

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

EMMANUEL MORALES DA SILVA

**“GARÇA-VAQUEIRA (*Bulbucus ibis*): A DIVERSIDADE
GENÉTICA NO ESTUDO DO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO E NA CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO
INVASORA BRASILEIRA”**

SÃO CARLOS

2013

**“GARÇA-VAQUEIRA (*Bulbucus ibis*): A DIVERSIDADE
GENÉTICA NO ESTUDO DO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO E NA CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO
INVASORA BRASILEIRA”**

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

EMMANUEL MORALES DA SILVA

**“GARÇA-VAQUEIRA (*Bulbucus ibis*): A DIVERSIDADE
GENÉTICA NO ESTUDO DO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO E NA CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO
INVASORA BRASILEIRA”**

**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

2013

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

S586gv

Silva, Emmanuel Moralez da.

Garça-vaqueira (*Bulbucus ibis*) : a diversidade genética no estudo do comportamento reprodutivo e na caracterização da população invasora brasileira / Emmanuel Moralez da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
76 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética de populações. 2. Garça-vaqueira. 3. Casca de ovo. 4. Colonização. 5. Diversidade genética. 6. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

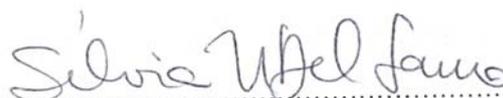
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“GARÇA-VAQUEIRA (*Bulbucus ibis*): A DIVERSIDADE
GENÉTICA NO ESTUDO DO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO E NA CARACTERIZAÇÃO DA
POPULAÇÃO INVASORA BRASILEIRA”.

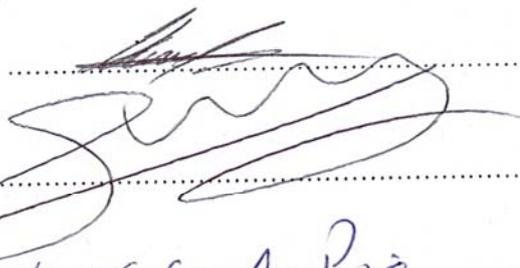
Tese de Doutorado de
EMMANUEL MORALES DA SILVA

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama



Prof. Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho



Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes

Prof. Dr. Marco Aurelio Pizo Ferreira



Profa. Dra. Alexandra Sanches



असतो मा सद्गमय
तमसो मा ज्योतिर्गमय
मृत्योर्मा अमृतं गमय

"Om Asato Ma Sat Gamaya

Tamaso Ma Jyotir Gamaya

Mrityor Ma Amritam Gamaya"

“Leve-me da Não-Verdade para a Verdade

Da escuridão para a Luz

Do medo da Morte para o conhecimento da Imortalidade”

AGRADECIMENTOS

- ❖ Em primeiro lugar a antes de todos agradeço a Deus... Por ter me proporcionado a vida, a saúde, a força e a determinação de vivê-la ao máximo, buscando sem medo de falhar meus objetivos e trilhando com sua proteção e luz o caminho que devo percorrer para ser feliz e realizado na minha vida pessoal e profissional.
- ❖ Agradeço a minha querida e amada família. A meu Pai Waldemar e minha Mãe Terezinha por terem sempre me apoiado nas minhas decisões de vida e me ensinado a encarar os desafios da vida sem medos e com coragem, determinação, respeito aos outros e um baita sorriso na cara. A minhas irmãs Ticy e Theli por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me ajudando em todos os aspectos da vida, sejam profissionais ou pessoais. A minhas sobrinhas lindas, Giullia e Clarinha por serem uma fonte de alegria sempre eterna na minha vida. Sem o amor incondicional e apoio da minha família não teria chegado tão longe quanto cheguei e onde ainda vou chegar.
- ❖ A vida seria muito difícil sem grandes amigos para compartilharmos nossas alegrias e tristezas! Meus queridos amigos têm um lugar muito especial em meu coração e são para mim muito importantes. Ana Cristina Bondioli, Andiará Silos, Camila Martins, Carolina Sens, Carolina Scultori, Cintia Camila, Emeline Campanini, Emile Drotschie, Gislaine Filla, Helena Janke, Henrique Carrari, Ivan Martins, Jeferson Moreto, Letícia Quito, Lia Sabinson, Luciana Jatobá, Natália Cerântola, Paulo César Gregori, Raquel Negrão, Rafael Verzini, Regina Câmara, Ricardo Brocenschi, Samantha Fonseca, Thaís Corrêa, Valéria Iared... Muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos durante esse período da minha vida. Tenho um grande carinho por cada um de vocês e cada um teve uma grande participação em momentos de felicidade, assim como momentos não tão felizes.
- ❖ O trabalho seria muito chato sem a agradável companhia de meus amigos e colegas de laboratório. Embora cada um tivesse seu próprio trabalho e projetos, sempre nos ajudamos e sempre trabalhamos em equipe... uma verdadeira família de jovens geneticistas, aprendendo juntos os mistérios da genética molecular e passando ótimos momentos juntos no laboratório e no campo. Alguns já partiram para novas empreitadas em suas vidas e outros ainda estão terminando seus trabalhos... Andiará Silos, Carolina Miño, Carlos Congrains, Cinthia Villar,

Elaine Dantas, Emeline Campanini, Fagner Miguel, Jorge Luiz Ramirez, Pâmela Regina Câmara, Thaís Corrêa. Muito obrigado pelos momentos que passamos juntos.

