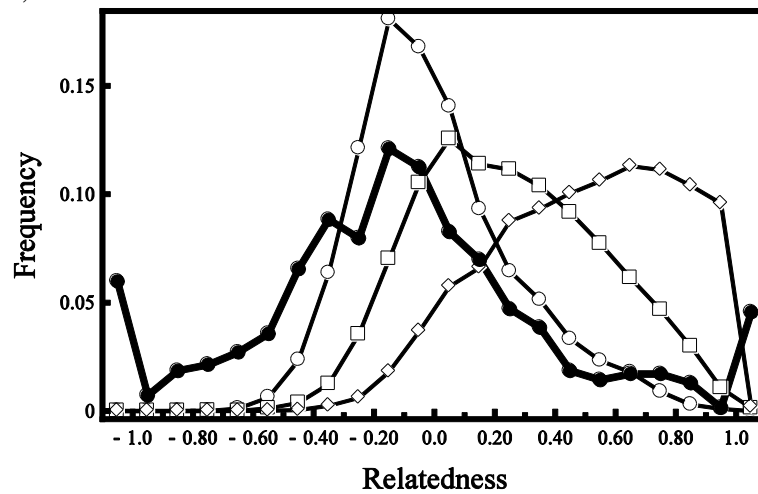


Figura D10. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *L&R* para pares simulados de *Platalea ajaja*, com base nas freqüências alélicas observadas no Pantanal. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

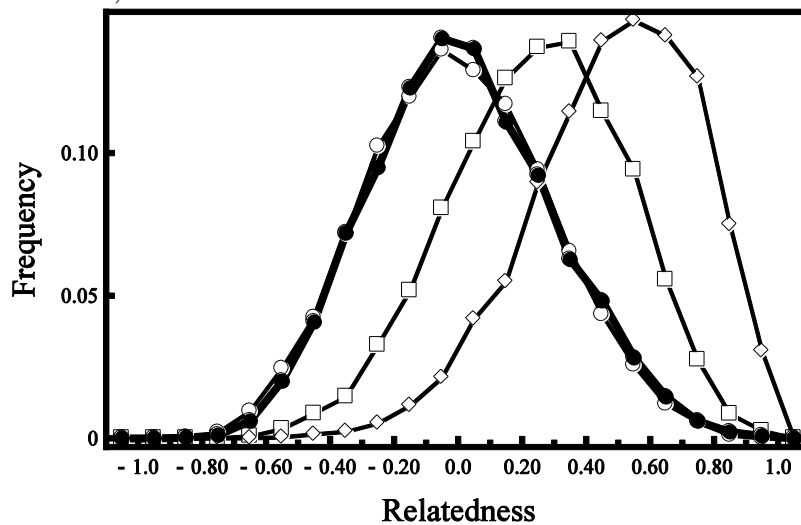


Figura D11. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *Q&G* para pares simulados de *Ardea alba egretta*, com base nas freqüências alélicas observadas no Pantanal. Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

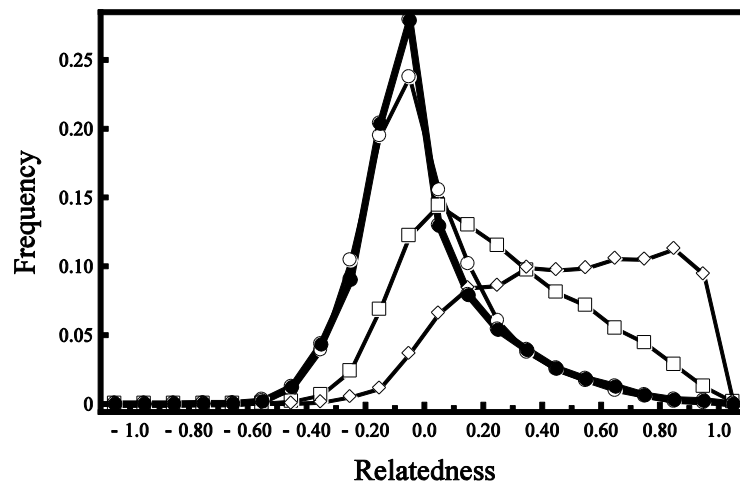


Figura D12. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *L&R* para pares simulados de *Ardea alba egretta*, com base nas frequências alélicas observadas no Pantanal.

Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

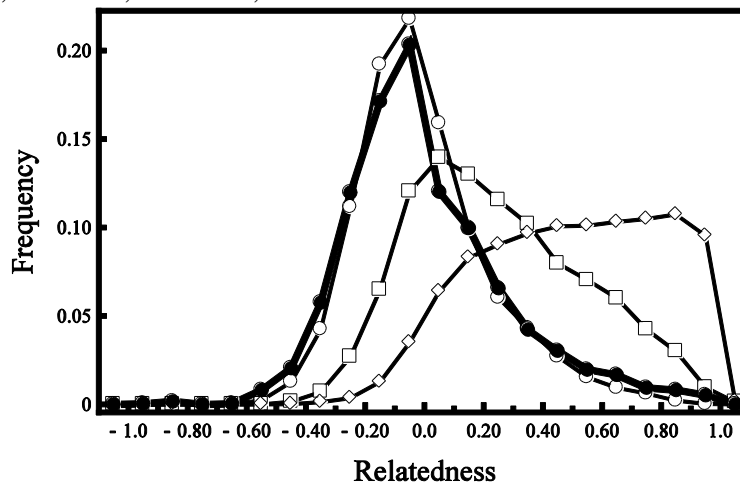


Figura D13. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *Q&G* para pares simulados de *Ardea alba egretta*, com base nas frequências alélicas observadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

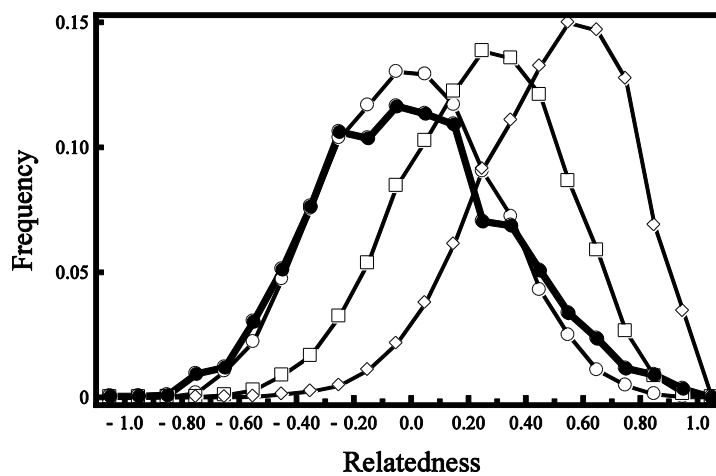


Figura D14. Distribuição dos valores de parentesco par-a-par de *L&R* para pares simulados de *Ardea alba egretta*, com base nas frequências alélicas observadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Observados: ●; FS: ◇; HS: □; UR: ○.

Apêndice E

Pares de ninhegos de cabeça-seca, colhereiro e garça-branca grande amostrados dentro dos mesmos ninhos em colônias reprodutivas do Estado do Amapá, Pantanal e do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) e cujos padrões de relacionamento genético foram estimados com base no uso de marcadores moleculares e metodologias de máxima verossimilhança, reconstrução de relacionamentos e testes de hipóteses.

Tabela E1. Pares de ninhegos de cabeça-seca (*Mycteria americana*) amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas do Estado do Amapá, Brasil, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; $Q&Gr$), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (P) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de P indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em nove locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	$Q&Gr$	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE ^s	COLONY [‡]	Relac.
#1	L73 – L75	-0,2070	UR**	UR/FS 0,006	0,047	NA	
#1	L74 – L73	-0,4175	UR	UR/FS 0,054	0,243	NA	
#1	L74 – L75	0,4752	FS*	FS/UR 0,043	4,819	NA	
#2	L76 – L77	0,3456	FS	FS/UR 0,156	1,125	NA	
#2	L76 – L78	-0,1200	UR*	UR/FS 0,029	0,154	NA	
#2	L77 – L78	0,1994	HS	HS/FS 0,185	0,826	NA	
#3	L79 – L80	-0,2300	UR*	UR/FS 0,078	0,081	NA	
#3	L79 – L81	-0,1410	UR	UR/FS 0,058	0,293	NA	
#3	L80 – L81	0,4274	HS	HS/FS 0,182	1,665	NA	
#4	L83 – L84	0,1340	UR*	UR/FS 0,033	0,179	NA	
#4	L82 – L83	0,1843	HS	HS/FS 0,286	1,062	NA	
#4	L82 – L84	0,3899	HS	HS/FS 0,209	0,895	NA	
#5	L85 – L86	-0,1110	UR**	UR/FS 0,008	0,058	NA	
#6	L87 – L89	-0,0320	UR**	UR/FS 0,013	0,067	NA	
#6	L88 – L87	0,3779	HS	HS/FS 0,140	0,872	NA	
#6	L88 – L89	0,1360	HS	HS/FS 0,284	2,997	NA	
#7	L90 – L91	-0,621	UR***	UR/FS 0,000	0,012	NA	UR
#8	L92 – L93	-0,338	UR**	UR/FS 0,000	0,013	NA	
#9	L94 – L96	0,0630	UR**	UR/FS 0,011	0,094	NA	
#9	L95 – L96	0,1030	UR*	UR/FS 0,031	0,488	NA	
#9	L94 – L95	0,3517	FS	UR/FS 0,089	0,400	NA	
#10	L97 – L98	-0,3120	UR***	UR/FS 0,000	0,004	NA	UR
#10	L98 – L99	0,0470	UR*	UR/FS 0,031	0,155	NA	
#10	L97 – L99	0,3944	HS	HS/FS 0,265	1,046	NA	
#11	L101 – L102	-0,1790	UR**	UR/FS 0,037	0,066	NA	
#11	L101 – L103	-0,2510	UR**	UR/FS 0,000	0,046	NA	
#11	L102 – L103	-0,1201	UR	UR/FS 0,009	2,450	NA	

#12	L104 – L105	0,1010	UR*	UR/FS 0,032	0,175	NA	
#12	L104 – L106	0,3454	UR	UR/FS 0,085	0,398	NA	
#12	L105 – L106	0,0913	HS	HS/FS 0,141	0,585	NA	
#13	L107 – L108	-0,1640	UR**	UR/FS 0,003	0,024	NA	
#14	L109 – L110	-0,5170	UR**	UR/FS 0,003	0,024	NA	
#15	L111 – L112	-0,5450	UR***	UR/FS 0,000	0,034	NA	UR
#15	L111 – L113	-0,2950	UR**	UR/FS 0,015	0,078	NA	
#15	L112 – L113	0,0500	UR**	UR/FS 0,013	0,074	NA	
#16	L114 – L115	0,6791	FS*	FS/UR 0,017	8,772	1,000	
#16	L114 – L116	0,6295	FS*	FS/UR 0,024	3,276	NA	
#16	L115 – L116	0,4585	FS	FS/UR 0,125	1,156	NA	
#17	L117 – L118	-0,2820	UR**	UR/FS 0,011	0,231	NA	
#17	L117 – L119	-0,3290	UR*	UR/FS 0,001	0,005	NA	
#17	L118 – L119	0,1697	UR*	UR/FS 0,012	1,343	NA	
#18	L120 – L121	0,2030	HS*	UR/FS 0,024	0,145	NA	
#19	L123 – L124	-0,0250	UR*	UR/FS 0,019	0,101	NA	
#20	L125 – L126	0,0140	UR**	UR/FS 0,015	0,091	NA	
#21	L127 – L128	-0,6050	UR**	UR/FS 0,013	0,153	NA	
#22	L129 – L131	-0,2830	UR**	UR/FS 0,002	0,621	NA	
#22	L129 – L130	0,2210	FS	FS/UR 0,233	0,026	NA	
#22	L130 – L131	-0,0002	UR	UR/FS 0,052	1,037	NA	
#23	L132 – L134	0,0150	UR**	UR/FS 0,016	0,087	NA	
#23	L132 – L133	-0,3866	UR	UR/FS 0,081	0,365	NA	
#23	L132 – L135	-0,2280	UR**	UR/FS 0,016	0,088	NA	
#23	L133 – L134	0,0330	UR*	UR/FS 0,041	0,184	NA	
#23	L134 – L135	0,2080	HS*	UR/FS 0,044	0,212	NA	
#23	L133 – L135	0,5160	FS	FS/UR 0,067	2,501	NA	
#24	L137 – L138	0,1520	HS*	UR/FS 0,042	0,214	NA	
#24	L136 – L137	-0,2140	UR	UR/FS 0,064	0,295	NA	
#24	L136 – L138	-0,0440	UR	UR/FS 0,070	0,345	NA	
#25	L139 – L140	0,1040	HS*	UR/FS 0,016	0,113	NA	
#26	L141 – L142	-0,3700	UR**	UR/FS 0,003	0,074	NA	
#26	L141 – L143	0,2760	HS*	UR/FS 0,038	0,564	NA	
#26	L142 – L143	-0,1590	HS	HS/FS 0,088	0,086	NA	
#27	L144 – L145	-0,0850	UR**	UR/FS 0,004	0,035	NA	
#27	L145 – L146	-0,3700	UR***	HS/FS 0,204	0,032	NA	UR
#27	L145 – L147	-0,3360	UR**	UR/FS 0,003	0,090	NA	
#27	L144 – L146	0,6210	HS	HS/FS 0,204	1,860	NA	
#27	L146 – L147	0,2938	FS*	FS/UR 0,034	0,481	NA	
#27	L144 – L147	0,1146	UR	UR/FS 0,068	0,773	NA	
#28	L148 – L149	0,2092	HS	HS/FS 0,060	0,562	NA	
#29	L150 – L151	-0,5630	UR***	UR/FS 0,000	0,004	NA	UR
#29	L150 – L152	-0,8600	UR***	UR/FS 0,000	0,005	NA	UR
#29	L151 – L152	0,1415	UR*	FS/UR 0,018	0,602	NA	
#30	L154 – L155	-0,2070	UR*	UR/FS 0,045	0,268	NA	
#30	L153 – L154	0,7929	FS*	FS/UR 0,016	9,637	1,000	
#30	L153 – L155	-0,1267	UR	UR/FS 0,057	0,360	NA	
#31	L156 – L157	0,0420	UR*	UR/FS 0,033	0,191	NA	
#31	L156 – L158	0,0030	UR*	UR/FS 0,025	0,189	NA	
#31	L157 – L158	-0,4240	UR***	UR/FS 0,000	0,012	NA	UR
#32	L159 – L160	0,0020	UR**	UR/FS 0,015	0,095	NA	
#32	L159 – L161	-0,2620	UR***	UR/FS 0,000	0,011	NA	UR
#32	L160 – L161	0,8418	FS**	FS/UR 0,004	20,132	0,896	FS

#33	L163 – L164	0,1270	UR*	UR/FS 0,034	0,224	NA	
#33	L162 – L163	0,5479	FS**	FS/UR 0,007	19,529	0,959	FS
#33	L162 – L164	0,1098	UR**	UR/FS 0,007	0,391	NA	
#34	L168 – L169	-0,1530	UR**	UR/FS 0,005	0,049	NA	
#35	L170 – L171	-0,4650	UR***	UR/FS 0,000	0,009	NA	UR
#36	L173 – L174	-0,4640	UR**	UR/FS 0,001	0,012	NA	
#37	L175 – L176	-0,5070	UR**	UR/FS 0,001	0,014	NA	
#38	L182 – L183	0,2030	HS*	UR/FS 0,023	0,165	NA	
#39	L177 – L178	0,2785	FS	FS/UR 0,075	2,771	NA	
#40	L179 – L180	0,4448	FS*	FS/UR 0,014	4,832	NA	
#41	L182 – L184	-0,4790	UR**	UR/FS 0,001	0,008	NA	
#41	L183 – L184	-0,5010	UR**	UR/FS 0,013	0,090	NA	
#41	L182 – L183	0,1156	UR*	UR/FS 0,030	0,165	NA	
#42	L185 – L186	0,0000	UR*	UR/FS 0,015	0,099	NA	
#43	L189 – L190	-0,2800	UR**	UR/FS 0,001	0,020	NA	
#44	L191 – L192	-0,5320	UR***	UR/FS 0,000	0,003	NA	UR
#45	L193 – L194	-0,1090	UR*	UR/FS 0,039	0,175	NA	
#46	L195 – L196	-0,1632	HS	HS/FS 0,088	0,518	NA	
#47	L197 – L198	0,3228	FS	FS/UR 0,076	0,867	NA	
#48	L199 – L200	-0,0030	UR*	UR/FS 0,027	0,146	NA	
#48	L199 – L201	0,1060	UR*	UR/FS 0,031	0,175	NA	
#48	L200 – L201	0,7878	FS*	UR/FS 0,047	3,721	NA	FS
#49	L203 – L204	0,1070	UR*	UR/FS 0,020	0,151	NA	
#50	L206 – L207	0,3852	FS**	FS/UR 0,004	17,380	0,853	FS
#51	L209 – L210	-0,4750	UR***	UR/FS 0,000	0,011	NA	UR
#52	L214 – L216	-0,4030	UR***	UR/FS 0,000	0,005	NA	UR
#53	L230 – L231	0,7906	FS	FS/UR 0,001	13,754	1,000	FS
#54	L232 – L233	0,2828	UR	UR/FS 0,078	0,054	NA	
#55	L212 – L213	0,2727	FS*	FS/UR 0,033	1,042	NA	
#56	L217 – L218	-0,6240	UR**	UR/FS 0,004	0,037	NA	
#57	L219 – L220	-0,0160	UR*	UR/FS 0,022	0,110	NA	
#57	L219 – L221	-0,1430	UR**	UR/FS 0,001	0,016	NA	
#57	L220 – L221	0,5154	HS	HS/FS 0,263	1,057	NA	
#58	L222 – L223	0,0180	UR*	UR/FS 0,015	0,228	NA	
#58	L222 – L224	0,3304	HS	HS/FS 0,056	1,425	NA	
#58	L223 – L224	0,2434	UR*	UR/FS 0,016	3,202	NA	
#59	L226 – L227	-0,1630	UR**	UR/FS 0,012	0,224	NA	
#59	L226 – L228	-0,1600	UR**	UR/FS 0,001	0,040	NA	
#59	L227 – L228	0,4986	FS**	FS/UR 0,001	1,893	0,854	
#60	L235 – L236	-0,2380	UR**	UR/FS 0,001	0,013	NA	
#61	L237 – L238	-0,1430	UR**	UR/FS 0,002	0,024	NA	
#62	L239 – L240	0,5397	FS*	FS/UR 0,002	1,067	NA	
#62	L239 – L241	0,1662	UR	UR/FS 0,152	0,007	NA	
#62	L240 – L241	0,3381	FS*	FS/UR 0,014	1,098	NA	
#63	L242 – L243	-0,1390	UR**	UR/FS 0,011	0,078	NA	
#63	L242 – L244	-0,5060	UR**	UR/FS 0,002	0,023	NA	
#63	L243 – L244	-0,1493	HS	HS/FS 0,162	1,055	NA	
#64	L245 – L246	-0,1440	UR**	UR/FS 0,003	0,027	NA	
#64	L246 – L247	0,1587	FS	FS/UR 0,104	1,516	NA	
#64	L245 – L247	-0,3080	UR***	UR/FS 0,000	0,027	NA	UR
#65	L249 – L250	0,2834	UR	UR/FS 0,058	0,315	NA	
#66	L251 – L252	0,0532	UR	UR/FS 0,053	0,298	NA	
#67	L253 – L254	0,1890	HS*	UR/FS 0,033	0,190	NA	