- ❖ Agradeço minha orientadora Sílvia Del Lama pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e desenvolver um projeto com genética, área na qual não havia trabalhado anteriormente. Pela confiança depositada em mim nestes quatro anos de doutorado, quanto ao trabalho de campo e de laboratório. Sou muito grato por ela ter me proporcionado a possibilidade de conhecer e fazer coleta de campo na África do Sul, o que me abriu novos horizontes e possibilidades pessoais e profissionais para uma nova fase da minha vida.
- ❖ O trabalho no campo muitas vezes é dificultado pela falta de ajuda. Agradeço muito toda a ajuda no campo, seja no planejamento das atividades como na ajuda na coleta das amostras, por parte das seguintes pessoas: Andiará Silos, Carlos Congrains, Cinthia Villar, Dominic Henry, Elaine Dantas, Emeline Campanini, Francisco Marcucci, Gabriela Isabela Gomes de Oliveira, Graeme Cumming, Nivea Yamagami, Roberta Rodrigues, Sherezino Sherer e Thiago Antônio Alves do Prado.
- ❖ Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e Evolução e do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela agradável convivência todos esses anos.
- ❖ A realização do trabalho só foi possível graças ao financiamento pelos órgãos de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- ❖ Ao IBAMA pelas autorizações de coleta e transporte das amostras biológicas utilizadas nesse trabalho e ao CEMAVE – ICMBio pela disponibilização das anilhas utilizadas.
- ❖ E aos que não citei mas que fizeram de alguma forma parte, direta ou indireta, desta etapa da minha vida!

Estou me sentindo como um rio que chega ao oceano...

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira.

O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar.

Voltar... É impossível na existência.

Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece

Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano,

Mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós, voltar é impossível na existência.

O negócio agora é ir em frente e se arriscar...

RESUMO

A diversidade genética da garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*) foi utilizada para se investigar o comportamento reprodutivo e para se caracterizar populações brasileiras da espécie. Genótipos em locos de microssatélites foram utilizados na detecção da presença de mais de uma fêmea ovipositando em um mesmo ninho, o que pode caracterizar a ocorrência de maternidade múltipla. O DNA extraído dos *swabs* coletados na superfície externa dos ovos foi sexado e eventuais amostras de machos foram excluídas. Quarenta e oito ninhadas, de duas temporadas reprodutivas (2010 e 2011) foram analisadas geneticamente. Foram registrados 39 ovos ovipositados por uma segunda ou terceira fêmea. Em 33 ninhos foram encontrados genótipos distintos de duas fêmeas e em seis ninhos genótipos de três fêmeas. Em cinco ninhos o primeiro ovo na sequência de oviposição mostrou-se ser de uma fêmea diferente, tendo a oviposição acontecido previamente àquela da fêmea incubante. Esse achado foi explicado supondo a tomada de ninho por um segundo casal de garças, com a manutenção do ovo pré-existente juntamente com os da própria ninhada. Nos outros 43 ninhos, a presença das fêmeas extras foi explicada hipotetizando a ocorrência de parasitismo de ninho intraespecífico. Um fragmento de 463 pb do Domínio I da região controladora do DNA mitocondrial foi amplificado para 148 indivíduos para a investigação de parâmetros genético-populacionais e processos demográficos nas sete populações estudadas. A estimativa de índices de diversidade genética, testes de estruturação populacional F_{st} e AMOVA, a construção de uma rede de relação entre haplótipos, a análise de mudanças no tamanho populacional pela *mismatch distribution* e a realização de testes de neutralidade (D de Tajima, F_s de Fu, D^* e F^* de Fu e Li, R_2 de Ramos-Onsins e Rozas) permitiram identificar: i) um nível alto de diversidade genética para *B. ibis* no Brasil, quando comparado a espécies proximamente relacionadas estudadas no país; ii) níveis semelhantes de diversidade genética determinados para as regiões brasileiras; iii) ausência de estruturação genética entre as sete populações estudadas; e iv) ausência de sinais de expansão demográfica pelos testes realizados. Os resultados aqui apresentados são os primeiros resultados genéticos na espécie até o momento e apontam para uma alta plasticidade no comportamento reprodutivo e confirmam a dispersão bastante acentuada da espécie, levando a homogeneização das populações brasileiras.