#68	L255 – L256	-0,3680	UR**	UR/FS 0,003	0,032	NA	
#68	L255 – L257	-0,1730	URR***	UR/FS 0,000	0,009	NA	UR
#68	L256 – L257	0,3320	HS	HS/FS 0,289	4,816	NA	
#69	L259 – L260	-0,6110	URR***	UR/FS 0,000	0,010	NA	UR
#70	L261 – L262	0,5267	FS*	FS/UR 0,015	11,707	1,000	FS
#70	L261 – L263	0,3536	FS*	FS/UR 0,053	3,868	1,000	FS
#70	L262 – L263	0,9990	FS***	FS/UR 0,000	15,724	1,000	FS
#71	L264 – L265	-0,0720	UR**	UR/FS 0,003	0,034	NA	
#72	L267 – L268	-0,2380	UR**	UR/FS 0,004	0,035	NA	
#73	L272 – L273	-0,1740	UR**	UR/FS 0,003	0,029	NA	
#74	L274 – L275	0,0470	UR**	UR/FS 0,001	0,005	NA	
#75	L279 – L280	-0,4890	***	UR/FS 0,000	0,008	NA	UR
#76	L277 – L278	0,0905	UR	HS/FS 0,231	0,009	NA	
#77	L283 – L284	-0,1450	UR	UR/FS 0,052	0,316	NA	
#78	L285 – L286	-0,3081	UR	UR/FS 0,099	0,518	NA	
#79	L287 – L288	0,1032	UR*	FS/UR 0,048	3,219	NA	
#80	L289 – L290	-0,4710	UR**	UR/FS 0,001	0,021	NA	
#81	L291 – L292	-0,0820	UR*	UR/FS 0,022	0,106	NA	

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,00005, para HS = 0,0102; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 11663,6868, para HS = 177,4476);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Tabela E2. Pares de ninhegos de cabeça-seca (*Mycteria americana*) amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; *Q&Gr*), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (*P*) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de *P* indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em nove locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	<i>Q&Gr</i>	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE [§]	COLONY [‡]	Relac.
#1	A041 - A042	-0,1705	U*	UR/FS 0,009	0,282	NA	
#2	A046 – A047	0,2566	HS	HS/FS 0,563	1,501	NA	
#3	A048 – A049	0,0107	UR*	UR/FS 0,027	0,032	NA	
#4	A052 – A054	-0,5596	UR**	UR/FS 0,007	0,062	NA	
#5	A058 – A059	-0,2824	UR*	UR/FS 0,020	0,133	NA	
#6	A060 – A061	-0,3873	UR**	UR/FS 0,007	0,048	NA	
#7	A062 – A063	-0,3709	UR**	UR/FS 0,000	0,074	NA	
#8	A076 – A079	-0,9777	URR***	UR/FS 0,000	0,002	NA	UR
#9	A077 – A078	-0,7724	URR***	UR/FS 0,000	0,007	NA	UR
#10	A080 – A081	-0,7787	UR**	UR/FS 0,000	0,083	NA	
#11	A003 – A004	-0,5402	UR**	UR/FS 0,003	0,052	NA	
#12	A010 – A011	-0,2356	UR**	UR/FS 0,048	0,026	NA	
#13	A012 – A013	-0,0450	UR	UR/FS 0,063	0,013	NA	
#14	A017 – A018	-0,0634	UR*	UR/FS 0,020	0,009	NA	
#15	A024 – A023	-0,3650	UR	UR/FS 0,083	0,031	NA	
#16	A025 – A026	0,0061	UR*	UR/FS 0,023	0,162	NA	

#17	A027 – A028	-0,0567	UR*	UR/FS 0,008	0,093	NA	
#18	A117 – A116	-0,212	UR**	UR/FS 0,006	0,006	NA	
#19	A120 – A119	0,0648	UR*	UR/FS 0,032	0,127	NA	
#20	A122 – A123	0,0997	UR*	UR/FS 0,031	0,177	NA	
#21	A124 – A125	0,3521	FS	FS/UR 0,144	2,774	NA	
#22	A155 – A156	-0,4181	UR*	FS/UR 0,049	0,193	NA	
#22	A154 – A156	0,2536	HS	HS/FS 0,23	1,212	NA	
#22	A155 – A154	0,4561	FS*	FS/UR 0,049	2,684	NA	
#23	A164 – A165	0,0506	UR*	UR/FS 0,028	0,178	NA	
#24	A170 – A169	-0,008	UR**	UR/FS 0,003	0,023	NA	
#25	A172 – A173	0,1275	HS*	UR/FS 0,033	0,156	NA	
#26	A176 – A177	-0,2546	UR	UR/FS 0,061	0,472	NA	
#27	A185 – A186	-0,8415	UR*	UR/FS 0,012	0,564	NA	
#28	T03 – T04	-0,096	UR	UR/FS 0,054	0,257	NA	
#29	T11 – T12	0,5722	FS	FS/UR 0,115	3,384	NA	
#30	T16 – T17	-0,4711	UR*	UR/FS 0,046	0,243	NA	
#31	T22 – T23	-0,2582	UR***	UR/FS 0,001	0,048	NA	UR
#32	T38 – T39	-0,1285	UR**	UR/FS 0,008	0,049	NA	
#33	T230 – T231	-0,1979	UR**	UR/FS 0,005	0,035	NA	
#34	T237 – T238	-0,1305	UR**	UR/FS 0,008	0,051	NA	
#35	T240 – T241	0,4544	HS	HS/FS 0,188	0,067	NA	
#36	T244 – T245	-0,5269	UR**	UR/FS 0,000	0,003	NA	
#37	T250 – T251	-0,2486	UR**	UR/FS 0,002	0,031	NA	
#38	T254 – T255	0,8280	FS*	FS/UR 0,045	3,442	NA	
#39	T257 – T258	0,1434	UR*	UR/FS 0,038	0,245	NA	
#40	T259 – T260	0,3055	FS*	FS/UR 0,045	0,862	NA	
#41	T270 – T271	0,3416	FS	FS/U 0,057	1,840	NA	

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,00001, para HS = 0,0159; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 2939,7257, para HS = 37,3238);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Tabela E3. Pares de ninhegos de colhereiro (*Platalea ajaja*) amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas do Estado do Amapá, Brasil, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; *Q&Gr*), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (*P*) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de *P* indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em cinco locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	<i>Q&Gr</i>	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE [§]	COLONY [‡]	Relac.
1	M121-M120	0,0997	UR	UR/FS 0,0291	0,196	NA	
1	M120-M119	-0,2578	UR*	UR/FS 0,0128	0,005	NA	
1	M121-M119	-0,2579	UR*	UR/FS 0,0286	0,004	NA	
2	M123-M122	-0,0749	UR*	UR/FS 0,0087	0,081	NA	
3	M145-M144	0,8167	FS**	FS/UR 0,0112	56,510	0,990	FS

3	M146-M144	0,3134	HS	FS/UR 0,0271	1,803	NA	
3	M146-M145	0,1782	HS	FS/UR 0,0953	0,810	NA	
4	M154-M153	0,1708	HS	HS/FS 0,3354	1,059	NA	
5	M158-M157	-0,1145	UR**	UR/FS 0,001	0,007	NA	
6	M175-M173	0,1919	HS	FS/UR 0,0865	1,129	NA	
6	M175-M174	0,4652	FS*	FS/UR 0,0221	4,675	0,229	
6	M174-M173	0,3711	FS	FS/UR 0,0865	0,606	NA	
7	M181-M180	0,9900	FS***	FS/UR 0,0000	2006,495	1,000	FS
8	M183-M182	0,2097	UR	UR/FS 0,0038	0,009	NA	
9	M185-M184	-0,2578	UR**	UR/FS 0,0023	0,024	NA	
10	M246-M245	-0,1349	UR*	UR/FS 0,0366	0,166	NA	
11	M307-M306	-0,0637	UR	UR/FS 0,0188	0,178	NA	
12	M310-M309	-0,1459	UR**	UR/FS 0,0053	0,029	NA	
13	M315-M313	0,2702	UR*	UR/FS 0,0274	0,212	NA	
13	M314-M313	0,1802	HS	FS/UR 0,0875	0,821	NA	
13	M315-M314	0,0077	UR*	UR/FS 0,0282	0,042	NA	
14	M320-M319	0,9900	FS***	FS/UR 0,0000	2542,181	1,000	FS
14	M321-M319	0,5679	FS**	FS/UR 0,0003	56,435	1,000	FS
14	M321-M320	0,5679	FS**	FS/UR 0,0004	56,435	1,000	FS
15	M323-M322	0,4591	FS**	FS/UR 0,0021	22,032	0,925	FS
16	M325-M324	-0,1299	UR*	UR/FS 0,0216	0,218	NA	
17	M328-M327	0,8311	FS***	FS/UR 0,0002	2686,353	1,000	FS
17	M328-M326	-0,1641	UR*	UR/FS 0,0022	0,058	NA	
17	M327-M326	-0,1641	UR**	UR/FS 0,0003	0,020	NA	
18	M333-M332	-0,0652	UR*	FS/UR 0,0641	0,087	NA	
19	M336-M335	0,4657	HS	HS/FS 0,3022	3,476	NA	
19	M335-M334	0,4868	FS**	FS/UR 0,0061	15,278	1,000	FS
19	M336-M334	0,3971	FS*	FS/UR 0,0316	1,665	NA	
20	M354-M353	0,4126	HS	HS/FS 0,2831	0,700	0,008	
21	M357-M356	0,1101	UR	UR/FS 0,0762	3,134	NA	
22	M361-M360	0,2428	UR	FS/UR 0,0853	0,601	NA	
22	M360-M359	-0,0707	UR	UR/FS 0,0660	0,086	NA	
22	M361-M359	-0,1640	UR**	UR/FS 0,0044	0,043	NA	
23	M364-M363	0,3711	FS	FS/UR 0,0912	1,686	NA	
23	M364-M362	0,3711	FS	FS/UR 0,0886	1,171	NA	
23	M363-M362	0,6514	FS**	FS/UR 0,0021	12,175	1,000	FS
24	M369-M368	0,3711	FS	FS/UR 0,1389	1,122	NA	
24	M369-M367	0,1933	HS**	FS/UR 0,0064	7,904	NA	
24	M368-M367	-0,2578	UR*	UR/FS 0,0636	0,084	NA	
25	M371-M370	-0,0188	UR**	UR/FS 0,0976	0,076	NA	
26	M387-M385	0,4772	FS**	UR/FS 0,0734	7,276	NA	
26	M387-M386	0,3804	FS*	FS/UR 0,0151	2,544	NA	
26	M386-M385	0,1020	UR*	UR/FS 0,0734	0,217	NA	
27	M391-M390	0,5017	FS*	FS/UR 0,0568	6,148	NA	
27	M392-M390	0,4294	FS**	FS/UR 0,0085	6,611	0,541	FS

27	M392-M391	0,0894	UR*	HS/FS 0,296	0,312	NA	
28	M397-M396	0,5350	FS*	FS/UR 0,0438	3,430	0,658	FS
28	M397-M395	0,2040	HS*	HS/FS 0,041	2,408	NA	
28	M396-M395	0,3791	FS**	FS/UR 0,0149	19,526	0,471	FS
29	M404-M403	0,3879	FS*	FS/UR 0,0289	2,051	NA	
30	M413-M412	0,6271	FS*	FS/UR 0,0429	4,864	0,975	FS

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,00009, para HS = 0,0312; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 2686,3533, para HS = 66,9700);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Tabela E4. Pares de ninhegos de colhereiro (*Platalea ajaja*) amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; *Q&Gr*), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (*P*) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de *P* indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em cinco locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	<i>Q&Gr</i>	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE [§]	COLONY [‡]	Relac.
1	T34-T35	-0,1298	UR	UR/FS 0,065	0,297	NA	
2	T36-T37	-0,3618	UR**	UR/FS 0,008	0,078	NA	
3	T59-T60	0,5183	FS	FS/UR 0,098	1,258	0,006	
4	T74-T75	0,1415	FS	FS/UR 0,087	1,237	NA	
5	T80-T81	0,4948	FS	FS/UR 0,064	0,340	NA	
6	T99-T101	0,3610	FS	FS/UR 0,052	0,618	NA	
6	T100-T101	-0,0824	UR**	UR/FS 0,002	0,112	NA	
6	T100-T99	-0,1967	HS	HS/FS 0,067	1,488	0,716	
7	T102-T103	0,6312	FS***	FS/UR 0,000	197,897	1,000	FS
8	T116-T117	0,5461	FS***	FS/UR 0,000	75,603	0,984	FS
9	T133-T134	0,3636	HS**	HS/FS 0,001	2,413	NA	
10	T136-T137	0,2032	HS*	HS/FS 0,023	1,222	NA	
11	T138-T139	0,0962	UR*	UR/FS 0,072	0,838	NA	
12	T148-T149	0,7166	HS***	HS/FS 0,000	2,382	NA	HS
13	T164-T165	0,6502	FS*	FS/UR 0,012	4,567	0,531	FS
14	T166-T167	0,1102	UR*	UR/FS 0,031	0,120	NA	
15	T172-T173	0,2846	FS*	FS/UR 0,011	2,128	NA	
15	T172-T174	-0,0716	UR*	UR/FS 0,009	0,188	NA	
15	T173-T174	0,5453	FS**	FS/UR 0,001	1,256	0,868	FS
16	T176-T177	0,5707	FS	FS/UR 0,072	0,920	0,002	
17	T178-T180	0,3304	HS	HS/FS 0,098	1,363	NA	
17	T178-T179	-0,4949	UR***	UR/FS 0,000	0,027	NA	UR

17	T179-T180	-0,5439	UR***	UR/FS 0,000	0,021	NA	UR
----	-----------	---------	-------	-------------	-------	----	----

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,0017, para HS = 0,0426; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 197,8970, para HS = 24,0108);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Tabela E5. Pares de ninhegos de colhereiro (*Platalea ajaja*) amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; *Q&Gr*), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (*P*) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de *P* indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em cinco locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	<i>Q&Gr</i>	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE [§]	COLONY [‡]	Relac.
1	RS036-RS037	0,4085	FS*	FS/UR 0,0699	2,360	NA	FS
2	RS038-RS039	-0,3787	UR*	UR/FS 0,0261	0,152	NA	
3	RS040-RS041	0,3105	FS**	FS/UR 0,0502	4,003	NA	
3	RS040-RS042	-0,012	UR	FS/UR 0,1012	0,382	NA	
3	RS041-RS042	0,2806	HS*	FS/UR 0,0633	2,222	NA	
4	RS044-RS046	0,2991	FS	FS/UR 0,1033	0,805	NA	
4	RS044-RS045	-0,5077	UR***	UR/FS 0,003	0,036	NA	UR
4	RS045-RS046	-0,0856	HS*	HS/UR 0,0929	3,041	NA	
5	RS048-RS049	0,2354	FS***	FS/UR 0,0579	1,521	NA	
6	RS050-RS052	-0,5369	UR*	UR/FS 0,0029	0,042	NA	
6	RS050-RS051	-0,5844	UR**	UR/FS 0,0103	0,071	NA	
6	RS051-RS052	0,8536	FS**	FS/UR 0,0012	68,300	NA	
7	RS053-RS054	0,6126	FS***	FS/UR 0,0369	3,205	NA	
8	RS060-RS062	0,1053	HS***	FS/UR 0,0139	18,337	NA	
8	RS060-RS061	-0,2368	UR***	FS/UR 0,0395	9,719	NA	
8	RS061-RS062	0,1241	HS***	HS/FS 0,0146	19,047	NA	HS
9	RS065-RS066	-0,005	UR	UR/FS 0,0272	0,151	NA	
10	RS067-RS068	0,5711	FS**	FS/UR 0,0344	5,616	0,874	FS
10	RS067-RS069	0,2300	UR*	UR/FS 0,0577	0,293	NA	
10	RS068-RS069	0,5880	FS**	FS/UR 0,0568	3,234	NA	
11	RS070-RS073	0,1516	UR*	UR/FS 0,0267	0,172	NA	
11	RS070-RS072	-0,2766	UR	UR/FS 0,0445	0,254	NA	
11	RS070-RS071	-0,4226	UR*	UR/FS 0,0036	0,035	NA	
11	RS071-RS072	-0,0758	HS*	HS/UR 0,0504	2,737	NA	
11	RS071-RS073	-0,2308	UR***	UR/FS 0,0042	0,037	NA	UR
11	RS072-RS073	-0,7325	UR***	UR/FS 0,0000	0,002	NA	UR
12	RS074-RS075	0,5822	FS***	HS/UR 0,0374	2,793	0,976	FS

13	RS076-RS077	0,5859	FS***	FS/UR 0,0000	211,314	0.810	FS
14	RS079-RS080	0,7455	FS***	HS/UR 0,0504	56,161	0.030	FS
14	RS079- RS081	-0,4915	UR	HS/UR 0,0810	0,196	NA	
14	RS080-RS081	-0,5027	UR***	UR/FS 0,0004	0,012	NA	UR
15	RS082-RS083	-0,0705	HS*	HS/UR 0,0580	2,671	NA	
16	RS084-RS086	0,0428	UR	UR/FS 0,0500	0,268	NA	
16	RS085-RS086	-0,2963	UR**	UR/FS 0,0000	0,018	NA	
16	RS085-RS084	-0,3191	UR*	UR/FS 0,0008	0,071	NA	
17	RS087-RS090	0,3600	UR*	UR/FS 0,0316	0,231	NA	
17	RS087-RS088	0,3043	HS	FS/UR 0,2688	1,252	NA	
17	RS087-RS089	-0,0102	UR	UR/FS 0,0308	0,235	NA	
17	RS088-RS089	0,0673	UR*	UR/FS 0,0402	0,250	NA	
17	RS088-RS090	-0,0577	UR**	UR/FS 0,0057	0,060	NA	
17	RS089-RS090	0,5257	FS***	FS/UR 0,0176	14,438	0.661	FS
18	RS091-RS092	-0,5046	UR*	UR/FS 0,0033	0,030	NA	
19	RS094-RS095	-0,3547	UR*	UR/FS 0,0110	0,070	NA	
20	RS096-RS097	-0,2255	UR	UR/FS 0,0153	0,105	NA	
21	RS101-RS102	0,5657	FS	FS/UR 0,1091	0,693	NA	
22	RS107-RS108	0,4048	FS	FS/UR 0,0134	1,990	NA	
23	RS109-RS111	-0,0173	HS	HS/FS 0,0264	1,405	NA	
23	RS109-RS110	-0,4152	UR***	UR/FS 0,0006	0,018	NA	UR
23	RS110-RS111	0,6258	FS**	FS/UR 0,0016	114,015	1.000	FS
24	RS112-RS113	-0,02	UR*	UR/FS 0,0096	0,070	NA	
25	RS114-RS115	-0,7176	UR***	UR/FS 0,0000	0,006	NA	UR
26	RS117-RS120	0,3798	FS***	FS/UR 0,0932	1,976	NA	
26	RS117-RS118	0,3548	FS***	FS/UR 0,0911	1,976	NA	
26	RS117-RS119	-0,2287	UR*	UR/FS 0,0128	0,113	NA	
26	RS118-RS120	0,7946	FS***	FS/UR 0,0036	27,251	0.935	FS
26	RS118-RS119	-0,222	UR*	UR/FS 0,0084	0,076	NA	
26	RS119-RS120	-0,0142	UR*	HS/UR 0,1936	3,456	NA	
27	RS121-RS122	0,2030	FS	FS/UR 0,1625	0,933	NA	
28	RS123-RS124	0,1035	FS***	HS/UR 0,2213	1,542	NA	
29	RS125-RS126	-0,3898	HS	HS/FS 0,0524	1,099	NA	
30	RS127-RS128	0,4793	FS*	FS/UR 0,0517	2,138	NA	
31	RS133-RS134	-0,0868	UR*	UR/FS 0,0069	0,065	NA	
32	RS135-RS136	-0,7412	UR**	UR/FS 0,0001	0,0017	NA	
33	RS138-RS140	0,6502	FS***	FS/UR 0,0194	3,084	NA	
33	RS138-RS139	0,0848	UR**	FS/UR 0,1152	1,562	NA	
33	RS139-RS140	0,3949	FS*	FS/UR 0,0916	2,002	NA	
34	RS141-RS142	-0,5598	UR***	UR/FS 0,0000	0,009	NA	UR
35	RS144-RS145	0,4765	FS***	FS/UR 0,0027	34,936	1.000	FS