Palavras-chave: *Bubulcus ibis*; casca do ovo; colonização; diversidade genética; DNA materno; DNA mitocondrial; garça-vaqueira; parasitismo de ninho intraespecífico; poligamia; região controle; *swab*.

ABSTRACT

The genetic diversity of the cattle egret (*Bubulcus ibis*) was analyzed to investigate reproductive behavior and characterize Brazilian populations of the species. Genotypes at seven microsatellite *loci* were used to investigate the occurrence of more than one female laying eggs in the same nest, characterizing the occurrence of multiple maternity. DNA was extracted from swabs collected from the outer surface of eggs and sexed; males were excluded. Forty-eight clutches from two breeding seasons (2010 and 2011) were genetically analyzed. Thirty-nine eggs laid by a second or third female were recorded. In five nests, the first egg of the clutch was from a different female, the laying happening prior to that of the incubating female. Suggesting nest takeover by another pair of egrets that kept the pre-existing eggs together with its own clutch. In the other 43 nests, the hypothesis of brood parasitism was posed to explain why one or two additional females were found laying eggs in a nest. A 463-bp fragment of the mitochondrial DNA control region Domain I was amplified for 148 individuals from seven Brazilian populations to investigate genetic-population and demographic parameters. Genetic diversity indices, the population structure tests *F_{st}* and AMOVA, a haplotype network, mismatch distribution and neutrality tests (Tajima's *D*, Fu's *F_s*, Fu and Li's *D** and *F**, Ramos-Onsins and Rozas' *R₂*) revealed the following: i) a high level of diversity was recorded for the cattle egret in Brazil in comparison to other closely related species studied in the country; ii) genetic diversity levels determined for the Brazilian regions are similar; iii) genetic structuring was not observed between the seven studied populations; and iv) the different tests performed to determine demographic expansion revealed no significant results. This is the first genetic characterization study for *Bubulcus ibis* to date and the findings indicate a high degree of plasticity in reproductive behavior and confirm a marked dispersion behavior of the species, leading to the homogenization of Brazilian populations.

Keywords: *Bubulcus ibis*; Cattle Egret; colonization; control region; eggshell; genetic diversity; multiple maternity; intraspecific brood parasitism; maternal DNA; mitochondrial DNA; polygyny; swab.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Adulto de *Bubulcus ibis* na colônia reprodutiva de Rio Claro, SP..... 2
- FIGURA 2.** Ninhos de *Bubulcus ibis* dentro de colônia reprodutiva em Rio Claro, SP..... 4
- FIGURA 3.** Mapa da distribuição de *Bubulcus ibis* na América do Sul. No Brasil a espécie é encontrada e se reproduz em todo território nacional. Mapa extraído de KUSHLAN e HANCOCK (2005)..... 8
- FIGURA 4.** Foto aérea do Parque Lago Azul no município de Rio Claro (SP). Ressaltado com círculo amarelo a ilha na qual se encontra a colônia reprodutiva na qual o estudo foi realizado..... 17
- FIGURA 5.** Foto aproximada da colônia reprodutiva de Rio Claro, na qual foi realizado o estudo de maternidade múltipla em *Bubulcus ibis*..... 18
- FIGURA 6.** Exemplo de um ninho de *Bubulcus ibis*, que foi monitorado neste estudo. Observa-se a placa numerada para identificação do ninho e marcação numérica com tinta a base de corante natural para identificação dos ovos..... 19
- FIGURA 7.** Coleta por *swabbing* do material biológico contendo o DNA materno na casca do ovo de *Bubulcus ibis*..... 21
- FIGURA 8.** Maternidade múltipla (MM) evidenciada pelas abordagens comportamental e/ou genética em 16 ninhos de *Bubulcus ibis*. Os números sobre as barras entre os ovos indicam os intervalos de postura em dias. **C** indica um ovo sugerido como resultado de MM pelo critério de observação comportamental; **G** indica um ovo sugerido como resultado de MM pelo método genético..... 35
- FIGURA 9.** Gráficos da *mismatch distribution* para as sete populações brasileiras de *Bubulcus ibis* analisadas..... 47
- FIGURA 10.** Rede de haplótipos das populações brasileiras de *Bubulcus ibis*. O tamanho dos polígonos é correspondente à frequência de ocorrência de cada haplótipo. Abaixo de cada haplótipo as populações nas quais o mesmo foi amostrado..... 48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Locos de microssatélites com oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados no presente trabalho.....	22
TABELA 2. Parâmetros reprodutivos de <i>Bubulcus ibis</i> levantados na colônia reprodutiva de Rio Claro, SP, em duas estações reprodutivas.....	31
TABELA 3. Genótipos em sete locos de microssatélites das amostras de DNA extraídas dos <i>swabs</i> coletados nos ovos de 16 ninhos de <i>Bubulcus ibis</i> na colônia de Rio Claro no ano de 2010. Em negrito são evidenciados os genótipos não coincidentes entre ovos de um mesmo ninho.....	33
TABELA 4. Vínculo biológico mais provável entre os pares de fêmeas distintas ovipositando em um mesmo ninho de <i>Bubulcus ibis</i> . QGM – valor médio calculado pelo estimador de QUELLER e GOODNIGHT (1989).....	36
TABELA 5. Genótipos em seis locos de microssatélites das amostras de DNA extraídas dos <i>swabs</i> coletados nos ovos de 30 ninhos de <i>Bubulcus ibis</i> na colônia de Rio Claro no ano de 2011. Em negrito são evidenciados os genótipos não coincidentes entre ovos de um mesmo ninho para as amostras de fêmeas. Em verde a fêmea incubante (fêmea “oficial”), em vermelho macho e em preto uma segunda ou terceira fêmea que ovipositou no mesmo ninho.....	37
TABELA 6. Vínculo biológico mais provável entre os pares de fêmeas distintas ovipositando em um mesmo ninho de <i>Bubulcus ibis</i> . QGM – valor médio calculado pelo estimador de QUELLER e GOODNIGHT (1989).....	40
TABELA 7. Haplótipos do DI da região controladora do DNAmít amostrados em <i>Bubulcus ibis</i> no Brasil, com suas frequências de ocorrência em cada uma das populações estudadas. S = sítios variáveis, H = haplótipos.....	44
TABELA 8. Diversidade genética das populações brasileiras de <i>Bubulcus ibis</i> . N - número de indivíduos analisados, S - número de sítios segregantes, H - número de haplótipos, <i>h</i> - diversidade haplotípica, π - diversidade nucleotídica.....	45
TABELA 9. <i>Fst</i> par-a-par comparando as populações brasileiras de <i>Bubulcus ibis</i>	45
TABELA 10. Resultado da AMOVA entre as populações brasileiras de <i>Bubulcus ibis</i>	46