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,0009, para HS = 0,0356; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 314,2217, para HS = 166,6132);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Tabela E6. Pares de ninhegos de garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*) amostrados dentro de ninhos em colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; $Q&Gr$), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (P) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de P indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em seis locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	$Q&Gr$	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE [§]	COLONY [‡]	Relac.
1	T1 – T2	0,2316	HS	HS/FS 0,0501	1,847	NA	
2	T6 – T7	0,2854	HS	HS/FS 0,0858	1,093	NA	
3	T8 – T9	0,2891	HS	HS/FS 0,0627	1,029	NA	
4	T18 – T19	0,5000	FS	FS/UR 0,0015	26,907		FS
5	T28 – T29	0,5000	FS	FS/UR 0,0120	34,467		FS
6	T44 – T45	0,3056	HS	HS/FS 0,1341	2,909	NA	
7	T48 – T49	0,4202	HS	FS/UR 0,0776	17,257	NA	
8	T50 – T51	0,2801	FS	HS/FS 0,0252	1,564		FS
9	T53 – T54	0,6315	FS	FS/UR 0,0001	14,920		FS
10	T55 – T54	0,1085	HS	HS/FS 0,1508	3,567	NA	
11	T53 – T55	0,0000	UR	UR/FS 0,0008	0,897	NA	
12	T62 – T63	0,5000	FS	FS/UR 0,0968	12,291		FS
13	T72 – T73	0,0000	UR	UR/FS 0,0038	0,001	NA	
14	T76 – T77	0,2378	UR	UR/FS 0,0310	0,002	NA	
15	T78 – T79	0,0000	UR	UR/FS 0,0002	0,104	NA	
16	T85 – T86	0,1615	UR	UR/FS 0,0642	0,234	NA	
17	T87 – T88	0,2516	UR	UR/FS 0,0712	0,542	NA	
18	T93 – T94	0,7295	FS	FS/UR 0,0000	11,209		FS
19	T105 – T106	0,1922	UR	UR/FS 0,0853	0,287	NA	
20	T114 – T115	0,1490	UR	UR/FS 0,0391	0,398	NA	
21	T118 – T119	0,0000	UR	UR/FS 0,0032	0,453	NA	
22	T112 – T123	0,1111	UR	UR/FS 0,0664	0,576	NA	
23	T125 – T126	0,500	FS	FS/UR 0,0377	36,285		FS
24	T128 – T131	0,0477	UR	UR/FS 0,0059	0,192	NA	
25	T129 – T130	0,3219	HS	HS/FS 0,3240	1,287	NA	
26	T140 – T141	0,5611	FS	FS/UR 0,0117	23,784		FS
27	T142 – T143	0,0000	UR	UR/FS 0,0008	0,982	NA	
28	T144 – T145	0,6240	FS	FS/UR 0,0008	26,673		FS
29	T146 – T147	0,6153	FS	FS/UR 0,0039	21,739		FS
30	T162 – T163	0,3378	HS	HS/FS 0,0975	3,187	NA	
31	T168 – T169	0,2179	HS	HS/FS 0,1142	3,019	NA	
32	T168 – T170	0,0838	UR	UR/FS 0,0229	0,748	NA	
33	T169 – T170	0,0000	UR	UR/FS 0,0118	0,728	NA	
34	T182 – T183	0,3486	HS	HS/FS 0,3380	4,274	NA	

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,0016, para HS = 0,0054; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 125,8743, para HS = 109,6389);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Tabela E7. Pares de ninhegos de garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*) amostrados dentro de ninhos na colônia reprodutiva de Barra do Ribeiro (RS), Brasil, analisados para parentesco genético. Para cada par, mostra-se o valor de parentesco genético (índice de Queller e Goodnight, 1989; *Q&Gr*), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-R), o valor de probabilidade (*P*) do teste de hipóteses para se estabelecer a significância dessa categoria (H_P : hipótese putativa; H_A : hipótese alternativa). Um valor pequeno de *P* indica que a H_P está mais de acordo com os dados do que a H_A ; valor do *score* para reconstrução de relacionamentos pelo programa PEDIGREE (Herbinger, 2006) e valor de probabilidade de reconstrução de FS pelo programa COLONY (Jones e Wang, 2009). Todas as estimativas calcularam-se com base nas frequências alélicas observadas em seis locos de microssatélites. NA: Não aplicável.

Ninho	Par	<i>Q&Gr</i>	ML-R	$P(H_P/H_A)$	PEDIGREE [§]	COLONY [‡]	Relac.
1	RS1 – RS2	0,2049	HS	HS/FS 0,0393	1,983	NA	
2	RS3 – RS4	0,3415	HS	HS/FS 0,2839	2,783	NA	
3	RS5 – RS6	0,7895	FS	FS/UR 0,0000	24,902		FS
4	RS7 – RS8	0,5942	FS	FS/UR 0,0082	21,339		FS
5	RS9 – RS10	0,3656	HS	HS/FS 0,2352	1,849	NA	
6	RS9 – RS11	0,3658	HS	HS/FS 0,3101	1,627	NA	
7	RS10 – RS11	0,500	FS	FS/HS 0,0343	22,998		FS
8	RS12 – RS13	0,1122	UR	UR/FS 0,0646	0,029	NA	
9	RS12 – RS14	0,5475	FS	FS/UR 0,0003	24,837		FS
10	RS13 – RS14	0,1593	UR	UR/FS 0,0612	0,121	NA	
11	RS15 – RS16	0,6007	FS	FS/UR 0,0083	28,874		FS
12	RS17 – RS18	0,6501	FS	FS/UR 0,0023	27,738		FS
13	RS17 – RS19	0,2526	UR	UR/FS 0,1462	0,782	NA	
14	RS18 – RS19	0,0461	UR	UR/FS 0,0211	0,647	NA	
15	RS20 – RS21	0,5720	FS	FS/UR 0,0100	26,397		FS
16	RS20 – RS22	0,1604	HS	HS/FS 0,0496	2,774	NA	
17	RS21 – RS22	0,7837	FS	FS/UR 0,0049	29,672		FS
18	RS24 – RS25	0,2471	FS	FS/UR 0,0629	26,678		FS
19	RS27 – RS28	0,2611	HS	HS/FS 0,2521	2,283	NA	
20	RS29 – RS30	0,1076	HS	HS/FS 0,0241	1,637	NA	
21	RS29 – RS31	0,2934	HS	HS/FS 0,4789	2,472	NA	
22	RS30 – RS31	0,4208	FS	FS/UR 0,0278	28,293		FS
23	RS32 – RS33	0,3500	HS	HS/FS 0,1949	3,572	NA	
24	RS32 – RS34	0,7567	FS	FS/HS 0,0285	31,472		FS
25	RS33 – RS34	0,1479	UR	UR/FS 0,0878	0,367	NA	
26	RS36 – RS37	0,3903	FS	FS/UR 0,0822	26,478		FS
27	RS36 – RS38	0,5000	FS	FS/UR 0,0841	32,890		FS
28	RS37 – RS38	0,7832	FS	FS/UR 0,0007	22,789		FS
29	RS39 – RS40	0,2882	UR	UR/FS 0,1143	0,678	NA	
30	RS39 – RS41	0,1337	UR	UR/FS 0,0245	0,781	NA	
31	RS40 – RS41	0,0500	UR	UR/FS 0,1425	0,671	NA	
32	RS42 – RS43	0,1846	HS	HS/FS 0,1263	1,462	NA	
33	RS44 – RS45	0,0677	UR	UR/FS 0,0043	0,187	NA	
34	RS46 – RS47	0,2691	HS	HS/FS 0,0680	2,416	NA	
35	RS48 – RS49	0,5275	FS	FS/UR 0,0072	12,716		FS

§ Os valores do programa PEDIGREE correspondem a FS ou HS, dependendo do par analisado (valor mínimo, amostras provavelmente não-relacionadas: para FS, = 0,0006, para HS = 0,0073; valor máximo, amostras provavelmente relacionadas: para FS = 245,8563, para HS = 76,9837);

‡ Somente os valores de probabilidade para pares de FS reconstruídos com sucesso estão disponíveis no programa COLONY.

Anexos

SISTEMAS DE ACASALAMENTO E BIOLOGIA REPRODUTIVA EM AVES AQUÁTICAS NEOTROPICAIS

Carolina Isabel Miño¹ & Sílvia Nassif Del Lama^{1*}

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, KM 235, SP – 310, Monjolinho, São Carlos, SP. CEP: 13565-905; Brasil; Telefone: + 55 16 3351 8391; Fax: +55 16 3351 8377.

*E-mail: dsdl@power.ufscar.br

RESUMO

Uma revisão sobre sistemas de acasalamento e aspectos gerais da biologia reprodutiva em aves aquáticas neotropicais foi desenvolvida para avaliar o conjunto de publicações na literatura e nortear estudos futuros nesse grupo. Foram analisados 34 artigos científicos, classificados em dois temas principais: “sistemas de acasalamento” (10) e “biologia reprodutiva” (24). Sistemas de acasalamento foram estudados em nove espécies de aves neotropicais, pertencentes a quatro famílias: Anatidae, Diomedidae, Sulidae e Threskiornithidae. Em 56% das espécies foram reportadas cópulas e/ou fertilização extra-par, em 22% monogamia, em 11% bigamia e em 11% parasitismo de ninho. Dados gerais de biologia reprodutiva foram levantados em 30 espécies neotropicais, sendo 20 de aves marinhas e 10 de aves lacustres. Os três enfoques mais comuns encontrados nesses estudos foram cronologia reprodutiva (73% das espécies), tamanho das ninhadas em número de ovos (80%) e sucesso reprodutivo avaliado pelo número de ovos eclodidos (73%). Apenas uma espécie da família Sulidae (*Sula leucogaster*) e uma da Threskiornithidae (*Eudocimus ruber*) foram estudadas sob os dois enfoques. Uma análise conjunta dos dados levantados revelou que as aves marinhas e os Ciconiiformes têm sido extensivamente estudados quanto às características reprodutivas gerais, porém seus sistemas de acasalamento não foram ainda bem investigados.

Palavras-chave: Acasalamento, aves aquáticas, comportamento reprodutivo, neotropical.

ABSTRACT

MATING SYSTEMS AND REPRODUCTIVE BIOLOGY OF NEOTROPICAL WATERBIRDS.

The present paper reviews the published information on the mating systems and reproductive biology of Neotropical waterbirds. Thirty-four scientific articles were included, which were divided into two main themes: “mating systems” (10 articles) and “reproductive biology” (24 articles). Extra-pair copulation and/or fertilization were reported to occur in 60% of the Neotropical species investigated, while monogamy was reported in 22%, bigamy in 11% and nest parasitism in 11%. General aspects of reproductive biology of 30 species were more extensively reviewed, of which 20 were seabirds and 10 were lacustrine species. Aspects most frequently described were reproductive chronology (73% of species), clutch size (80%) and reproductive success defined by the number of hatched eggs (73%). Only one species in Sulidae (*Sula leucogaster*) and one in Threskiornithidae (*Eudocimus ruber*) were studied for both, mating system and reproduction. A global analysis of the available data revealed that seabirds and Ciconiiformes birds were most intensively studied in terms of reproductive biology, while their mating systems remain largely uninvestigated.

Keywords: Breeding, mating system, neotropical, waterbirds.

RESUMEN

SISTEMAS DE APAREAMIENTO Y BIOLOGIA REPRODUCTIVA EN AVES ACUÁTICAS NEOTROPICALES.

Se realizó una revisión bibliográfica sobre sistemas de apareamiento y biología reproductiva de aves acuáticas neotropicales para recopilar información sobre la literatura actualizada y para direccionar futuros estudios en este grupo. Treinta y cuatro artículos científicos fueron analizados y clasificados de acuerdo con sus temas principales: “sistemas de apareamiento” (10) y “biología reproductiva” (24). En 60% de las publicaciones sobre especies neotropicales, fueron registrados eventos de cópula extra-par y/o de

fertilización extra-pareja; en 22% fue observada monogamia; en 11% bigamia y en 11% parasitismo de nido. Características generales de la reproducción fueron descritas para 30 especies, siendo 20 aves marinas y 10 especies lacustres. Las características más comúnmente descritas en las especies analizadas fueron: cronología reproductiva (73%), tamaño de la nidada (80%) y éxito reproductivo de los pichones definido por el porcentaje de huevos que eclosionaron (73%). Solamente una especie de la familia Sulidae (*Sula leucogaster*) y una de la familia Threskiornithidae (*Eudocimus ruber*), fueron estudiados en ambos aspectos (sistema de apareamiento y biología). Un análisis global de los datos reveló que diversos aspectos de la biología reproductiva han sido intensivamente estudiados en las aves marinas y los Ciconiformes, mientras que sus sistemas de apareamiento no fueron aún bien estudiados.

Palabras clave: aves acuáticas, neotropical, reproducción, sistema de apareamiento.

INTRODUÇÃO

A região biogeográfica neotropical inclui os países da América do Sul, as ilhas do Caribe e suas vizinhanças (Wetlands International 2006). Essa região possui mais de 3.800 espécies de aves (Stotz *et al.* 1996, Collar *et al.* 1997), o que representa aproximadamente um terço de todas as espécies de aves do mundo (Orme *et al.* 2005). Sete dos países mais ricos em diversidade de aves, incluindo o Brasil, estão localizados nesta região (Mittermeier *et al.* 1999). A avifauna neotropical encontra-se ameaçada por processos provocados principalmente pela ocupação humana. Esses distúrbios têm aumentado rapidamente nas regiões neotropicais e, para a avifauna brasileira, Marini & Garcia (2005) ressaltam que a degradação do habitat e a caça para o comércio ilegal são as principais ameaças.

Segundo IUCN (2008), o total de espécies de aves ameaçadas no mundo é de 1.222, sendo que 22,4% dessas pertencem às ordens de aves aquáticas: Anseriformes (43 espécies), Charadriiformes (76), Ciconiiformes (31), Pelecaniformes (25), Podicipediformes (8), Procellariiformes (78) e Spheniciformes (13). No Brasil, o IBAMA (2003) classificou 160 espécies de aves como ameaçadas e 12% desse total pertence ao grupo das aves aquáticas. Um exemplo de ave aquática neotropical ameaçada de extinção é o albatroz *Phoebastria irrorata*, que se reproduz no complexo de Galápagos (Birdlife International 2008).

O termo “aves aquáticas” (*waterbirds*) refere-se às espécies que dependem dos habitats aquáticos para forrageamento, reprodução ou moradia. Neste trabalho foi adotada a classificação da Wetlands International (2006) que considera aves aquáticas algumas espécies pertencentes às famílias Ardeidae, Anhimidae,

Anatidae, Anhingidae, Aramidae, Balaenicipitidae, Burhinidae, Charadriidae, Ciconiidae, Dromadidae, Gaviidae, Glareolidae, Gruidae, Erypygidae, Ibidorynchidae, Jacanidae, Haematopodidae, Heliornithidae, Laridae, Pedionomidae, Pelecanidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Podicipedidae, Rallidae, Recurvirostridae, Rostratulidae, Rynchopidae, Scopidae, Scolopacidae, Sternidae, Threskiornithidae e Thinocoridae.

Grande proporção das populações de aves aquáticas ocorre nos países neotropicais (Frederick *et al.* 1997). Segundo o censo neotropical de aves aquáticas, o Brasil possui 14% do total das espécies desse grupo (López-Lanús & Blanco 2005). Aves aquáticas são consideradas boas bioindicadoras no monitoramento das áreas alagáveis nas quais habitam porque suas atividades reprodutivas estão estreitamente relacionadas às flutuações hidrológicas desses ambientes (Kushlan 1993, Figueira *et al.* 2006). Conhecer aspectos da biologia básica dessas espécies, como o seu comportamento reprodutivo, é chave na definição das prioridades para a conservação das mesmas (Quader 2005). Um aspecto importante da biologia reprodutiva das aves refere-se à identificação dos seus sistemas de acasalamento. Quatro tipos principais de sistemas foram propostos, conforme o número de fêmeas ou machos por unidade reprodutiva (Emlen & Oring 1977, Shuster & Wade 2003): a monogamia, com uma fêmea e um macho por unidade reprodutiva, a poligamia, incluindo mais de uma fêmea (poliginia e poliginandria) ou mais de um macho (poliandria e poliginandria) e o sistema promíscuo, no qual não se estabelece uma união estável entre os membros dos dois sexos.

A visão dominante no campo do comportamento reprodutivo em aves durante várias décadas considerava a maioria das espécies socialmente monogâmica, com um macho e uma fêmea associando-se

para reprodução e criação dos filhotes (Lack 1968). Esse conceito mudou radicalmente com a utilização de ferramentas da genética molecular, quando foram detectados índices de fertilização extra-par (FEP) em quase 80% das espécies estudadas (Griffith *et al.* 2002). A grande maioria dos estudos sobre sistemas de acasalamento em aves foi realizada nas espécies de regiões temperadas e com Passeriformes. Informações sobre espécies de aves neotropicais são escassas. Um maior investimento no estudo desse grupo tem sido recomendado (Macedo 2008, Macedo *et al.* 2008).

As aves aquáticas neotropicais têm sido estudadas quanto a outros aspectos gerais da sua biologia reprodutiva como a duração e cronologia dos ciclos reprodutivos, estratégia de escolha dos substratos para a construção de ninhos, censos das colônias reprodutivas, sucesso reprodutivo e causas de mortalidade de ovos e filhotes, entre outros. O acesso a esse tipo de informação pode embasar estudos posteriores sobre os sistemas de acasalamento nessas espécies. Com esses parâmetros, fica mais fácil a definição da logística para obtenção de amostras para as análises genéticas e o planejamento das observações comportamentais.

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetiva apresentar uma revisão dos estudos sobre sistemas de acasalamento e aspectos gerais da biologia reprodutiva em aves aquáticas neotropicais. A análise dos dados poderá nortear estudos futuros nas espécies desta região, provendo informações que contribuirão para a conservação dessa avifauna.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho de revisão baseou-se na literatura sobre a biologia reprodutiva de espécies neotropicais, publicada até setembro de 2008, em 36 jornais e periódicos, nas áreas de biologia geral, ornitologia e ecologia comportamental, muitos deles específicos dessa região biogeográfica. As seguintes fontes bibliográficas foram consultadas: *Animal Behaviour*, *Behavioral Ecology*, *Biological Journal of the Linnean Society*, *Biotropica*, *Biota Neotropica*, *BMC Evolutionary Biology*, *Cotinga*, *Ecology*, *Ecotropica*, *El Hornero*, *Emu*, *Evolutionary Ecology*, *Ibis*, *International Waders Studies*, *Journal of Avian Biology*, *Journal of Field Ornithology*, *Journal of Ornithology*, *Journal of Zoology*, *Nature*, *Oecologia*,

Oecologia Brasiliensis, *Ornithological Monographs*, *Ornitologia Neotropical*, *Pacific Costa Avifauna*, *Revista de Biologia Tropical*, *Revista Brasileira de Ornitologia (Ararajuba)*, *Revista Huitzal*, *Revista Ornitologia Colombiana*, *Science*, *Studies in Avian Biology*, *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, *The Auk*, *The Condor*, *Trends in Ecology and Evolution*, *Waterbirds* e *Wilson Bulletin*. Algumas destas revistas foram pesquisadas pelo *Searchable Ornithological Research Archive* (SORA). Os arquivos internos de cada revista foram investigados utilizando como critério de busca o uso das palavras-chave ou expressões: “sistema de acasalamento”, “biologia reprodutiva”, “paternidade”, “parentesco” e “comportamento reprodutivo”. A busca foi realizada usando as palavras nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, optando-se pela busca selecionada por “qualquer uma das palavras” e restringindo depois os resultados, conforme o objetivo. Nos casos em que a revista não possuía ferramenta de busca interna revisaram-se um a um, todos os volumes publicados. Além da busca específica por revistas, realizou-se uma busca através da ferramenta virtual “Google Acadêmico” (<http://scholar.google.com>), utilizando-se o mesmo conjunto de palavras-chave e expressões. Um único livro publicado no Brasil foi incluído na análise (Olmos & Silva e Silva 2003), considerando a importância de suas informações para o estudo dos sistemas de acasalamento de aves aquáticas neotropicais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa nos jornais e periódicos considerados fontes importantes de informação sobre biologia de aves resultou em 34 registros científicos específicos sobre sistemas de acasalamento (10) (Tabela I) e biologia reprodutiva (24) (Tabelas II e III) das aves aquáticas neotropicais. Na Tabela I foram acrescentadas dez publicações sobre sistemas de acasalamento em populações de aves aquáticas não neotropicais, relativas a espécies pertencentes às mesmas famílias estudadas na região neotropical. Os 24 artigos foram classificados em dois subgrupos: 13 estudos nas espécies de aves marinhas (Tabela II) e 12 estudos em Ciconiiformes (Tabela II). Três artigos sobre censos em áreas reprodutivas foram incluídos na discussão.

Tabela I. Sistemas de acasalamento em espécies de aves aquáticas neotropicais (*) e não neotropicais (**). FEP: Fertilização extra-par; CEP: Cópula extra-par; NN: Número de ninhos analisados; NI: Número de indivíduos analisados; Mol: evidência molecular; Ecol: evidência ecológica.

Table I. Mating systems in Neotropical (*) and non-Neotropical (**) waterbird populations. FEP: Extra-pair fertilization; CEP: Extra-pair copulation; NN: Number of nests analyzed; NI: Number of individuals analyzed; Mol: Molecular evidence; Ecol: Ecological (behavioral) evidence.

Família e espécie	Tipo de evidência	Fenômeno observado e prevalência	Região	N amostral		Referência
				NN	NI	
Família Sulidae						
<i>Sula neuboxii</i>	Ecol.	CEP 13,3% fêmeas CEP 4,0% machos	*	-	26	Osório-Beristain & Drummond 1998
<i>Sula dactylatra</i>	Mol. (DNA)	monogamia 100%	*	13	-	Baumgartem <i>et al.</i> 2001
<i>Sula granti</i>	Mol. (DNA)	monogamia 100%	*	23	-	Anderson & Borg 2006
<i>Sula leucogaster</i>	Ecol.	bigamia 100%	*	2	-	Castillo-Guerrero <i>et al.</i> 2005
<i>Sula neuboxii</i>				2	-	
Família Anatidae						
<i>Anas strepera</i>	Mol. (DNA)	FEP 27,6% filhotes	**	29	261	Peters <i>et al.</i> 2003
<i>Anas bahamensis</i>	Ecol.	CEP 23,0% cópulas	*	-	156	Sorenson 1992
<i>Anas platyrhynchos</i>	Mol.(Alozimas)	FEP 3,0% filhotes	**	46	298	Evarts & Williams 1987
<i>Anas bahamensis</i>	Ecol.	CEP 100,0%	*	3	6	McKinney <i>et al.</i> 1985
<i>Anas flavirostris</i>		CEP 100,0%	*	2	5	
<i>Chen rossi</i>	Mol. (DNA)	CEP 38,0% cópulas	**	27	-	Dunn <i>et al.</i> 1999
<i>Chen. caerulescens</i>	e Ecol.	FEP 2,4% filhotes CEP 33,0% cópulas FEP 5,0% filhotes		23	-	
<i>Cygnus attratus</i>	Mol. (DNA)	FEP 15,1% filhotes	**	85	320	Kraaijeveld <i>et al.</i> 2004
Família Threskiornithidae						
<i>Eudocimus albus</i>	Ecol.	Parasitismo de ninho 4,42%	**	113	-	Frederick & Shields 1986
<i>Eudocimus albus</i>	Ecol.	CEP 6,1%	**	83	166	Frederick 1987
<i>Eudocimus ruber</i>	Ecol.	Baixo parasitismo de ninho	*	215	-	Olmos & Silva e Silva 2003
<i>Platalea leucorodia</i>	Ecol.	CEP 60,0% machos CEP 75,0% fêmeas	**	-	50	Aguilera & Álvarez 1989
<i>Platalea ajaja</i>	Mol. (DNA)	FEP 50,0% filhotes	*	28	62	Miño <i>et al.</i> (submetido)
Família Diomedaeidae						
<i>Thalassarche melanophris</i>	Mol. (DNA)	FEP 0,0-9,0% filhotes	**	90	256	Burg & Croxall 2006
<i>Thalassarche chrysoloma</i>		FEP 3,0-10,0% filhotes		90	263	
<i>Diomedea exulans</i>		FEP 6,0-21,0% filhotes		147	419	
<i>Diomedea exulans</i>	Mol. (DNA)	FEP 10,7% filhotes	**	75	226	Jouventin <i>et al.</i> 2007
<i>Thalassarche cauta</i>	Mol. (DNA) e Ecol.	FEP 7,0-10,0% filhotes	**	46	29	Abbott <i>et al.</i> 2006
<i>Phoebastria irrorata</i>	Mol. (DNA)	FEP 25,0% famílias	*	17	51	Huyvaert <i>et al.</i> 2000
<i>Phoebastria irrorata</i>	Mol. (DNA) e Ecol.	CEP 63,6% fêmeas CEP 71,7% machos FEP 16,9% filhotes	*	-	154	Huyvaert <i>et al.</i> 2006

SISTEMAS DE ACASALAMENTO

Apesar do crescimento da Ornitologia Neotropical nas últimas duas décadas (Vuilleumier 2003, García-Moreno *et al.* 2007), o número de artigos encontrados (10) versando sobre sistemas de acasalamento, cópulas extra-par (CEP) e FEP nas aves aquáticas neotropicais foi considerado baixo. Resultado

semelhante foi reportado por Stutchbury & Morton (2008) para espécies neotropicais de Passeriformes.

Dos 10 artigos encontrados, cinco basearam-se em evidências exclusivamente ecológicas, quatro utilizaram ferramentas da genética molecular e em um deles foram empregadas ambas as abordagens. Os trabalhos exclusivamente ecológicos foram realizados no período entre 1985 e 2006, enquanto que,

Tabela II. Aspectos gerais de biologia reprodutiva em populações neotrópicas de aves marinhas. Nº CR: Número de ciclos reprodutivos estudados; NC: Número de colônias; NN: Número de ninhos; CN: Construção do ninho; CR: Cronologia reprodutiva; T e P: Tamanho e peso dos ovos; Nº: Número de ovos por ninhada; CC: Curva de crescimento dos filhotes; SR: Sucesso reprodutivo medido pela (a) proporção de ovos eclodidos e (b) proporção de filhotes que revoaram; M: Causas de mortalidade da prole; *: trabalho de revisão envolvendo dados de várias fontes; + dados coletados; - dados não coletados.

Table II. General aspects of the reproductive biology of Neotropical populations of seabirds.. NºCR: Number of reproductive cycles analyzed; NC: Number of colonies analyzed; NN: Number of nests analyzed; CN: Nest construction; CR: Reproductive chronology; T e P: Size and weight of eggs; Nº: Clutch size; CC: Nestling growth curve; SR: Reproductive success measured by; (a) relative proportion of eclosed eggs; (b) relative proportion of flying nestlings; M: Causes of nestling mortality; * Review paper; + collected data; - non collected data.

Espécies	Nº CR		NC	NN	CN	CR	Ovos		SR		M	Local do estudo e referência
	1	2					T e P	Nº	a	b		
<i>Phalacrocorax albiventer</i>	2	1	1	458	-	+	+	+	+	-	Baixas temperaturas, chuvas, agressão intraespecífica, parasitas.	Punta León, Argentina Malacalza & Navas 1996
<i>Phalacrocorax atriceps</i>	1 e 2	2	2	1.250	-	+	+	+	+	+	-	Chubut, Argentina Punta et al. 2003
<i>Phalacrocorax magellanicus</i>	9	57	57	~150	-	+	+	+	+	+	-	Litoral patagônico, Argentina Frere et al. 2005*
<i>Phalacrocorax atriceps</i>	145	11	11	-	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Phalacrocorax magellanicus</i>	2	13	13	3-600	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Phalacrocorax gaimardi</i>	7	13	13	-	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Phalacrocorax olivaceus</i>	3 e 6	6	6	~1.230	-	+	+	+	+	+	-	
<i>Sterna hirundinacea</i>				~185	-	+	+	+	+	+	-	Ilhas de Santa Catarina, Brasil Olinto Branco 2003a
<i>Sterna eurygnatha</i>				855	-	+	+	+	+	+	-	
<i>Larus dominicanus</i>				165	-	+	+	+	+	+	-	
<i>Sula leucogaster</i>				~550	-	+	+	+	+	+	-	
<i>Fregata magnificens</i>	4 e 5	5	5	1.124	-	+	+	+	+	+	-	Ilhas de Santa Catarina, Brasil Olinto Branco 2003b
<i>Sterna hirundinacea</i>				~170	-	+	+	+	+	+	-	
<i>Sterna eurygnatha</i>	1	1	1	-	+	+	+	+	+	+	-	Laguna Santo Domingo, Chile Guicking et al. 2001
<i>Larus maculipennis</i>				-	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Sterna trudeaui</i>				-	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Larus dominicanus</i>	11	115	115	-	+	+	+	+	+	+	-	Litoral patagônico, Argentina Yorio et al. 2005*
<i>Larus atlanticus</i>	12	18	18	15-800	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Larus scoresbii</i>	15	31	31	~200	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Sterna hirundinacea</i>	15	40	40	~200	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Thalasseus sandvicensis eurygnatha</i>	13	18	18	-	+	+	+	+	+	+	-	Litoral marítimo, Argentina Yorio 2005
<i>Thalasseus maximus</i>	11	12	12	7->1.000	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Catharacta antarctica</i>	8	31	31	-	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Catharacta chilensis</i>	3	15	15	-	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Fregata magnificens</i>	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	Man-o-War, Belice Trivelpiece & Ferraris 1987
<i>Spheniscus magellanicus</i>	12	63	63	-	+	+	+	+	+	+	-	Litoral marítimo, Argentina Schiavini et al. 2005
<i>Macronectes giganteus</i>	4	4	4	-	+	+	+	+	+	+	-	Ilhas patagônicas, Argentina Quintana et al. 2005*
<i>Macronectes giganteus</i>	14-17	2	2	~1.000	-	+	+	+	+	+	-	Ilha Arce e Gran Robredo, Argentina Quintana et al. 2006

Table III. Aspectos gerais de biologia reprodutiva em populações neotropicais de Ciconiiformes. N° CR: Número de ciclos reprodutivos estudados; NC: Número de colônias; NN: Número de ninhos; CN: Construção do ninho; CR: Cronologia reprodutiva; T e P: Tamanho e peso dos ovos; N°: Número de ovos por postura; CC: Curva de crescimento dos filhotes; SR: Sucesso reprodutivo medido pela (a) proporção de ovos eclodidos e (b) proporção de filhotes que revoaram; M: Causas de mortalidade da prole; *: trabalho de revisão envolvendo dados de várias fontes; + **dados coletados**; - **dados não coletados**.

Table III. General aspects of the reproductive biology of Neotropical populations of Ciconiiform birds. N°CR: Number of reproductive cycles analyzed; NC: Number of colonies analyzed; NN: Number of nests analyzed; CN: Nest construction; CR: Reproductive chronology; T e P: Size and weight of eggs; N°: Clutch size; CC: : Nestling growth curve; SR: Reproductive success measured by; (a) relative proportion of eclosed eggs; (b) relative proportion of flying nestlings; M: Causes of nestling mortality; * Review paper; + **collected data**; - **non collected data**.

Espécies	N° CR	NC	NN	CN	CR	Ovos	CC	SR	M	Local do estudo e referência
<i>Cochlearius cochlearius</i>	2	1	30	-	+	-	-	+	Más condições climáticas, distúrbios antrópicos.	Santa Clara de San Carlos, Alajuela, Costa Rica Gómez <i>et al.</i> 2006
<i>Eudocimus ruber</i>	1	1	199	-	+	-	-	+	Predação, más condições climáticas, abandono do ninho, queda dos ovos.	Santos-Cubatão, SP, Brasil Olmos & Silva e Silva 2001
<i>Eudocimus ruber</i>	6	1	~1.000	-	+	-	-	+	Abandono do ninho, predação, más condições climáticas e outras.	Ilha Cajual, MA, Brasil Hass <i>et al.</i> 1999
<i>Eudocimus ruber</i>	2	1	305	-	+	-	-	+	Predação, queda e abandono do ninho.	Santos-Cubatão, SP, Brasil Olmos & Silva e Silva 2003
<i>Eudocimus ruber</i>	5	1	6.000	-	+	-	-	+	Más condições climáticas, desertão, distúrbios antrópicos (coleta de ovos).	Ilha Cajual, MA, Brasil Martínez & Rodrigues 1999
<i>Jabiru mycteria</i>	2	-	44	+	+	-	-	+	-	Llanos - sul, Venezuela González 1996
<i>Jabiru mycteria</i>	18	-	144	+	+	-	-	+	-	Belize norte e centro Barnhill <i>et al.</i> 2005*
<i>Mycteria americana</i>	3	2	840	+	+	+	-	+	Queda dos ovos, Predação, distúrbios antrópicos.	Hato El Fio, Venezuela González 1999
<i>Ciconia maguari</i>	1	1	113	-	+	-	-	+	Desaparecimento e queda dos ovos, predação.	Llanos -sul, Venezuela González 1998
<i>Egretta caerulea</i>	1-2	3	75, 65, 58	+	+	+	+	+	Predação, abandono e queda do ninho, brigas e patógenos.	Cubatão, SP, Brasil Olmos & Silva e Silva 2002
<i>Egretta thula</i>	2	-	120	-	+	-	-	+	-	Lindolfo Collor, RS, Brasil
<i>Nycticorax nycticorax</i>			137	-	+	-	-	+	-	Petry & Da Silva Fonseca 2005
<i>Phimosus infuscatus</i>			31	-	+	-	-	+	-	
<i>Plegadis chihui</i>			191	-	+	-	-	+	-	
<i>Plegadis chihui</i>	1	1	-	+	+	-	-	-	Não fertilização, embrião morto, predação, dano e/ou queda do ninho.	Laguna Santo Domingo, Chile Guicking <i>et al.</i> 2001

os baseados na abordagem molecular foram desenvolvidos entre 2000 e 2008. A expansão do uso dos marcadores moleculares pelos pesquisadores na área de genética molecular ocorreu durante a década de 90 (Schlotterer 2004), período esse que coincide com o maior envolvimento dos profissionais dessa área nos estudos comportamentais. Contudo, segundo Huyvaert *et al.* (2006), o uso de marcadores moleculares não substitui a observação comportamental, pois somente o uso concomitante das duas metodologias torna possível a discussão das causas da variação no comportamento monogâmico.

As quatro famílias de aves aquáticas relacionadas na Tabela I pertencem às quatro ordens onde é maior o número de espécies ameaçadas (IUCN 2008). Os níveis de FEP foram muito variáveis entre as espécies neotropicais (0 – 50% dos filhotes) (Tabela I), foi encontrada variação até mesmo entre populações de uma mesma espécie (Huyvaert *et al.* 2006).

A família Sulidae apresentou maior número de espécies neotropicais estudadas quanto ao sistema de acasalamento (4), sendo que, nas demais foram avaliadas apenas duas espécies/famílias. Na família Sulidae, as publicações baseadas em observações ecológicas apontaram para a ocorrência de CEP e bigamia (Osório-Beristain & Drummond 1998, Castillo-Guerrero *et al.* 2005), enquanto que os estudos genéticos evidenciaram monogamia (Baumgarten *et al.* 2001, Anderson & Borg 2006). A ocorrência de monogamia nesta família é interessante, pois espécies dessa família apresentam níveis altos de cuidado parental, tanto na fase de incubação quanto durante o crescimento dos filhotes (Martins & Dias Filho 2003). O cuidado parental é um caráter geralmente presente nas aves monogâmicas, mas não pode ser considerado como explicação universal para a evolução da monogamia porque nem toda espécie monogâmica apresenta cuidado parental (Dunbar 1995).

Na família Anatidae, bigamia e CEP foram detectadas inicialmente em três pares da marrecão (*Anas bahamensis*), com uma abordagem ecológica (McKinney *et al.* 1985). Num estudo posterior, mais abrangente, na mesma espécie, Sorenson (1992) determinou a frequência de CEP em 156 indivíduos. Na marrecão-pardinha (*A. flavirostris*), foi registrada também bigamia, mas numa amostra muito pequena (1 macho e 4 fêmeas) (McKinney *et al.* 1985). Nas outras espécies não neotropicais

pertencentes ao gênero *Anas* (2) e aos gêneros *Chen* (2) e *Cygnus* (1) a FEP ficou evidenciada por marcadores moleculares e dados ecológicos.