TABELA 11. Resultado dos testes de neutralidade realizados para as populações brasileiras de <i>Bubulcus ibis</i>	46
--	----

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução	1
1. A garça-vaqueira, <i>Bubulcus ibis</i>	2
1.1 Reprodução e aspectos do comportamento reprodutivo.....	3
1.2 Invasão e colonização do Brasil.....	6
2. A genética nos estudos de espécies invasoras.....	8
3. Objetivos.....	11
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4. Justificativa.....	13
Capítulo 2. Material e Métodos	16
2.1 Áreas de estudo.....	17
2.1.1 A colônia reprodutiva de Rio Claro.....	17
2.1.2 Populações estudadas quanto à distribuição da diversidade genética.....	18
2.2 Estudo de maternidade múltipla.....	19
2.2.1 Coleta de dados ecológicos para o estudo de maternidade múltipla.....	19
2.2.2 Coleta de amostras para o estudo genético de maternidade múltipla.....	20
2.2.3 Sexagem molecular.....	21
2.2.4 Amplificação dos locos de microssatélites.....	22
2.2.5 Análise dos genótipos dos locos de microssatélite para evidenciar maternidade múltipla.....	23
2.3 Estudo da colonização do Brasil por <i>Bubulcus ibis</i>	25
2.3.1 Coleta de material biológico.....	25
2.3.2 Extração do DNA genômico.....	26

2.3.3 Sequenciamento do DNAMit.....	26
2.3.4 Análise dos dados de DNAMit.....	28
Capítulo 3. Resultados.....	30
3.1 Parâmetros reprodutivos em <i>Bubulcus ibis</i>	31
3.2 Detecção de maternidade múltipla em ninhos de <i>Bubulcus ibis</i>	31
3.2.1 Temporada reprodutiva de 2010.....	32
3.2.2 Temporada reprodutiva de 2011.....	36
3.3 Testes para detecção de variação em genes do DNAMit.....	42
3.4 Distribuição e estruturação da diversidade genética no Brasil.....	42
Capítulo 4. Discussão.....	49
4.1 Parâmetros reprodutivos em <i>Bubulcus ibis</i>	50
4.2 Maternidade múltipla em <i>Bubulcus íbis</i>	52
4.2.1 Parasitismo de ninho intraespecífico em <i>Bubulcus ibis</i> , revelado pela metodologia genética.....	56
4.3 Distribuição e estruturação da diversidade genética no Brasil.....	59
Conclusões.....	62
Referências.....	64
Apêndices.....	74

APÊNDICES

APÊNDICE A - Genótipos em seis locos de microssatélites das amostras de DNA extraídas do sangue coletado de ambos os adultos (Macho – M e fêmea – F) nos 30 ninhos de <i>Bubulcus ibis</i> analisados no presente estudo, na colônia de Rio Claro, na temporada reprodutiva de 2011.....	75
---	----