Na família Treshkiornitidae, os resultados nas espécies neotropicais *Eudocimus ruber* e *Platalea ajaja* puderam ser comparados com os obtidos nas espécies co-genéricas não neotropicais (*E. albus* e *P. leucorodia*). As abordagens ecológica e genética apontaram semelhanças nos níveis de ocorrência de CEP e FEP nas espécies do gênero *Platalea*. Da mesma forma, evidências de parasitismo de ninho foram detectadas em *E. ruber* e *E. albus* (Tabela I).

Na família Diomedidae, a espécie neotropical *Phoebastria irrorata*, ameaçada de extinção (IUCN 2008), apresentou índices altos de FEP. Num estudo preliminar com 16 famílias completas dessa espécie e utilizando marcadores moleculares, Huyvaert *et al.* (2000) evidenciaram FEP em 25% das famílias. Para investigar melhor a ocorrência desse comportamento, esse estudo foi ampliado incluindo 98 pares de mães-filhos, pais sociais e todos os indivíduos presentes na colônia na mesma estação reprodutiva (Huyvaert *et al.* 2006). Nesse segundo estudo, observações comportamentais detalhadas e dados moleculares demonstraram taxas altas de CEP e FEP. Os machos que chegavam mais cedo à colônia durante a estação reprodutiva tinham maiores oportunidades de CEP e as taxas altas de FEP estavam relacionadas com essa data de chegada e com a defesa de território e guarda da parceira. Esse estudo demonstra a importância da utilização conjunta de abordagens genéticas e ecológicas para esclarecer questões relacionadas ao comportamento reprodutivo das aves aquáticas. Nas outras quatro espécies não-neotropicais da família Diomedidae, foram detectados índices variáveis de FEP (0-21%). Como o comportamento não monogâmico não é comum nos Procellariiformes, esse grupo merece ser mais estudado (Jouventin *et al.* 2007).

Das 20 espécies relacionadas na Tabela I, apenas duas se comportaram como geneticamente monogâmicas e esse parece ser o padrão cada vez mais comum nos estudos em aves: a condição monogâmica como exceção. Cézilly & Danchin (2008) propõem um investimento maior no esclarecimento dos fatores ecológicos e das estratégias dos sexos que levam uma população ou espécie a apresentar padrão monogâmico ao invés de se procurar explicar os

benefícios das estratégias alternativas ou mistas de reprodução (monogamia-FEP).

O Brasil possui 14% do total das aves aquáticas neotropicais e pesquisadores com potencial para expandir os dados em sistemas de acasalamento desse grupo. No entanto, a genética no país, tem sido mais utilizada para resolver questões relacionadas à sistemática e à taxonomia dos grupos das aves do que aos estudos comportamentais (Borges 2008). Um importante avanço na compreensão desses aspectos da ecologia comportamental dependerá de maior cooperação entre ecólogos e geneticistas, interação essa a ser fomentada nos fóruns nacionais de ornitologia, ecologia e genética.

ASPECTOS GERAIS DE BIOLOGIA REPRODUTIVA

Estudos dos sistemas de acasalamentos dependem da localização dos ninhos e colônias, da identificação dos períodos reprodutivos e do levantamento de características reprodutivas para que a coleta dos dados e amostras possa ser programada. Dados gerais de biologia reprodutiva das espécies de aves aquáticas neotropicais foram pesquisados visando facilitar estudos futuros sobre sistemas de acasalamentos nesse grupo. Foram analisadas 24 publicações referentes a 30 espécies, sendo 20 espécies de aves marinhas (Tabela II) e 10 pertencentes à ordem Ciconiiformes (Tabela III). Onze famílias foram estudadas quanto à biologia reprodutiva, enquanto que apenas quatro tiveram seus sistemas de acasalamento estudados. As famílias Sulidae e Threskiornithidae, representadas pelas espécies *Sula leucogaster* e *E. ruber* foram estudadas sob os dois enfoques.

Oito desses 24 trabalhos foram desenvolvidos no Brasil, sendo dois deles em aves marinhas (Tabela II) e seis em Ciconiiformes (Tabela III). As populações estudadas estão localizadas nas regiões costeiras do Maranhão, São Paulo e Santa Catarina, e no interior de Rio Grande do Sul. O maior volume das publicações brasileiras é proveniente das regiões sudeste-sul do Brasil, coincidindo com a maior presença de ornitólogos nessas regiões. O número de teses de mestrado e doutorado em temas ornitológicos, levantados por Borges (2008), na região sudeste (57%) e sul (18%) de um total de 505 teses de 43 instituições de ensino e pesquisa brasileiras confirmam essa

distribuição. Segundo Borges (2008), as pesquisas ornitológicas brasileiras enfocam principalmente os temas das comunidades, do comportamento e da sinecologia; sendo a biologia reprodutiva um dos temas específicos mais comuns (9%).

Três enfoques foram os mais comuns nos estudos de biologia reprodutiva avaliados: a cronologia reprodutiva (73% das espécies), o tamanho das ninhadas em termos de número de ovos (80%) e o sucesso reprodutivo avaliado pelo número de ovos eclodidos (73%). O tópico “cronologia reprodutiva” inclui todas as fases do ciclo reprodutivo e a duração temporal de cada uma delas, desde a formação dos pares, a construção dos ninhos, o período de incubação dos ovos, a eclosão dos ovos até a saída dos filhotes do ninho. O número de ovos por ninhada foi utilizado como base na definição do sucesso reprodutivo das aves, seja em termos de número de ovos eclodidos como em número de filhotes que saíram do ninho. Os dados sobre a construção dos ninhos necessitam de um maior tempo de observação, com a chegada precoce do pesquisador aos locais de nidificação, motivo esse que pode justificar o menor número de registros nesse conjunto (56% das espécies). As avaliações do tamanho e peso dos ovos e curvas de crescimento dos filhotes envolvem a entrada na colônia, o acesso aos ninhos e a manipulação dos ovos e filhotes. Esse maior esforço pode explicar a menor proporção observada de espécies com esse tipo de informação (30% das espécies).

Mais de 80% dos artigos incluíram dados referentes à mais de um ciclo reprodutivo (Tabelas II e III), permitindo avaliações comparativas de sucesso reprodutivo e mortalidade da prole em estações reprodutivas diferentes, assim como suas possíveis causas. A maioria das espécies estudadas se reproduz em colônias e em nove estudos os dados se restringiram a uma única colônia, sendo três em aves marinhas e seis em Ciconiiformes. Os tamanhos das colônias das espécies estudadas são diversos e o número de ninhos observados por colônia variou de 30 na colônia de *Cochlearius cochlearius* (Tabela III) a 458 na colônia de *Phalacrocorax albiventer* (Tabela II).

Fica evidenciada uma falta de sistematização na coleta de dados sobre as causas da mortalidade da prole, seja na fase dos ovos ou dos filhotes, dificultando uma análise comparativa (Tabelas II

e III). Uma padronização na coleta desses dados permitirá a quantificação dos parâmetros associados aos efeitos dos distúrbios antrópicos nas colônias de aves aquáticas acessadas. Essa discussão merece ocupar os fóruns dos ornitólogos neotropicais, pois mesmo os conceitos de distúrbio, tolerância e habituação não estão completamente claros para os investigadores (Nisbet 2000). Avaliações desses fatores serão particularmente importantes no monitoramento de colônias reprodutivas dos Ciconiiformes, onde níveis de predação aérea são influenciados pelos distúrbios antrópicos. Nessas colônias, predadores oportunistas dependem do afastamento dos adultos dos ninhos para acessarem os ninhos e se alimentarem dos ovos e filhotes. No Pantanal brasileiro, Bouton *et al.* (2005) verificaram um aumento na população de predadores aéreos, em especial do urubú-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) e do caracará (*Caracara plancus*), em decorrência da presença de pescadores e bovinos nas regiões próximas às colônias reprodutivas de cabeça-seca (*Mycteria americana*), de colhereiro (*P. ajaja*) e da garça-branca-grande (*Ardea alba*).

Três publicações sobre censos de indivíduos durante a época reprodutiva não foram incluídas nas tabelas e estão citadas a seguir. Ramo & Busto (1988) avaliaram a população das colônias do guará-vermelho (*E. ruber*) nos Llanos venezuelanos, fazendo um censo populacional durante os anos de 1983 e 1984. Os autores encontraram em 1983, 22 colônias com 64.439 pares e, em 1984, sete colônias com 42.236 pares. Comparando os dados obtidos no trabalho com os reportados até aquela data, os autores concluíram que a diminuição na área de nidificação coincidiu com a construção de represas na área, devido ao incremento da atividade pecuária regional. Yamashita & Valle (1990) descreveram as características de 13 colônias reprodutivas de aves aquáticas de Ciconiiformes no Pantanal Matogrossense, acessadas no período de 1979 a 1983. Os autores apresentaram dados sobre censos, composição das colônias mistas, localização e características gerais do substrato vegetal de cada unidade e ressaltaram os efeitos dos ventos fortes e do turismo predatório como os mais danosos para os ovos e filhotes. Hass *et al.* (1999) descreveram a distribuição espacial dos ninhos de uma colônia de 3.500 indivíduos de guará-vermelho (*E. ruber*) na Ilha do Cajual (Mara-

nhão, Brasil). Os autores evidenciaram que a seleção de habitat pelo guará-vermelho parece estar mais associada ao grau de distúrbio antrópico do que às características ambientais. É interessante notar que *E. ruber* apresenta diversas características reprodutivas estudadas, mas seu sistema de acasalamento está por ser esclarecido. Como suas populações têm declinado acentuadamente nos últimos anos na América Central e do Sul (Ramo & Busto 1988, Santos *et al.* 2005) o estudo dessa espécie deveria ser priorizado.

CONCLUSÕES

Os dados levantados no presente trabalho revelaram que 56% das espécies de aves aquáticas neotropicais estudadas apresentam CEP e/ou FEP em graus variáveis, 22% monogamia, 11% bigamia e 11% parasitismo de ninho. Para nortear a escolha das espécies aquáticas neotropicais a serem estudadas futuramente, devem ser priorizadas as espécies cujas colônias reprodutivas ou ninhos já foram localizados, e que possuem maior número de dados relativos aos seus ciclos reprodutivos. Uma intersecção entre os dados das Tabelas I, II e III revelou que as aves marinhas e os Ciconiiformes têm sido extensivamente analisados quanto às características gerais reprodutivas, mas seus sistemas de acasalamento não estão ainda bem investigados.

AGRADECIMENTOS. Agradecemos aos revisores anônimos por suas valiosas contribuições. Agradecemos também o apoio financeiro do CNPq à CIM (processo 140382/2007-0) e à SNDL (processo 308810/2007-4).

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C.L.; DOUBLE, M.C.; GALES, R. & COCKBURN, A. 2006. Copulation behaviour and paternity in shy albatrosses (*Thalassarche cauta*). *Journal of Zoology*, 270: 628–635.
- AGUILERA, E. & ALVAREZ, E. 1989. Copulations and mate guarding of the Spoonbill (*Platalea leucorodia*). *Behaviour*, 110: 1-22.
- ANDERSON, D.J. & BORG, P.T. 2006. No extra-pair fertilization observed in Nazca Booby (*Sula granti*) broods. *The Wilson Journal of Ornithology*, 118: 244–247.
- BARNHILL, R.A.; WEYER, D.; FORD YOUNG W.; SMITH, K.G. & JAMES, D.A. 2005. Breeding biology of Jabirus (*Jabiru mycteria*) in Belize. *The Wilson Bulletin*, 117(2): 142–153.

- BAUMGARTEN, M.M.; BARZOTTI-KOHLRAUSCH, A. & MIYAKI, C.Y. 2001. DNA fingerprinting and parentage in Masked (*Sula dactylatra*) and Brown (*S. leucogaster*) Boobies. *Ornitologia Neotropical*, 12: 319–326.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2008. Species factsheet: *Phoebastria irrorata*: <http://www.birdlife.org> (acesso em 13/10/2008).
- BORGES, S.H. 2008. A importância do ensino de pós-graduação na formação de recursos humanos para o estudo da biodiversidade no Brasil: um estudo de caso na ornitologia. *Biota Neotropica*, 8(1): 21-27.
- BOUTON, S.; FREDERICK, P.C.; ROCHA, C.D.; BARBOSA DOS SANTOS, A.T. & BOUTON, T.C. 2005. Effects of tourist disturbance on Wood Stork nesting success and breeding behavior in the Brazilian Pantanal. *Waterbirds*, 28(4): 487-497.
- BURG, T.M. & CROXALL, J.P. 2006. Extrapair paternities in Black-Browed *Thalassarche melanophris*, Grey-Headed *T. chrysostoma* and Wandering albatrosses *Diomedea exulans* at South Georgia. *Journal of Avian Biology*, 37: 331-338.
- CASTILLO-GUERRERO, J.A.; MELLINK, E. & AGUILAR, A. 2005. Bigamy in the Blue-footed Booby and the Brown Booby? *Waterbirds*, 28(3): 399-401.
- CÉZILLY, F. & DANCHIN, E. 2008. Mating Systems and Parental Care. In: E. Danchin, L-A. Giraldeau & F. Cézilly (eds.). Behavioral Ecology. Oxford University Press, New York. 874p. pp. 429-465.
- COLLAR, J.J.; WEGE, D.C. & LONG, A.J. 1997. Patterns and causes of endangerment in the New World avifauna. *Ornithological Monographs*, 48: 237-260.
- DUNBAR, R.I.M. 1995. The mating system of callitrichid primates: I. Conditions for the coevolution of pair bonding and twinning. *Animal Behavior*, 50: 1057-1070.
- DUNN, P.O.; AFTON, A.D.; GLOUTNEY, M.L. & ALISAUSKAS, R.T. 1999. Forced copulation results in few extrapair fertilizations in Ross's and Lesser Snow Geese. *Animal Behaviour*, 57: 1071-1081.
- EMLEN, S.T. & ORING, L.W. 1977. Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science*, 197: 215-223.
- EVARTS, S. & WILLIAMS, C.J. 1987. Multiple paternity in a wild population of Mallards. *The Auk*, 104: 597-602.
- FIGUEIRA, J.E.C.; CINTRA, R.; VIANA, L.R. & YAMASHITA, C. 2006. Spatial and temporal patterns of bird species diversity in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil: implications for conservation. *Brazilian Journal of Biology*, 66(2A): 393-404.
- FREDERICK, P.C. 1987. Extrapair copulations in the mating system of the White Ibis (*Eudocimus albus*). *Behaviour*, 100: 170-201.
- FREDERICK, P.C. & SHIELDS, M.A. 1986. Suspected intra-specific nest parasitism in white ibis (*Eudocimus albus*). *Wilson Bulletin*, 98: 476-478.
- FREDERICK, P.C.; SANDOVAL, J.C.; LUTHIN, C. & SPALDING, M. 1997. The importance of the Caribbean coastal wetlands of Nicaragua and Honduras to Central American populations of waterbirds and Jabiru Storks (*Jabiru mycteria*). *Journal of Field Ornithology*, 68: 287-295.
- FRERE, E.; GANDINI, P. & BOERSMA, D. 1998. The breeding ecology of Magellanic Penguins at Cabo Virgenes, Argentina: What Factors Determine Reproductive Success? *Colonial Waterbirds*, 21: 205-210.
- FRERE, E.; QUINTANA, F. & GANDINI, P. 2005. Cormoranes de la costa patagónica: estado poblacional, ecología y conservación. *El Hornero*, 20: 35-52.
- GARCÍA-MORENO, J.; CLAY, R.P. & RÍOS-MUÑOZ, C.A. 2007. The importance of birds for conservation in the Neotropical region. *Journal of Ornithology*, 148: S321-S326.
- GÓMEZ, J.; GIL-DELGADO, J.A. & MONRÓS, J.S. 2006. Breeding success of a colony of Boat-billed Herons *Cochlearius cochlearius* (Ciconiiformes: Ardeidae) in pasturelands of Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 54(4): 1131-1134.
- GONZÁLEZ, J.A. 1996. Breeding biology of the Jabiru in the southern llanos of Venezuela. *The Wilson Bulletin*, 108: 524–534.
- GONZÁLEZ, J.A. 1998. Phenology and reproductive success of the Maguari Stork in the southern llanos of Venezuela. *Colonial Waterbirds*, 21: 125-142.
- GONZÁLEZ, J.A. 1999. Nesting success in two Wood Stork colonies in Venezuela. *Journal of Field Ornithology*, 70: 18-27.
- GRIFFITH, S.C.; OWENS, I.P.F. & THUMAN, K.A. 2002. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, 11: 2195-2212.
- GUICKING, D.; MICKSTEIN, S.; BECKER, P.H. & SCHLATTER, R. 2001. Nest site selection by Brown-Hooded Gull (*Larus maculipennis*), Trudeau's Tern (*Sterna trudeaui*) and White-Faced Ibis (*Plegadis chihi*) in a South Chilean tule marsh. *Ornitologia Neotropical*, 12: 285–296.