Capítulo 1

Introdução

1. A garça-vaqueira, *Bubulcus ibis*

A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*) (Fig. 1) é uma espécie pertencente à família Ardeidae (ordem Pelecaniiformes). A espécie foi denominada inicialmente *Ardea ibis* (Linnaeus 1758), mas atualmente é reconhecida pela *American Ornithologists' Union* (1983) como *Bubulcus ibis* (Linnaeus). Foi anteriormente incluída no gênero *Egretta* (ex. PAYNE, 1979) e essa classificação estava baseada principalmente em caracteres morfométricos. Dados de genética molecular não deram suporte à relação filogenética próxima entre *Bubulcus* e *Egretta* e apontaram para uma maior relação com *Ardea* (SHELDON, 1987; SHELDON; MCCRACKEN; STUEBING, 1995; MCCRACKEN; SHELDON, 1998). São reconhecidas atualmente três subespécies, distinguíveis pela coloração da plumagem reprodutiva e porque ocupam regiões geográficas distintas: 1. *Bubulcus ibis ibis* (Linnaeus 1758) - África e Madagascar, sul da Europa até o Mar Cáspio e continente americano; 2. *B. i. coromanda* (Boddaert 1783) – do sul e leste asiático até a Austrália, Nova Zelândia e sul do Japão; e 3. *B. i. seychellarum* (Salomonsen 1934) – Ilhas Seychelles, no Oceano Índico leste. Diferentemente das outras espécies de garças da família Ardeidae, essa espécie possui várias adaptações relacionadas a hábitos não aquáticos, se associando a animais pastadores durante seu forrageio (SIEGFRIED, 1978).



Figura 1. Adulto de *Bubulcus ibis* na colônia reprodutiva de Rio Claro, SP.

1.1. Reprodução e aspectos do comportamento reprodutivo

Estudos gerais a respeito da biologia reprodutiva da espécie são numerosos e foram desenvolvidos em populações de diversas regiões (TELFAIR; RAIMOND, 2006). A época da temporada reprodutiva de *B. ibis* varia segundo a disponibilidade alimentar (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Nos trópicos, a reprodução geralmente se inicia durante ou imediatamente após a estação chuvosa, quando as pastagens começam a secar (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). No único estudo mais detalhado sobre a biologia reprodutiva da espécie no Brasil, foi reportado que o início do ciclo reprodutivo se dá entre setembro-outubro no estado do Rio Grande do Sul (PETRY; FONSECA, 2005). Um estudo com enfoque genético da reprodução nessa espécie não foi ainda desenvolvido.

A reprodução se dá em colônias formadas por dezenas e até milhares de ninhos, próximos uns aos outros (Fig. 2). A atividade reprodutiva na colônia se inicia quando pequenos grupos de machos se juntam para atrair fêmeas, fazendo exhibições diversas com *displays* e vocalizações, ocasião em que cada um reivindica um território para si. As fêmeas são atraídas para os territórios dos machos, passam um tempo próximas aos machos e, nesse período, adotam postura característica, com o pescoço estendido e crista parcialmente eriçada. Após persistirem por algumas horas, o vínculo se forma e o casal se utiliza de diversas exhibições para reforçar o vínculo formado. As cópulas se iniciam antes ou junto do início da construção do ninho; o movimento inicial é do macho, seguido pela fêmea; sendo que as cópulas ocorrem no ninho ou próximas dele (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

Ambos os sexos participam da construção do ninho, da incubação dos ovos (com troca de uma a quatro vezes por dia) e do cuidado dos filhotes, com investimento uniforme do tempo de ambos (TELFAIR, 1983). Os filhotes são guardados até os dez dias de idade, sombreados e alimentados; sendo o sucesso reprodutivo geralmente bastante alto e variando de 15 a 94% (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). No Rio Grande do Sul, foi observado sucesso reprodutivo médio de 1,07 jovens/ninho (PETRY; FONSECA, 2005).



Figura 2. Ninhos de *Bubulcus ibis* dentro de colônia reprodutiva em Rio Claro, SP.

Ocorrência de mais de uma fêmea ovipositando em um mesmo ninho já foi registrada na espécie. Alguns comportamentos podem explicar a oviposição de mais de uma fêmea em um único ninho: o parasitismo de ninho intraespecífico (PNI), a poligamia e a tomada de ninho. O parasitismo de ninho é uma estratégia conhecida nas aves em geral (ANDERSSON, 1984). 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, sendo este dado pela fêmea “parasitada” (ZINK, 2000). A poligamia ocorre quando um macho copula com mais de uma fêmea e o cuidado da prole pode variar de acordo com a espécie e o tipo de poligamia. O macho pode copular com várias fêmeas e não participar do cuidado com a prole, em nenhuma fase do ciclo reprodutivo. Em outra condição as fêmeas que copularam com o macho podem ovipositar em um único ninho e o macho sozinho incuba os ovos e cuida dos filhotes. E

por fim ocorre ainda a cópula com diversas fêmeas e nesse caso o cuidado com a prole é feito por fêmeas e macho em um único ninho. Casos ocasionais de poligamia têm sido registrados em espécies de aves que são normalmente monogâmicas (FORD, 1983). A tomada de ninho ocorre quando um determinado casal de aves tem controle sobre um ninho e faz a oviposição de seus ovos, mas por algum motivo um segundo casal passa a ocupar o ninho e mantém os ovos pré-existentes juntamente com sua própria ninhada; esse comportamento é pouco estudado, mas que já foi registrado para algumas espécies (ROBERTSON, 1998; WALDECK; ANDERSSON, 2006).