- HASS, A.; RIBEIRO MATOS, R.H. & MARCONDES-MACHADO, L.O. 1999. Ecologia reprodutiva e distribuição espacial de *Eudocimus ruber* (Ciconiiformes: Threskiornithidae) na Ilha do Cajual, Maranhão. *Ararajuba*, 7: 41-44.
- HUYVAERT, K.P.; ANDERSON, D.J.; JONES, T.C.; DUAN, W. & PARKER, P.G. 2000. Extra-pair paternity in Waved Albatrosses. *Molecular Ecology*, 9: 1415-1419.
- HUYVAERT, K.P.; ANDERSON, D.J.; JONES, T.C. & PARKER, P.G. 2006. Mate opportunity hypothesis and extrapair paternity in Waved Albatrosses (*Phoebastria irrorata*). *The Auk*, 123(2): 524-536.
- IBAMA. (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) 2003. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. MMA, Brasil. <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>. (acesso em 10 novembro 2008).
- IUCN (International Union for the Conservation of Nature). 2008. *IUCN Red List of Threatened Species*: www.iucnredlist.org (acesso em 10/11/2008).
- JOUVENTIN, P.; CHARMANTIER, A.; DUBOIS, M-P.; JARNE, P. & BRIED J. 2007. Extra-pair paternity in the strongly monogamous Wandering Albatross *Diomedea exulans* has no apparent benefits for females. *Ibis*, 149: 67-78.
- KRAAIJEVELD, K.; CAREW, P.J.; BILLING, T.; ADCOCK, G.J. & MULDER, R.A. 2004. Extra-pair paternity does not result in differential sexual selection in the mutually ornamented Black Swan (*Cygnus atratus*). *Molecular Ecology*, 13: 1625-1633.
- KUSHLAN, J.A. 1993. Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colonial Waterbirds*, 16: 223-251.
- LACK, D. 1968. *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. Methuen Ltd, London. 409p.
- LÓPEZ-LANÚS, B. & BLANCO, D.E. 2005. *El Censo Neotropical de Aves Acuáticas 2004*. Global Series N° 17. Wetlands International. Buenos Aires, Argentina. 114p.
- MACEDO, R.H.F. 2008. Neotropical model systems: social and mating behavior of birds. *Ornitologia Neotropical* 19 (Suppl.): 85-93.
- MACEDO, R.H.F.; KARUBIAN, J. & WEBSTER M.S. 2008. Extrapair paternity and sexual selection in socially monogamous birds: are tropical birds different? *The Auk*, 125(4):769-777, 2008
- MALACALZA, V.E. & NAVAS J.R. 1996. Biología y ecología reproductiva de *Phalacrocorax albiventer* (Aves: Phalacrocoracidae) en Punta León, Chubut, Argentina. *Ornitología Neotropical*, 7: 53-61.
- MARINI, M.A. & GARCIA, F.I. 2005. Bird Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, 19(3): 665-671.
- MARTÍNEZ, C. & RODRIGUES, A.A.F. 1999. Breeding biology of the Scarlet Ibis on Cajual Island, Northern Brazil. *Journal of Field Ornithology*, 70: 558-566.
- MARTINS, F.C. & DIAS FILHO, M.M. 2003. Cuidado parental em *Sula leucogaster* [Boddaert] (Aves, Pelecaniformes, Sulidae) nas Ilhas dos Currais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20: 583-598.
- MCKINNEY, F.; DERRICKSON, S.R. & MINEAU, P. 1985. Primary and secondary male reproductive strategies of dabbling ducks. In: P.A. Gowaty & D. W. Mock (eds.). *Avian monogamy. Ornithological Monographs*, 37: 68-82.
- MIÑO, C.I.; SAWYER, G.M.; BENJAMIN, R.C. & DEL LAMA, S.N. 2008. Microsatellite DNA markers applied to the study of parentage and relatedness in the Roseate Spoonbill (Aves: Threskiornithidae). Enviado à publicação. (acompanhar para ver se estará publicado até a publicação deste artigo)
- MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R. & MITTERMEIER, C.G. (eds). 1999. Megadiversity. Earth's biologically wealthiest nations. Conservation International. 501p.
- NISBET, I.C.T. 2000. Disturbance, habituation, and management of waterbird colonies. *Waterbirds*, 23(2): 312-332.
- OLINTO BRANCO, J. 2003a. Reprodução das aves marinhas nas ilhas costeiras de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20: 619-623.
- OLINTO BRANCO, J. 2003b. Reprodução de *Sterna hirundinacea* Lesson e *S. eurynatha* Saunders (Aves:Laridae) no litoral de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20: 655-659.
- OLMOS, F. & SILVA E SILVA, R. 2001. Breeding biology and nest site characteristics of the Scarlet Ibis in Southeastern Brazil. *Waterbirds*, 24: 58-67.
- OLMOS, F. & SILVA E SILVA, R. 2002. Breeding biology of the Little Blue Heron (*Egretta caerulea*) in southeastern Brazil. *Ornitologia Neotropical*, 13: 17-30.
- OLMOS, F. & SILVA E SILVA, R. 2003. *Guará: Ambiente, flora e fauna dos manguezais de Santos-Cubatão*. Brasil. São Paulo. Empresa das Artes. 216p.
- ORME, C.D.L.; DAVIES, R.G.; BURGESS, M.; EIGENBROD, F.; PICKUP, N.; OLSON, V.A.; WEBSTER, A.J.; DING, T-S.; RASMUSSEN, P.C.; RIDGELY, R.S. & STATTFIELD,

- A.J. 2005. Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature*, 436: 1016-1019.
- OSÓRIO-BERISTAIN, M. & DRUMMOND, H. 1998. Non-aggressive mate guarding by the blue-footed booby: a balance of female and male control. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 43: 307-315.
- PETERS, J.L.; BREWER, G.L. & BOWE, L.M. 2003. Extrapair paternity and breeding synchrony in Gadwalls (*Anas strepera*) in North Dakota. *The Auk*, 120: 883-888.
- PETRY, M.V. & DA SILVA FONSECA, V.S. 2005. Breeding success of the colonist species *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) and four native species. *Acta Zoológica (Stockholm)*, 86: 217-221.
- PUNTA, G.; YORIO, P.; HERRERA, G. & SARAVIA, J. 2003. Biología reproductiva de los Cormoranes Imperial (*Phalacrocorax atriceps*) y de Cuello Negro (*P. magellanicus*) en el Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. *El Hornero*, 18: 103-111.
- QUADER, S. 2005. Mate choice and its implications for conservation and management. *Current Science*, 89: 1220-1229.
- QUINTANA, F.; PUNTA, G.; COPELLO, S. & YORIO, P. 2006. Population status and trends of southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) breeding in North Patagonia, Argentina. *Polar Biology*, 30: 53-59.
- QUINTANA, F.; SCHIAVINI, A. & COPELLO, S. 2005. Estado poblacional, ecología y conservación del Petrel Gigante del Sur (*Macronectes giganteus*) en Argentina. *El Hornero*, 20: 25-34.
- RAMO, C. & BUSTO, B. 1988. Status of the Nesting Population of the Scarlet Ibis (*Eudocimus ruber*) in the Venezuelan Llanos. *Colonial Waterbirds*, 11: 311-314.
- SANTOS, M.S.; GONÇALVES, E.C.; BARBOSA, M.S.R.; SILVA, A.; SCHNEIDER M.P.C. 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*-Threskiornithidae -Aves). *Molecular Ecology Notes*, 6: 307-309.
- SCHIAVINI, A.; YORIO, P.; GANDINI, P.; REY, A.R. & BOERSMA, P.D. 2005. Los pinguinos de las costas Argentinas: estado poblacional y conservación. *El Hornero*, 20: 5-23.
- SCHLOTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews in Genetics*, 5: 63-69.
- SHUSTER, S.M. & WADE M.J. 2003. A classification of mating systems. Pp 262-369. In: *Mating Systems and Strategies*. S.M. Shuster & M.J. Wade. Princeton University Press. 520p.
- SORENSEN, L.G. 1992. Variable mating system of a sedentary tropical duck: the White-cheeked Pintail (*Anas bahamensis bahamensis*). *The Auk*, 109: 277-292.
- STOTZ, D.F.; FITZPATRICK, J.W.; PARKER III, T.A. & MOSKOVITS, D.K. 1996. *Neotropical birds: ecology and conservation*. University of Chicago Press, Chicago. 478p.
- STUTCHBURY, B.J.M. & MORTON, E.S. 2008. Recent advances in the behavioral ecology of tropical birds. *The Wilson Journal of Ornithology*, 120: 26-37.
- TRIVELPIECE, W. & FERRARIS, J.D. 1987. Notes on the behavioural ecology of the Magnificent Frigatebird *Fregata magnificens*. *Ibis*, 19: 168-174.
- VUILLEUMIER, F. 2003. Neotropical Ornithology: then and now. *The Auk*, 120: 577-590.
- WETLANDS INTERNATIONAL. 2006. *Waterbird Population Estimates*. 4th ed. Wetlands International. 239p.
- YAMASHITA, C. & VALLE, M.P. 1990. Sobre ninhais de aves do Pantanal do município de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Vida Silvestre Neotropical*, 2: 59-63.
- YORIO, P. 2005. Estado poblacional y de conservación de Gaviotines y Escúas que se reproducen en el litoral marítimo Argentino. *El Hornero*, 20: 75-93.
- YORIO, P.; BERTELLOTTI, M. & BORBOROGLU, P.G. 2005. Estado poblacional y de conservación de Gaviotas que se reproducen en el litoral marítimo Argentino. *El Hornero*, 20: 53-74.

Submetido em 15/10/2008.

Aceito em 24/10/2008.

Parentage and Relatedness in Captive and Natural Populations of the Roseate Spoonbill (Aves: Ciconiiformes) Based on Microsatellite Data

CAROLINA ISABEL MIÑO^{1*}, GREGORY MARTIN SAWYER²,
ROBERT CURLISS BENJAMIN³, AND SILVIA NASSIF DEL LAMA¹

¹*Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brazil*

²*Institute of Molecular BioSciences, Massey University, Palmerston North, New Zealand*

³*Department of Biological Sciences, University of North Texas, Denton, Texas*

ABSTRACT This study constitutes a first approach to evaluate the use of genetic information and relatedness estimators in the investigation of questions related to mating system and parentage in ex situ and in situ populations of the Roseate Spoonbill. We assessed the parentage assignments in 17 supposed families from US captive populations and investigated the genetic relationships among 67 nestlings sampled within 28 nests in Brazilian natural breeding colonies. Estimations of genetic relatedness values, hypothesis testing methods, simulations and maximum likelihood approaches were performed on data from four microsatellite loci. Parentage was confirmed in 61.5% of the registered parent–offspring relationships at zoo parks. Inconsistencies in assignments were investigated and the likely parents were identified for most of the hatchlings. Matings among relatives, not previously noticed based on behavioral observations, were identified by the use of genetic analyses. In natural populations, 33% of the sampled dyads were confidently classified as full-sibs. Above 25% of the analyzed dyads were unrelated, indicating that more than one parent-pair may have been responsible for the progeny. Our results demonstrate that genetic information can augment the precision in parentage assignment in captive Roseate Spoonbill populations, and this approach can contribute to their management and conservation. Results obtained using three different methodologies are concordant and point to the existence of a mating system other than monogamy for this species in the wild. The approaches implemented in this study can be applied to other waterbird species in which capture of adults is difficult. *J. Exp. Zool.* 311A:453–464, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

How to cite this article: Miño CI, Sawyer GM, Benjamin RC, Del Lama SN. 2009. Parentage and relatedness in captive and natural populations of the Roseate Spoonbill (Aves: Ciconiiformes) based on microsatellite data. *J. Exp. Zool.* 311A:453–464.

The assessment of genetic relatedness among individuals is a powerful tool for investigating issues such as mating systems, parental care, dispersal and other biological parameters in natural and captive populations (Frankham et al., 2002; Avise, 2004). Parentage studies using molecular techniques have played a major role in the research on the evolution and behavioral ecology of organisms revealing unsolved aspects of reproductive biology and natural history of species (Avise, 2004). For example, the traditional view of mating systems in birds was revolutionized when modern molecular methods demonstrated that most species were not genetically monogamous (Griffith

et al., 2002). As the vast majority of these investigations have been performed on passerines and temperate species, the need for genetic studies on mating systems among Neotropical and

Grant sponsor: Brazilian Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant numbers: 473760/2004-5 and 140382/2007-0; Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Grant numbers: 2004/15205-8.

*Correspondence to: Carolina Isabel Miño. Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís km 235, 13565-905, São Carlos-SP, Brazil. E-mail: carolinaianido@yahoo.com.ar

Received 21 October 2008; Revised 28 February 2009; Accepted 31 March 2009

Published online 7 May 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jez.543

nonpasserine birds is evident (Stutchbury and Morton, 2008).

The Roseate Spoonbill (*Platalea ajaja*, Linnaeus 1758; Aves: Ciconiiformes) is a widely distributed Neotropical aquatic bird that breeds colonially from the southeastern United States of America (US) to central Argentina (Sick, '97). They are considered monogamous in the wild based on behavioral observations of one pair during one reproductive cycle (Sibley, 2001). Brazilian natural populations were estimated at 2,400 birds (Yamashita and Valle, '90), and they are found in several wetlands at different latitudes, such as along the equatorial line in the state of Amapá, in the center West of the country, in the Pantanal region (Yamashita and Valle, '90) and in the South of the country in the state of Rio Grande do Sul (Encarnaç o and Diniz, '92). Spoonbill populations in the US underwent a profound bottleneck from 1890 to 1920 (Powell and Bjork, '90), and this species is listed as one of special concern by the Florida Fish and Wildlife Conservation Commission (2008). Nowadays, approximately 500 Roseate Spoonbills are maintained in captivity in US zoological parks (Sawyer and Benjamin, 2006). Ecological observations in zoo parks have indicated the occurrence of extra-pair copulations and infant care by individuals other than parents (Sawyer, 2002). Therefore, the actual mating systems of wild and captive Roseate Spoonbills remain undefined, complicating the management of captive populations and the accurate planning of conservation programs.

The management of captive or reintroduced endangered species can make use of marker-based studies related to parentage and kinship that provide conservation-relevant information (Avis, 2004). Molecular markers can help verify breeding records and correct "studbook" errors, determine relatedness among captive individuals and help to avoid loss of diversity and inbreeding (Eding and Meuwissen, 2001; Caballero and Toro, 2002; Russello and Amato, 2004). When the goal is to maximize genetic diversity in captive breeding programs, genetic analyses can identify individuals that may be given priority for breeding. Genetic analyses also help to better understand behavioral aspects of a species when mating cannot be observed directly in nature (Zenuto et al., '99). Molecular marker-based relatedness estimators and proper statistical approaches to analyze them provide tools for inferring relationships among individuals with unknown ancestry, in the absence of pedigree information (Russello and Amato, 2004).

The aim of this study was to use genetic information to verify parentage in ex situ populations of the Roseate Spoonbill by estimating values of genetic relatedness, and by using hypothesis testing methods and maximum likelihood (ML) approaches, based on four microsatellite data. The same methodologies were also applied to estimate values of genetic relatedness between supposed siblings, sampled within nests, in in-situ Brazilian natural breeding colonies. The analyses presented here constitute a first approach to clarify aspects of the genetic mating system in the Roseate Spoonbill, which may improve the management and conservation of this species.

MATERIAL AND METHODS

Sample, DNA extraction and microsatellite genotyping

Blood samples were collected from 51 captive Spoonbills: Fort Worth Zoo ($N = 22$), Dallas Zoo ($N = 20$) and Sedgwick County Zoo ($N = 9$). Families (17) constituted from 35 of these Spoonbills, listed putative parents and offspring, are shown in Table 1.

TABLE 1. Roseate Spoonbill reported families from three zoological parks in the US

Reported mating	Putative parents		Putative offspring
	Sire	Dam	
#1	FW11	FW15	FW10, FW12
#2	FW10	FW12	FW13
#3	FW11	NA	FW16
#4	FW21	FW16	FW17
#5	NA	FW15	FW19
#6	NA	FW19	FW20
#7	NA	FW15	FW21
#8	SCZ44	SCZ43	DZ31
#9	SCZ46	NA	DZ32
#10	SCZ44	NA	DZ33, DZ34
#11	SCZ44	SCZ43	DZ35
#12	DZ32	DZ29	DZ36, DZ37
#13	DZ33	DZ28	DZ38
#14	DZ25	DZ26	DZ39, DZ40, DZ41, DZ42
#15	NA	DZ30	SCZ45
#16	SCZ46	NA	SCZ47, SCZ48, SCZ49
#17	SCZ48	SCZ45	SCZ51
Total	10	10	25

DZ, Dallas Zoo; FW, Fort Worth; SCZ, Sedgwick County Zoo; NA, information not available.

Blood samples of 241 individuals were collected from Brazilian breeding colonies at the Pantanal region (PAN, 16°39'S; 57°10'W; $N = 58$), Rio Grande do Sul (RS, 32°29'S, 52°32'W; $N = 76$) and the Amapá state (AP, 01°09'N, 050°24'W; $N = 107$). From this total, 67 were from nestlings of 2–3 weeks old belonging to 28 nests (PAN = 12 nests, $N = 29$; RS, 1 nest, $N = 2$; AP, 15 nests, $N = 36$). At this age, nestlings present little mobility and remain inside the nest where they were born (Dumas, 2000). DNA was extracted from samples using Proteinase K digestion followed by a modified phenol:chloroform extraction procedure (Sambrook and Russell, 2001).

Species-specific microsatellite loci Aaju1 (F: 5'-GATCACCACCATCTTAAATGATAA-3', R: 5'-CTTCTGTTTGCCTCACATGG-3'), Aaju2 (F: 5'-CTTGATGCAAAGGAAACATCC-3', R: 5'-GAGGTGCTTCCAGTTTCCTG-3'), Aaju3 (F: 5'-CCCATGGCCACATTATAAACTT-3', R: 5'-GCTCTGGAGTAACTTGCTGGA-3') and Aaju5 (F: 5'-GGCTGAACACTGTTGTGCTCT-3', R: 5'-GAACCAAGCCTCCCTGAATA-3') (Sawyer and Benjamin, 2006) were used to genotype each sample. Each set of amplification reactions was prepared including a control blank and using filtered tips in a UV-sterilized cabinet. Reactions were carried out in a GeneAmp 2400[®] Thermal Cycler (PerkinElmer, Foster City, CA) in 25 μ L mixes containing: 20–50 ng of template DNA, 0.4 μ M of each primer, 150 μ M of each dNTP and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fisherbrand, Houston, TX and Fermentas, Fermentas Inc, Glen Burnie, MD) in buffer with 1.5 mM MgCl₂. Basic PCR reactions were as follows: 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 50 sec at 94°C, 50 sec at annealing temperature and 50 sec at 72°C, then finished with 5 min at 72°C. Optimization of PCR conditions involved adjustment of the annealing temperature and/or the MgCl₂ concentration (Sawyer and Benjamin, 2006). The PCR amplification products from US zoo samples were analyzed by 7.5% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis with staining by ethidium bromide (Sawyer and Benjamin, 2006). PCR products from wild samples were sized in a MegaBACE[™] 1000 automatic sequencer using Gen-size ET Rox 550 as internal standard (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Electropherograms were analyzed using MegaBACE Fragment Profiler[™] software (Amersham Biosciences).

Data analyses

Standard population genetic parameters were computed as support for subsequent relatedness

estimations. The genotypes of 51 captive Spoonbills were used to generate the input distribution for calculations relative to the ex situ populations. Additionally, genotypes of 174 unrelated (UR) individuals sampled at different regions were used to estimate population parameters in wild populations. Allelic frequencies, expected heterozygosities (H_e), Hardy–Weinberg equilibrium and exclusionary probability of parentage according to the equation 1a in Jamieson and Taylor ('97) were estimated by GenAlEx6 software (Peakall and Smouse, 2006). The Probability of Identity (Paetkau and Strobeck, '94) was determined for each sample using the software Genecap (Wilberg and Dreher, 2004).

To verify the parentage assignments according to pedigree records and behavioral observations at the zoos we used three different approaches. First, we computed the Queller and Goodnight's ('89) unbiased microsatellite-based relatedness estimator, denoted here as Q&Gr, between the offspring and both putative parents, based on microsatellite data, using Kingroup program (Konovalov et al., 2004). Second, the most likely relationship between supposed parents and offspring was estimated using ML-Relate program (Kalinowski et al., 2006). This program uses simulations and a ML approach, based on genotypic data, to compare putative relationships with alternative ones (Kalinowski et al., 2006). Third, ML-Relate was also used to perform a preliminary hypothesis testing analysis assuming as null hypothesis (H_0) a relationship of parent–offspring (PO) or full-sibs (FS), depending on what pair of individuals was being tested, vs. an alternative hypothesis (H_1) of unrelatedness. In cases when the most likely relationship reported by the program differed from the derived reported pedigree and ecological observations, we performed complex hypothesis testing. This procedure assumed as H_0 the most likely relationship, according to the previously undertaken calculations, and as H_1 the relationship derived from behavioral observations of individuals and zoological data. All the specific hypotheses testing were performed with 10,000 randomizations.