Dentre os três comportamentos, o PNI tem sido mais estudado e sua averiguação pode ser realizada pela observação ecológica/comportamental e por uma abordagem genética. De acordo com Telfair (1983), ovos colocados num mesmo ninho em intervalos menores do que um dia ou em intervalos maiores do que quatro dias são evidências de PNI na garça vaqueira e envolvem a participação de mais de uma fêmea. Outro sinal de PNI é o aparecimento de ninhadas com tamanhos anormais. Critérios como esses são utilizados como indicadores de PNI em estudos nas aves em geral, porém esses métodos podem subestimar ou superestimar a real frequência de PNI (YOM-TOV, 1980, 2001; ÅDAHL et al., 2004; GRØNSTØL; BLOMQVIST; WAGNER, 2006; LYON; EADIE, 2008). Pela abordagem genética pode-se comprovar que ninhegos de um mesmo ninho são produtos de diferentes fêmeas. Essa averiguação pode ser realizada por diferentes abordagens. Uma opção está baseada na obtenção do DNA das diferentes fêmeas que ovipositaram em um mesmo ninho e na comparação entre os genótipos destas fêmeas para demonstrar se são diferentes ou não. Uma forma de se conseguir o DNA da fêmea que ovipositou é pelo uso do *swabbing* da casca do ovo que contém material biológico da fêmea que o ovipositou (SCHMALTZ et al., 2006; MARTÍN-GÁLVEZ et al., 2011). Outra abordagem está baseada na amostragem dos filhotes de um mesmo ninho e na utilização de métodos estatísticos que determinam o vínculo genético entre esses ninhegos (MIÑO et al., 2011). O esperado no caso de PNI é que os filhotes de fêmeas diferentes sejam categorizados como não-relacionados entre si e não como irmãos completos.

Evidências de PNI em algumas espécies de garças: *Egretta rufescens* (ROHWER; FREEMAN, 1989), *Ardea purpurea* e *Ardeola ralloides* (GONZÁLEZ-MARTÍN; RUIZ, 1996) foram descritas baseando-se em observações de padrões de postura ou na sequência irregular de eclosão, assim como na detecção de ninhadas com

tamanho aumentado. Na garça-vaqueira, a detecção de sequência irregular de eclosão e de ninhadas aumentadas foram também consideradas como evidência de PNI em um estudo de 28 anos, em uma mesma colônia, realizado no Texas (EUA) (TELFAIR; BISTER, 2004).

Para ser detectada, a poligamia requer observação direta em ambiente natural, com muitas horas de trabalho no campo. A averiguação desse comportamento é ainda mais dificultada em espécies nas quais não existe dimorfismo sexual, quando não é possível distinguir entre machos e fêmeas (HUNT, 1980). Em *B. ibis* dois casos de um tipo de poligamia denominada biginia foram reportados no Japão (FUJIOKA, 1986). A biginia reportada foi caracterizada por um trio formado por um macho e duas fêmeas, com todos os indivíduos participando do cuidado da prole, desde a construção do ninho até os filhotes deixarem o ninho (FUJIOKA, 1986).

Estudos baseados em observações e que reportam ocorrência de maternidade múltipla (MM) em espécies de garças são ainda escassos. A razão dessa lacuna se deve ao requisito de um investimento muito alto no trabalho de campo. Ovos e filhotes resultantes de um evento de MM são muito difíceis de serem identificados nessas observações e, uma vez gerados por uma fêmea estranha, não podem ser distinguidos morfológicamente dos ovos e filhos de um determinado casal de aves. Apesar das dificuldades associadas ao estudo de MM na natureza, alguns estudos baseados no uso de 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 (EADIE; SHERMAN; SEMEL, 1998; LYON; EADIE, 2008). Mais de 230 espécies de aves mostram esse tipo de comportamento (EADIE; SHERMAN; SEMEL, 1998; YOM-TOV, 2001), sendo especialmente comum nos Anseriiformes (SAYLER, 1992) e nos Ciconiiformes (ROHWER; FREEMAN, 1989; YOM-TOV, 2001).

1.2. Invasão e colonização do Brasil

Postula-se que a área de distribuição ancestral de *B. ibis* restringia-se aos trópicos do Velho Mundo, África central e sul e oeste Asiático, fazendo parte nestas áreas da biota nativa (BROWN; URBAN; NEWMAN, 1982). A grande expansão da

espécie pelo globo se deu principalmente no início de século XX e foi multidirecional, partindo do Equador para regiões situadas em latitudes maiores e menores. Nos últimos 50 anos foi observado um aumento significativo no número de registros de populações em toda a área de distribuição da espécie (KUSHLAN; HAFNER, 2000).

É consenso que a origem da *B. ibis* do continente americano é a África. Acredita-se que as aves fizeram travessias oceânicas por migrações transatlânticas. Os primeiros registros na América do Sul foram realizados entre 1877-1882 no Suriname (Guiana Holandesa) (PALMER, 1962) e subsequentemente em 1911-1912 na Guiana Inglesa (WETMORE, 1963). Após estes registros a espécie mostrou um ritmo constante de expansão e hoje é encontrada em todo o continente (ver Figura 3 para a distribuição da espécie na América do Sul). Segundo Sick (1965), a espécie foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1964, na Ilha de Marajó, associada aos búfalos e nidificando em bom número junto a outras espécies de garças. Em 1970 já era avistada por toda a região amazônica e, a partir de então, passou a ser registrada em vários estados. Em 1973 foi reportada reprodução da espécie no estado do Rio Grande do Sul (BELTON, 1974). Como Sick (1997) predisse, atualmente a espécie é encontrada em todo o território brasileiro, nidificando em boa parte de sua área de ocorrência (Fig. 3).

A expansão e a ampla ocupação geográfica da espécie está relacionada à criação antrópica de habitats artificiais, favorecida pelo desmatamento intensivo e pela implementação de atividades agrícolas, em especial das atividades de pecuária. Outros fatores intrínsecos da própria espécie contribuíram para essa grande expansão: sua alta capacidade dispersora, observada pelo movimento de longa escala e distância, muitas vezes sem direção, dos jovens após deixarem as colônias reprodutivas (HANCOCK; KUSHLAN, 1984) e seu alto potencial reprodutivo, podendo começar a procriar já no primeiro ano de vida e podendo fazer duas posturas por estação (SICK, 1997).

A espécie quando avança para novas áreas é atraída por colônias já estabelecidas, formadas por espécies nativas de ardeídeos (BELZER; LOMBARDI, 1989), especialmente *Egretta thula*, *Egretta caerulea* e *Egretta tricolor*. As colônias podem ser estabelecidas em áreas com água doce, salobra ou salgada, em áreas de savana e em pântanos; geralmente em locais protegidos, sendo os ninhos construídos em arbustos e árvores sobre a água ou cercado por ela (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). É uma espécie altamente colonial, reproduzindo-se em colônias mistas e nidificando junto

com centenas e até milhares de pares reprodutivos de outras espécies, incluindo outras garças, cegonhas, ibises, anhingas e biguás (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).



Figura 3. Mapa da distribuição de *Bubulcus ibis* na América do Sul. No Brasil a espécie é encontrada e se reproduz em todo território nacional. Mapa extraído de KUSHLAN e HANCOCK (2005).

2. A genética nos estudos de espécies invasoras

Durante a colonização de uma área, uma espécie vai se adaptando aos poucos ao novo ambiente, sem afetar negativamente a biota ocupada. Por outro lado, quando a colonização ocorre por uma espécie invasora, ela pode afetar negativamente a biota nativa através da predação, parasitismo, exploração de recursos e difusão de doenças, resultando em perda de biodiversidade e alteração no funcionamento de ecossistemas (PIMENTEL; ZUNIGA; MORRISON, 2005; STRAYER et al., 2006; FICETOLA; BONIN; MIAUD, 2008). Poucos estudos foram realizados com *B. ibis* no Brasil e não

há muitos dados para avaliar os efeitos negativos que a espécie possa vir a causar na biota nativa. O comportamento da espécie nas ilhas oceânicas pode ser similar ao que acontece atualmente no Arquipélago Fernando de Noronha, onde casais reprodutivos deslocam espécies nativas de aves marinhas de suas colônias reprodutivas (BARBOSA-FILHO et al., 2009). Neste arquipélago *B. ibis* tem também predado o mabuia de Noronha (*Euprepis atlanticus*), espécie de lagarto endêmico dessas ilhas (SILVA-Jr; PÉRES-Jr; SAZIMA, 2004). Na Califórnia (EUA) a espécie foi observada predando filhotes de *Agelaius tricolor* de menos de cinco dias de idade, sendo responsável por falhas reprodutivas de colônias inteiras, com mais de 60.000 ninhos. Provavelmente a presença de *B. ibis* explica uma redução de 35% do censo da espécie *Agelaius tricolor* no estado americano (MEESE, 2012). *B. ibis* pode também ter impactos negativos na flora nativa, tendo um impacto deletério na vegetação na qual os ninhos são construídos (ARENDRT; ARENDRT, 1988).