Paternity assignments in captive samples were performed using CERVUS version 3.0 (Kalinowski et al., 2007). From simulated data sets, this program calculates expected distributions of the statistic Delta, the difference in likelihood ratios between the two most likely candidates to be the parents of a certain offspring. A critical Delta value is generated and used to produce confidence

levels in assignments of parentage. In these simulations, population allele frequencies, number of possible candidate parents and proportion of candidate parents sampled were taken into account. For parentage analysis, the sire or dam was considered as “known” if registered in the studbook data, and the candidate fathers (drawn from studbook data) were then tested. The following parameters were used: 10,000 simulations, two candidate parents, 84% of candidate parent sampled (from results of preliminary analyses), 99% of genotypes available, 0.01% of loci mistyped and 1% of error rate. Parentage was assigned to putative parent only when the Delta value for a 95% confidence level was achieved. Another approach, also implemented in CERVUS 3.0, was applied to assign the two most likely parent-pair to a given offspring. In cases in which one parent was not registered, the software searched for the most likely parent-pair among all the candidate ones (those listed in the studbook data and which were born at least three years before the candidate offspring; according to Sawyer, 2002).

Misclassification rates of the relatedness estimator

A simulation approach was performed to determine the sampling variances of Q&Gr across an array of known relationship classes (Van de Castele et al., 2001). The program Kingroup (Konovalov et al., 2004) was employed to randomly generate genotypes of 1,000 pairs of UR individuals, 1,000 pairs of half-sibs (HS) and 1,000 pairs of FS. The input data for simulations consisted of the number of individuals to be generated, number of loci and frequencies of alleles at each locus. Allele frequencies at four loci were calculated from the same set of 174 UR Roseate Spoonbills used for the estimation of population genetic parameters (see previous section). Mean relatedness values were then calculated for the simulated pairs of each relationship category and compared with theoretically expected mean relatedness values (UR, 0.0; HS, 0.25; FS, 0.5), to compute the bias of the employed estimator. Two-tailed *t*-tests were used to evaluate the significance of the bias. Sampling variance of the estimator was calculated as the variance of the relatedness estimates for each simulated data set. All statistical analyses were performed using XLSTAT 2009 (<http://www.xlstat.com/en/products>).

Empirical misclassification proportions for assigning dyads to a specific relationship category

were calculated as the fraction misclassified out of 1,000 randomly generated pairs of UR, HS and FS, following Blouin et al. ('96). This “cut-off value” method estimates the probability that a pair of one type of relationship would be misclassified as belonging to another type by establishing the midpoints between the means of the distributions of pairwise relatedness estimates (Q&Gr) for simulated dyads as cut-off value (Blouin et al., '96). Similarly, actual misclassification rates for wild Roseate Spoonbills were calculated as the fraction of dyads misclassified out of the total number of presumed UR, FS and HS according to the previously calculated and empirically determined cut-off values. The program iRel v1.0 (Gonçalves da Silva and Russello, in preparation) was used to compute these rates using as input data the same set of genotypes from sampled UR individuals and population genetic parameters (see previous section).

RESULTS

Population parameters

The number of alleles per locus varied between three and nine in zoo samples and five and ten in natural populations. Total number of alleles was 26 in captive samples, and 36 in wild samples. Expected heterozygosities (*He*) ranged from 0.590 (Aaju3) to 0.810 (Aaju1) in captive samples, and from 0.491 (Aaju5) to 0.768 (Aaju1) in wild samples. None of the loci tested deviated significantly from Hardy–Weinberg equilibrium. The combined exclusionary probability for the four loci was 0.90 in captive samples, and 0.96 in wild samples. Probability of identity was 0.0003 for US zoos' samples, and 0.00011 for wild samples.

Performance of the relatedness estimator

The mean pairwise relatedness (Q&Gr) values calculated from the simulated distributions for wild Spoonbills were -0.0028 for UR, 0.6265 for FS and 0.2458 for HS. Similarly, mean *r* values for the simulated relatedness distributions from captive Spoonbills were: 0.0145 for UR, 0.5825 for FS and 0.2730 for HS. These values did not show significant departure from theoretically expected relatedness values ($P > 0.005$; $P_{crit} = 0.0611$). For wild and captive samples, the sampling variances of the Q&Gr estimator were, respectively: 0.0985 and 0.1034 for UR pairs, 0.0674 and 0.0738 for simulated HS and 0.0547 and 0.0456 for simulated FS.

Cut-off values for all relationship comparisons in wild samples, empirically established as the midpoint of the distributions of simulated pairwise relatedness values for the specified categories were 0.1186 for UR-HS, 0.3701 for HS-FS and 0.2386 for FS-UR. Empirical rates of misclassification for discriminating dyads ranged from 11.4% (UR-HS) to 35.5% (HS-FS) in wild samples (Table 2). The empirically determined Type II error of the Q&Gr statistic ranged from 11.5 to 20%, as evidenced by the proportions of HS and FS simulated pairs misclassified as pertaining to a lower relationship category (Table 2). Observed misclassification rates for wild samples of the Roseate Spoonbill, according to the empirically determined cut-off values formerly calculated from simulated data, ranged from 0 to 23.8% (Table 2). The observed Type II error of the Q&Gr estimator ranged from 0 to 22%, as evidenced by the proportions of HS and FS nestlings misclassified as pertaining to a lower class of relationship (Table 2).

Cut-off values for captive samples were as follows: UR-HS, 0.1294; HS-FS, 0.3602; UR-PO, 0.2480; UR-FS, 0.2405 and HS-PO, 0.3676. There were no captive parent-offspring dyads classified as belonging to a different relationship category other than the one suggested according to these values (Tables 3 and 4).

Parentage and genetic relatedness in captive populations

Recorded mating pairs and presumed offspring were listed in the specimen reports. Ancillary data provided by each zoo revealed that sires were

TABLE 2. Misclassification proportions for Q&Gr according to Blouin *et al.* ('96) estimated for randomly generated dyads of the Roseate Spoonbill from Brazilian natural breeding colonies

Simulated relationship	Misclassified as ¹	Empirical proportion	Observed proportion
UR	HS	0.114	0.238
HS	UR	0.200	0.222
HS	FS	0.355	0.000
FS	HS	0.170	0.190
UR	FS	0.133	0.095
FS	UR	0.115	0.000

Empirical proportion calculated as the fraction misclassified out of 1,000 randomly generated pairs of: unrelated (UR), half-sibs (HS) and full-sibs (FS). Observed proportion calculated as the fraction misclassified out of the total number of actual UR, FS and HS according to empirically determined cut-off values.

¹Cut-off values for all comparisons empirically established as the midpoint of the distributions of pairwise relatedness values for the specified relationship categories: UR-HS = 0.1186; HS-FS = 0.3701; FS-UR = 0.2386.

registered in the zoos' studbooks for 84% of the 25 nestlings analyzed, and dams were recorded for 72% (Table 1). Microsatellite genotyping was carried out to validate parentage assignment in Spoonbill families from zoological parks. Parentage assignment, ML approaches and genetic relatedness estimations supported a PO relationship between both putative sires and dams in matings #1, #2, #4, #8 and #17 and for offspring DZ39 and DZ42 of mating #14 (Tables 1, 3 and 4). Neither approach confirmed parentage for offspring and both recorded parents in matings #11, #12 and #13 and for offspring DZ40 and DZ41 in mating #14 (Tables 1, 3 and 4).

When only the putative dam was documented (four matings), maternity assignment tests were performed to verify whether the registered bird was, in fact, the most likely mother for the offspring. For example, FW15 was confirmed to be the dam of FW19 and FW21, and FW19 was the most likely dam of FW20 (Tables 1 and 3). In some families, the putative dam listed in the studbook was not confirmed, for example, SCZ45 was not related in the expected way to its supposed mother, DZ30 (Table 3). Similarly, in those cases where only the putative sire was documented (four matings), paternity assignment tests were performed to verify data. Relatedness tests, ML approaches and paternity assignments confirmed fatherhood for putative sires registered in matings #3, #10 and for offspring SCZ47 and SCZ48 in mating #16 (Table 4). All confirmed and excluded parent-offspring relationships were consistent with the cut-off values empirically determined for the captive population using simulations (see previous section).

When parentage assignments were incorrect, or when only one putative parent was registered in the studbook, ML approach and hypothesis testing analysis were applied to find the most likely parent among all the candidate ones. Analyses indicated the most likely dams for progeny in matings #3, #9, #10 and #16 (Table 3) and sires in matings #5, #6 and #7 (Table 4). Similarly, results of the search for parent-pairs identified possible parents for offspring in matings #11, #12, #13 and #14 (Tables 3 and 4). When multiple offspring were produced, the same methodology was applied to verify the putative relationships among them (Table 5). A UR relationship was significantly confirmed by each approach for four analyzed dyads (Table 5). Only three of the seven (42.8%) supposedly full-sibling pairs recorded by the zoos were confirmed as being fully related (Table 5).

TABLE 3. Maternity assignment tests for 25 Roseate Spoonbill offspring registered in studbooks from three US zoological parks, based on microsatellite data

Mating	Offspring	Hatch date	Putative dam	Assignment test	Q&Gr ¹	H ₀ /H ₁	P value	Possible dam	Q&Gr ²	H ₀ /H ₁	P value
#1	FW10	June 1981	FW15	Positive	0.731	PO/U	0.0145				
#1	FW12	June 1981	FW15	Positive	0.686	PO/U	0.0412				
#2	FW13	May 1993	FW12	Positive	0.755	PO/U	0.0043				
#3	FW16	June 1978	NA					FW15	0.791	PO/U	0.0183
#4	FW17	May 1993	FW16	Positive	0.391	PO/U	0.0109				
#5	FW19	June 1989	FW15	Positive	0.568	PO/U	0.0212				
#6	FW20	June 1994	FW19	Positive	0.768	PO/U	0.0245				
#7	FW21	July 1980	FW15	Positive	0.590	PO/U	0.0093				
#8	DZ31	August 1992	SCZ43	Positive	0.563	PO/U	0.0459				
#9	DZ32	July 1994	NA					SCZ45	0.267	PO/U	0.0023
#10	DZ33	July 1995	NA					DZ28	0.348	PO/U	0.1880
#10	DZ34	July 1995	NA					DZ28	0.021	PO/U	0.2253
#11	DZ35	July 1996	SCZ43	Negative	-0.095	U/PO	0.0000	DZ26	0.755	PO/U	0.0258
#12	DZ36	June 2000	DZ29	Negative	-0.076	U/PO	0.0000	DZ26	0.755	PO/U	0.0005
#12	DZ37	June 2000	DZ29	Negative	0.145	U/PO	0.0163	DZ26	0.510	PO/U	0.0297
#13	DZ38	June 2000	DZ28	Negative	-0.057	U/PO	0.0000	DZ29	0.739	PO/U	0.0695
#14	DZ39	June 2000	DZ26	Positive	0.530	PO/U	0.0238				
#14	DZ40	June 2000	DZ26	Negative	0.002	U/PO	0.0044	DZ29	0.739	PO/U	0.0785
#14	DZ41	June 2000	DZ26	Negative	-0.352	U/PO	0.0000	DZ34	1.000	PO/U	0.0001
#14	DZ42	July 2000	DZ26	Positive	0.376	PO/U	0.0058				
#15	SCZ45	June 1988	DZ30	Negative	-0.003	U/PO	0.0000	FW15	0.091	PO/U	0.3050
#16	SCZ47	July 1992	NA					SCZ43	0.550	PO/U	0.0794
#16	SCZ48	July 1994	NA					SCZ45	0.360	PO/U	0.0284
#16	SCZ49	July 1996	NA					SCZ43	0.203	PO/U	0.1379
#17	SCZ51	February 2001	SCZ45	Positive	0.730	PO/U	0.0107				

Q&Gr: Queller and Goodnight ('89) estimator. H₀/H₁: null vs. alternative hypothesis; P value: corresponds to hypothesis testing; $\alpha < 0.05$ implies H₀ acceptance; PO, parent-offspring; U, unrelated; NA, not available.

¹Genetic relatedness value for offspring and dam registered at the studbook.

²Genetic relatedness value for offspring and possible dam (identified by maternity assignment in this study).

Inconclusive results were obtained by analyses on other reported relationships, mainly resulting from the difficulty in distinguishing between HS and FS (Table 5).

Genetic relatedness in natural populations

Genetic information on four microsatellite loci together with relatedness estimation, ML approach, hypothesis testing and the "cut-off value" method were applied to check the genetic relationships among wild Spoonbill chicks sampled within the same nests. A total of 51 dyads were analyzed (Table 6). Each of the implemented approaches confidently identified 13 UR dyads (25.5%) (Table 6). Similarly, 17 of the analyzed dyads (33%) can be confidently considered FS (Table 6). Five dyads were confidently identified as HS by all the methodologies applied. Seven dyads, with significant P-values, were classified differently by the ML method and the "cut-off value" method as follows: three of them were considered FS by the Blouin et al. ('96) method and HS by the ML

method; four dyads were considered UR by the "cut-off value" method and as HS by the ML technique. For nine dyads, lack of significant values from hypothesis testing impaired a final confirmation of their classification: two were considered by both approaches as being HS; one showed a marginally significant P-value for UR by both methods and the remaining six presented different results depending on the method (Table 6). It is interesting to note that inside two nests (nests 9 and 28) we found both UR and fully related dyads classified confidently by the three methodologies applied.

DISCUSSION

Understanding the mating system of a species is essential for successful conservation programs and it may improve the calculation of parameters such as minimum viable population size (Frankham et al., 2002). This study checked studbook data by genetic analyses of parents and offspring from

TABLE 4. Paternity assignment tests for 25 Roseate Spoonbill offspring registered in studbooks from three US zoological parks, based on microsatellite data

Mating	Offspring	Hatch date	Putative sire	Assignment test	Q&Gr ¹	H ₀ /H ₁	P value	Possible sire	Q&Gr ²	H ₀ /H ₁	P value
#1	FW10	June 1981	FW11	Positive	0.580	PO/U	0.0092				
#1	FW12	June 1981	FW11	Positive	0.662	PO/U	0.0120				
#2	FW13	May 1993	FW10	Positive	0.881	PO/U	0.0008				
#3	FW16	June 1978	FW11	Positive	0.639	PO/U	0.0225				
#4	FW17	May 1993	FW21	Positive	0.409	PO/U	0.0032				
#5	FW19	June 1989	NA					FW10	0.369	PO/U	0.0082
#6	FW20	June 1994	NA					FW11	0.365	PO/U	0.1672
#7	FW21	July 1980	NA					FW11	0.523	PO/U	0.8583
#8	DZ31	August 1992	SCZ44	Positive	0.380	PO/U	0.0210				
#9	DZ32	July 1994	SCZ46	Negative	0.167	U/PO	0.0000	SCZ44	0.817	PO/U	0.0359
#10	DZ33	July 1995	SCZ44	Positive	0.384	PO/U	0.0209				
#10	DZ34	July 1995	SCZ44	Positive	0.311	PO/U	0.0229				
#11	DZ35	July 1996	SCZ44	Negative	-0.498	U/PO	0.0000	SCZ46	0.255	PO/U	0.0042
#12	DZ36	June 2000	DZ32	Negative	-0.246	U/PO	0.0000	DZ25	0.622	PO/U	0.1125
#12	DZ37	June 2000	DZ32	Negative	-0.474	U/PO	0.0000	DZ25	0.245	PO/U	0.1360
#13	DZ38	June 2000	DZ33	Negative	-0.194	U/PO	0.0000	DZ32	0.817	PO/U	0.0527
#14	DZ39	June 2000	DZ25	Positive	0.697	PO/U	0.0373				
#14	DZ40	June 2000	DZ25	Negative	-0.102	U/PO	0.0000	DZ32	0.450	PO/U	0.1047
#14	DZ41	June 2000	DZ25	Negative	-0.372	U/PO	0.0000	DZ33	0.728	PO/U	0.0049
#14	DZ42	July 2000	DZ25	Positive	0.716	PO/U	0.0073				
#15	SCZ45	June 1988	NA					DZ32	0.267	PO/U	0.3914
#16	SCZ47	July 1992	SCZ46	Positive	0.388	PO/U	0.0295				
#16	SCZ48	July 1994	SCZ46	Positive	0.500	PO/U	0.0317				
#16	SCZ49	July 1996	SCZ46	Negative	0.007	U/PO	0.1508	SCZ44	0.487	PO/U	0.082
#17	SCZ51	February 2001	SCZ48	Positive	0.589	PO/U	0.0110				

Q&Gr: Queller and Goodnight ('89) estimator. H₀/H₁: null vs. alternative hypothesis; P value: corresponds to hypothesis testing; $\alpha < 0.05$ implies H₀ acceptance; PO, parent-offspring; U, unrelated; NA, not available.

¹Genetic relatedness value for offspring and sire registered at the studbook.

²Genetic relatedness value for offspring and possible sire (identified by paternity assignment in this study).

captive families. Additionally, it contributed to better understanding of the mating system of the Roseate Spoonbill in the wild by helping to disentangle the relationships among nestlings sampled at natural breeding colonies.

Limitations of genetic analysis for discriminating among relationships in the Roseate Spoonbill

In this study, calculation of a symmetric regression-based relatedness estimator, ML approaches and hypothesis testing analyses were used for the first time to verify pedigree information and to compute genetic relatedness in the Roseate Spoonbill. Each one of the available methods of inferring relatedness from genetic data has inherent limitations (Van Horn et al., 2008). For example, marker-based relatedness estimators usually show a large sample variance as a consequence of the variance in identity-by-descent among loci, and the variance in identity-by-state for alleles that

are not identical by descent (Lynch and Ritland, '99; Russello and Amato, 2004). This variance can be reduced by increasing the number of polymorphic loci or by choosing the appropriate estimator. The number of loci available for the Roseate Spoonbill is low, but they enclose a reasonable amount of heterozygosity, a desirable property for reducing sampling variance (Ritland, '96). The exclusion probability obtained for captive samples with this panel of microsatellite loci was similar to the one reported by other authors for paternity analysis and mating systems studies (e.g., Whittingham et al., 2003; Chiver et al., 2008). It was suggested by Csilléry et al. (2006) that adding more polymorphic markers will result in a significant improvement of the average performance of the relatedness estimators only if the population has a high relatedness variance. As the sampling variance of the simulated relatedness distributions based on observed allele frequencies for wild and captive Roseate Spoonbill populations was relatively small, we can presume

TABLE 5. Genetic relatedness values, most likely relationship and results of hypothesis testing analyses for Roseate Spoonbill sibling pairs from recorded and not recorded (NR) matings of individuals from three US zoological parks, based on microsatellite genotyping data

Mating	Sibling pair	Q&Gr	Most likely relationship	H_0/H_1	P value
1	FW10–FW12	0.733	FS	FS/U	0.0243
10	DZ33–DZ34	0.483	FS	FS/U	0.0022
12	DZ36–DZ37	0.264	FS	FS/U	0.0763
14	DZ39–DZ40	0.079	U	U/FS	0.0859
14	DZ39–DZ41	–0.311	U	U/FS	0.0027
14	DZ39–DZ42	0.735	FS	FS/U	0.0127
14	DZ40–DZ41	–0.421	U	U/FS	0.0066
14	DZ40–DZ42	–0.072	U	U/FS	0.0202
14	DZ41–DZ42	–0.248	U	U/FS	0.0048
16	SCZ47–SCZ48	–0.083	U	FS/U	0.8456
16	SCZ47–SCZ49	–0.111	U	FS/U	0.7987
16	SCZ48–SCZ49	0.188	U	FS/U	0.5496
NR	FW10–FW16	0.577	U	FS/U	0.2157
NR	FW12–FW16	0.510	FS	FS/U	0.3100
NR	DZ36–DZ39	0.597	FS	FS/U	0.0430
NR	DZ36–DZ42	0.731	FS	FS/U	0.0008
NR	DZ37–DZ39	0.333	FS	FS/U	0.0962
NR	DZ37–DZ42	–0.333	U	U/FS	0.7748
NR	DZ38–DZ40	0.213	FS	FS/U	0.0500

Q&Gr: Queller and Goodnight ('89) estimator. H_0/H_1 : null vs. alternative hypothesis; P value: corresponds to hypothesis testing; $\alpha < 0.05$ implies H_0 acceptance; PO, parent–offspring; U, unrelated; FS, full-siblings; HS, half-siblings.

that including more microsatellites might not be strictly necessary to substantially increase the power of the relatedness estimations.

The power of the panel of markers used to distinguish among first-order and UR individuals was evaluated by estimating misclassification rates, using “cut-off values”, according to Blouin et al. ('96). Misclassification rates observed for captive and wild samples of the Roseate Spoonbill addressed by means of simulation approaches were small (Table 2).

When distinguishing among supposed sibs (full or half) and UR individuals, it is important to minimize the Type II error, the proportion of individuals misclassified as belonging to a lower category of relationship. In this study, this proportion was low according to performed simulations (Table 2), a result that confirms that the employed markers can discriminate between first-order and UR individuals in a degree good enough to have confidence in parentage assignment and for addressing the mating system-related questions.

Considering that it is expected a priori that a pair of young birds in a nest would be FS rather than HS or UR, a valuable approach is to estimate

the probability of the data under each opposing relationship category, and then select the category that yields the highest likelihood (Blouin, 2003). Hypothesis testing and likelihood approaches implemented in this study to test the probability of one pair falling into one category vs. another is well supported (Blouin, 2003; Milligan, 2003; Weir et al., 2006). Likelihood methods allow the extraction of most information about the relationship from the observed genotypes (Weir et al., 2006). Moreover, likelihood and fractional assignment techniques can compensate for deficiencies of the data set (Jones and Ardren, 2003). CERVUS 3.0 corrects for multiple comparisons and it has revised equations that offer a substantial increase in power to assign parentage (Kalinowski et al., 2007). Simulation approaches as those employed by all the software used in this work are useful for discovering ways of augmenting the success of paternity assignment, for example, strengthening efforts to increase sampling of candidate parents (Marshall et al., '98). Finally, simulation techniques assist in the attainment of statistical significance for the assigned relationships (Queller and Goodnight, '89).

Parentage and genetic relatedness in captive populations

The exchange of approximately 500 Roseate Spoonbills that are maintained in US zoological parks has been used as a strategy to preserve the genetic diversity of captive populations and guarantee the genetic fitness of future progeny (Sawyer and Benjamin, 2006). This management practice relies upon the accuracy of zoo studbook data for the choice of less related individuals for reproduction. However, complete and consistent pedigrees are often unavailable in many captive populations. The lack of apparent sexual dimorphism among adults of the Roseate Spoonbill can make it difficult to identify breeding pairs and impair the correct recording of pedigree information. Besides, individuals are often kept in large groups or colonies, making it difficult to control individuals for pairing, which increases the cost of building individual pedigrees. Because of complexities in pedigree building, such as limitations in resources and time, significant errors could occur in current lineage data of this species, leading to severe consequences in breeding design and management of captive populations.

Molecular marker information used together with pedigree data increases the power of selection

TABLE 6. Genetic relatedness values, most likely relationship and results of hypothesis testing analyses based on microsatellite genotyping data for Roseate Spoonbill nestlings sampled within the same nest at Brazilian natural breeding colonies

Nest	Individuals	Q&Gr	Most likely relationship	H_0/H_1	P value
	PAN				
1	B003-B004	0.210	HS	HS/FS	0.2309
2	B007-B008	0.704	FS	FS/U	0.0001***
2	B007-B009	0.137	HS	HS/U	0.0000***
2	B008-B009	0.377	FS	FS/U	0.0138*
3	B030-B031	0.476	HS	HS/FS	0.3243
4	B036-B037	-0.003	U	U/FS	0.0147*
4	B037-B038	0.082	HS	HS/FS	0.3091
4	B036-B038	-0.197	U	U/FS	0.0066**
5	B054-B055	0.466	FS	FS/U	0.0103*
6	B061-B062	0.659	FS	FS/U	0.0239*
7	B069-B073	0.326	U	U/FS	0.0848
8	B081-B084	-0.197	U	U/FS	0.0203*
9	R901-R902	0.243	HS	HS/FS	0.2350
9	R901-R903	-0.405	U	U/FS	0.0082**
9	R902-R903	0.002	U	U/FS	0.0496*
9	R902-R904	-0.002	U	U/FS	0.0452*
9	R903-R904	-0.075	U	U/FS	0.0516
9	R901-R904	0.474	FS	FS/U	0.0405*
10	R911-R912	-0.035	HS	HS/FS	0.3096
11	404-409	-0.064	FS	FS/U	0.1159
11	404-410	0.316	U	U/FS	0.1272
11	409-410	-0.022	U	U/FS	0.0004***
12	A070-A069	-0.051	FS	FS/U	0.0375*
	RS				
13	RS12-RS13	-0.204	U	U/FS	0.0186*
	AM				
14	M359-M360	0.106	HS	HS/FS	0.00005***
14	M359-M361	0.034	HS	HS/FS	0.00002***
14	M360-M361	0.262	HS	HS/FS	0.00003***
15	M122-M123	-0.085	U	U/FS	0.0038**
16	M144-M145	0.860	FS	FS/U	0.0055**
16	M144-M146	0.723	FS	FS/U	0.0305*
16	M145-M146	0.568	FS	FS/U	0.0436*
17	M153-M154	0.387	HS	HS/FS	0.0005**
18	M157-M158	-0.194	U	U/FS	0.0003**
19	M173-M174	0.674	FS	FS/U	0.0529*
19	M173-M175	0.504	FS	FS/U	0.0206*
19	M174-M175	0.645	FS	FS/U	0.0414*
20	M180-M181	1.000	FS	FS/U	0.0000***
21	M182-M183	0.317	HS	HS/FS	0.0003**
22	M184-M185	-0.083	U	U/FS	0.0023**
23	M245-M246	0.423	HS	HS/FS	0.0004**
24	M306-M307	0.201	HS	HS/FS	0.1500
25	M313-M314	0.492	HS	HS/FS	0.0003**
25	M313-M315	0.200	HS	HS/FS	0.0004**
25	M314-M315	0.106	HS	HS/FS	0.0005**
26	M319-M320	1.000	FS	FS/U	0.0000***
26	M319-M321	0.914	FS	FS/U	0.0000***
26	M320-M321	0.914	FS	FS/U	0.0001***
27	M322-M323	0.711	FS	FS/U	0.0394*
28	M327-M328	0.830	FS	FS/U	0.0002**
28	M326-M327	-0.301	U	U/FS	0.0066**
28	M326-M328	-0.0009	U	U/FS	0.0080*

Q&Gr: Queller and Goodnight ('89) estimator; H_0/H_1 : null vs. alternative hypothesis; PO, parent-offspring; U, unrelated; FS, full-siblings; HS, half-siblings; AM: Amapa; PAN: pantanal; RS: Rio Grande do sul; P-value: corresponds to hypothesis testing: *** indicates $\alpha = 99.9\%$, ** indicates $\alpha = 99\%$, * indicates $\alpha = 95\%$.

schemes, minimizing genetic deterioration and optimizing conservation programs (Wang, 2002). According to Van Horn et al. (2008), genetic data may be useful to verify pedigree relationships. Our results indicated that parent–offspring relationships were confirmed in only 61.5% of the total parent–offspring pairs analyzed at zoo parks (Tables 3 and 4); motherhood was confirmed for 61.1% of the PO dyads studied (Table 3) and assigned fatherhood based on behavioral observations was confirmed for 61.9% of the total sire–offspring pairs analyzed (Table 4). In 75% of the situations in which only the dam was registered, maternity assignments were correct, assumably because egg-laying females are easily identified. Similarly, when only sires were recorded, the paternity was correctly assigned for 71.4% of the sire–offspring pairs.

One of the most important contributions of the genetic analyses to pedigree building was the identification of the most likely parent-pair for all descendants. This procedure revealed that some individuals mated several times in different reproductive seasons generating numerous offspring, although zoo personnel did not record all these matings. Another important finding was that one Spoonbill parented two nestlings that mated later and produced an offspring. Both these examples illustrate cases in which inbreeding remained unidentified based solely on behavioral observations. Such situations may increase the loss of genetic diversity and result in the expression of recessive deleterious alleles (Hunter and Gibbs, 2006) in the captive population of Roseate Spoonbills.

It is worth noting that all the methodologies applied here correctly assigned the seven nestlings born in the summer of 2000, whose studbook records were ambiguous. The results indicated that one pair parented four nestlings, another pair parented one nestling and a third dyad parented two other nestlings. Additionally, genetic analyses performed in this study correctly identified a mistaken parentage assignment originating from the incorrect sex-typing of an individual during endoscopy at the zoo (Sawyer, 2002).

In summary, our results show that inclusion of genetic information can augment the precision of parentage assignment in captive populations of the Roseate Spoonbill. Whenever possible, individual relationships should be classified by combining genetic data with ecological observations. Hence, we propose the use of genetic approaches to correctly identify familial relationships and to estimate genetic relatedness to assure that birds

exchanged between facilities, or mated within, will maintain or increase genetic diversity in the populations.

Genetic relatedness in natural populations

The study of mating systems in the wild is particularly demanding in the Roseate Spoonbill, and in waterbirds in general, because adults are very difficult to capture within nests to obtain complete family samples, impairing detailed genotype comparisons between parents and offspring. Moreover, copulations are very difficult to observe directly in nature and the lack of sexual dimorphism complicates sex-differentiating observations. One alternative to unravel aspects of a mating system in cases like this is to deduct reproductive behavior from molecular information on maternity and paternity (Awise, 2004), as performed in many recent studies (for example: Amavet et al., 2008). As a first approach to clarifying the mating system in the Roseate Spoonbill we investigated genetic relationships among 67 supposed siblings from 28 nests sampled in wild Brazilian breeding colonies. Results from pairwise relatedness values, hypothesis testing, ML approaches and “cut-off value” method indicated that 33% of the analyzed dyads were full-siblings. These progenies can be explained assuming genetic monogamy between nest-attending adult birds (Table 6). Alternatively, fully related siblings can be the product of an extra-pair mating and parental care being from nest attending birds. If the latter is the case, nest parasitism would be occurring, and the results obtained in this study will represent an underestimation of the real frequency of extra-pair mating. Additionally, 9.8% of analyzed dyads were confidently assigned as HS (Table 6). UR individuals were detected in 25.5% of the sampled dyads, suggesting that more than one parent-pair might have been responsible for those nestlings. Almost 14% of the dyads were misclassified by the ML approach, but presented significant *P*-values for hypothesis testing analysis. The remaining 17.4% did not result in significant classifications.

Results obtained using three different methodologies to unravel relationships among nestlings in natural populations are concordant and point to the existence of a system other than monogamy for this species in the wild. Extra-pair copulations of the Roseate Spoonbill in situ is in agreement with the reproductive behavior already observed in other species of the order Ciconiiformes: the Great-Egret, *Ardea alba* (Krebs et al., 2004), the

White Ibis, *Eudocimus albus* (Frederick, '87), the Cattle Egret, *Bulbucus ibis* (McKilligan, '90), the Grey Heron, *A. cinerea* (Ramo, '93), the Scarlet Ibis, *E. ruber* (Olmos and Silva e Silva, 2003; Elbin and Burger, 2005) and the Chinese Egret, *Egretta eulophotes* (Guo-An et al., 2005).

Further work with an extended empirical dataset, comparisons of relatedness estimators and approaches in kinship assessment, as well as a greater sampling of natural populations within the distribution range of the species, will improve the analyses of research questions.

The strategy proposed in this work can be used as a reference in studies with other species, such as the Black-faced Spoonbill (*P. minor*), which is critically endangered in nature (Yeung et al., 2006). In cases like this, preserving the genetic diversity in captivity is essential for future reintroductions in places with viable or restored habitat, but where the species has become extinct. Furthermore, the approaches employed here will be useful in studying questions about other species where it is difficult to obtain samples from complete families, and would help to answer questions on aspects such as the evolution of reproductive behavior.

ACKNOWLEDGMENT

C. I. M. acknowledges the financial support of Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), through a Master's research grant (473760/2004-5) and a doctoral's research grant (140382/2007-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), through a project research grant (2004/15205-8). We are grateful to Vanessa Morgan for helping with genotyping and to CEMAVE/IBAMA (Brazil) for permission to handle the birds and collect biological material. G. M. S. acknowledges Chris Brown and the Dallas, Fort Worth and Sedgwick County Zoos for providing blood samples and studbook documentation. Anders Gonçalves da Silva and Mike Russello are kindly acknowledged for help with simulation analyses in iRel software. We also thank anonymous reviewers for useful suggestions and comments.

LITERATURE CITED

- Amavet P, Rosso E, Markariani R, Piña CI. 2008. Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina. *J Exp Zool* 309A:637–642.
- Awise JC. 2004. Molecular markers: natural history and evolution, 2nd edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc. 541p.
- Blouin M. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol Evol* 18:503–511.
- Blouin M, Parsons M, Lacaille V, Lotz S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol Ecol* 5:393:401.
- Caballero A, Toro MA. 2002. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genet Res, Camb* 75:331–343.
- Chiver I, Stutchbury BJM, Morton ES. 2008. Do male plumage and song characteristics influence female off-territory forays and paternity in the hooded warbler? *Behav Ecol Sociobiol* 62:1981–1990.
- Csilléry K, Johnson T, Beraldi D, Clutton-Brock T, Coltman D, Hansson B, Spong G, Pemberton JM. 2006. Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics* 173:2091–2101.
- Dumas JV. 2000. Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*). In: Poole A, Gill F, editors. The birds of North America 490. Philadelphia: The Birds of North America Inc. p 1–31.
- Eding H, Meuwissen THE. 2001. Marker-based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *J Anim Breed Genet* 118:141–159.
- Elbin SB, Burger J. 2005. Is extra-pair copulation a mating strategy or a by-product of sexual activity in Scarlet Ibis? In: Annals of the Thirty-Second Annual Meeting of the Pacific Seabird Group and Twenty-Seventh Annual Meeting of the Waterbird Society. Portland, OR. p 55.
- Encarnação CD, Diniz MG. 1992. Relatório Técnico07/92: GE/TEC/fauna-IBAMA/MG. MG, Brazil: Belo Horizonte.
- Florida Fish and Wildlife Conservation Commission. 2008. Florida's endangered species, threatened species and species of special concern. Official List. Available at <http://myfwc.com/imperiledspecies/pdf/Threatened-and-Endangered-Species-current.pdf>. Assessed on 18/02/2009.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to conservation genetics. UK: Cambridge University Press. p 640.
- Frederick PC. 1987. Extra-pair copulations in the mating system of White Ibis (*Eudocimus albus*). *Behaviour* 100:170–201.
- Gonçalves da Silva A, Russello MA. iRel v1.0: an online tool for estimating relatedness. URL: <http://irel.ok.ubc.ca:8080/web/Mathematica/irel/irel.html>.
- Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA. 2002. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol Ecol* 11:2195–2212.
- Guo-An W, Zuo-Hua Y, Fu-Min L. 2005. Copulations and mate guarding of the Chinese Egret. *Waterbirds* 28:527–530.
- Hunter ML, Gibbs J. 2006. Fundamentals of conservation biology, 3rd edition. Oxford, UK: Blackwell Publishing. 516p.
- Jamieson A, Taylor SCS. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim Genet* 28:397–400.
- Jones AG, Ardren WR. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol Ecol* 12:2511–2523.
- Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol Ecol Notes* 6:576–579.

- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106.
- Konovalov DA, Manning C, Henshaw MT. 2004. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol Ecol Notes* 4:779–782.
- Krebs EA, Hunter W, Green DJ. 2004. Plume variation, breeding performance and extra-pair copulations in the cattle egret. *Behaviour* 141:479–499.
- Lynch M, Ritland K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152:1753–1766.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7:639–655.
- McKilligan NG. 1990. Promiscuity in the Cattle Egret (*Bubulcus ibis*). *Auk* 107:334–341.
- Milligan BG. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163:1153–1167.
- Olmos F, Silva e Silva R. 2003. Guará: Ambiente, Flora e Fauna dos Manguezais de Santos-Cubatão. São Paulo: Empresa das Artes. 216p.
- Paetkau D, Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol Ecol* 3:489–495.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295.
- Powell GVN, Bjork RD. 1990. Relationships between hydrologic conditions and quality and quantity of foraging habitat for Roseate Spoonbills and other wading birds in the C-111 Basin. South Florida Research Center, Everglades National Park, National Park Service, Second Annual Report, Homestead, FL.
- Queller DC, Goodnight KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43:258–275.
- Ramo C. 1993. Extra-pair copulations of Grey Herons nesting at high densities. *Ardea* 81:115–120.
- Ritland K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet Res* 67:175–185.
- Russello MA, Amato G. 2004. Ex-situ population management in the absence of pedigree information. *Mol Ecol* 13:2829–2840.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual, 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344p.
- Sawyer GM. 2002. DNA profiling of captive Roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*) populations as a mechanism of determining lineage in colonial nesting birds. Ph.D. Thesis. University of North Texas, TX.
- Sawyer GM, Benjamin RC. 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of Roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Mol Ecol Notes* 6:677–679.
- Sibley DA. 2001. The sibley guide to bird life and behavior. New York: Knopf. 608p.
- Sick H. 1997. Ornitologia Brasileira. Uma introdução. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 912p.
- Stutchbury BJM, Morton ES. 2008. Recent advances in the behavioral ecology of tropical birds. *Wilson J Ornithol* 120:26–37.
- Van de Castele T, Galbusera P, Matthyssen E. 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Mol Ecol* 10:1539–1549.
- Van Horn RC, Altmann J, Alberts SC. 2008. Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Anim Behav* 75:1173–1180.
- Wang J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160:1203–1215.
- Weir BS, Anderson AD, Hepler AB. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nat Rev Genet* 7:771–780.
- Wilberg MJ, Dreher BP. 2004. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Mol Ecol Notes* 4:783–785.
- Whittingham LA, Dunn PO, Clotfelter ED. 2003. Parental allocation of food to nestling tree swallows: the influence of nestling behaviour, sex and paternity. *Anim Behav* 65:1203–1210.
- Yamashita C, Valle MP. 1990. Sobre ninhas de aves do Pantanal do município de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Vida Silvestre Neotropical* 2:59–63.
- Yeung CK-L, Yao C-T, Hsu Y-C, Wang J-P, Li S-H. 2006. Assessment of the historical population size of an endangered bird, the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) by analysis of mitochondrial DNA diversity. *Anim Conserv* 9:1–10.
- Zenuto RR, Lacey EA, Busch C. 1999. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mol Ecol* 8:1529–1532.