Estudos de espécies invasoras têm proporcionado excelentes oportunidades para o desenvolvimento da pesquisa básica de biologia das populações e da evolução em curto prazo das espécies. Por ex. Huey et al. (2000) demonstraram um cline no caractere comprimento de asa em *Drosophila subobscura* na América do Norte que mimetiza o padrão observado na Europa onde a espécie é nativa.

Outro enfoque que o estudo de espécies invasoras tem ajudado a esclarecer diz respeito ao efeito da endogamia nas populações pequenas e a importância das adaptações locais. A colonização por espécies invasoras normalmente envolve um número pequeno de fundadores, levando a população colonizadora a ter uma menor diversidade genética do que a população de origem. Esta redução pode ter consequências deletérias, como a depressão pela endogamia que limita o crescimento da população. Outra limitação diz respeito à habilidade da população introduzida em adaptar-se ao novo ambiente, pois sua diversidade genética pode ter sido reduzida. Em certas situações, entretanto, as populações invasoras podem apresentar maior diversidade porque na área colonizada ocorre uma mistura de várias populações que na área nativa estão estruturadas, acabando por resultar numa maior diversidade genética na população colonizada do que na área nativa. Durante o processo de colonização, espécies introduzidas podem muitas vezes substituir as populações nativas. Seja por terem evoluído em ambientes mais competitivos e serem, portanto, intrinsecamente melhores competidoras; ou por não terem inimigos e/ou predadores no novo ambiente,

dispondo de mais recursos para o seu crescimento e reprodução (ALLENDORF; LUIKART, 2006).

O DNA mitocondrial (DNAMit) tem sido utilizado em vários estudos de espécies invasoras/exóticas. Dados de DNAMit podem ajudar a identificar mudanças históricas nos padrões de colonização entre períodos glaciais e a determinar expansões e retrações populacionais nas histórias de populações (BOHLEN et al., 2006; ŠEDIVÁ et al., 2008). Torres-Leguizamón et al. (2011), utilizando o marcador molecular citocromo b determinaram a origem de *Tecia solanivora* (Lepidoptera), uma lagarta da América Central que é uma espécie invasora e que ataca os tubérculos de batata. Estes autores observaram que populações na América do Sul haviam se estabelecido possivelmente por uma invasão que ocorreu em uma progressão tipo *stepwise*, na qual o país invadido mais recentemente se torna fonte de indivíduos para invasões subsequentes. Populações de *Pseudorasbora parva*, um peixe originário da Ásia introduzido na Europa nos anos 1960, foram encontradas em pelo menos 32 países fora de sua área nativa (SIMON et al., 2011). Esses autores baseando-se em análises do citocromo b encontraram suporte para a hipótese de que a colonização europeia por este peixe foi iniciada pela sua introdução em um único local ou numa pequena área demográfica, com um subsequente complexo padrão de dispersão incluindo tanto migrações de longa distância quanto dispersão do tipo *stepping-stone*. De acordo com esses autores, essa invasão foi precedida de, ou foi associada a, uma mistura de populações-fonte, geneticamente diversas, que pode ter aumentado seu potencial invasivo. Rollins et al. (2011), baseados em dados de sequências de DNAMit esclareceram os caminhos da invasão de *Sturnus vulgaris* na Austrália ocidental e discutiram a utilidade desta informação para prover ferramentas valiosas para o manejo de espécies invasoras. De acordo com esses autores, os marcadores mitocondriais podem ser úteis para monitorar dispersão em populações manejadas, para a identificação de novos indivíduos (migrantes) vindos de outras áreas e sendo introduzidos na área invadida, e para ajudar a prever futuras expansões populacionais em uma espécie invasiva problemática.

Objetivos

Objetivos

1. Geral

Utilizar a genética molecular e a observação comportamental/ecológica para averiguar se há ocorrência de maternidade múltipla na espécie *Bubulcus ibis* e caracterizar geneticamente a população brasileira da espécie pela diversidade do DNAMit.

2. Específicos

- a) Averiguar se há ocorrência e quantificar a frequência de maternidade múltipla em uma colônia localizada no Município de Rio Claro (SP) a partir do estudo genético do DNA coletados nas cascas dos ovos de um mesmo ninho, baseando-se na comparação entre os genótipos maternos determinados em locos de microssatélites.
- b) Avaliar como a diversidade genética está distribuída no Brasil, utilizando-se amostras de sete populações brasileiras, posicionadas em latitudes diversas, assim como determinar o nível de diferenciação genética entre essas populações.

Justificativa

Justificativa

Espécies da família Ardeidae apresentam diferentes graus de sociabilidade nos diversos aspectos da sua vida gregária durante: o forrageio (CALDWELL, 1981; BATTLEY et al., 2003), o deslocamento (CUSTER; OSBORN, 1978; SMITH, 1995) e também durante a sua reprodução. Essa última é geralmente realizada em colônias ou ninhais, sendo que, muitas vezes os ninhos acabam por serem construídos muito próximos uns dos outros (BURGER, 1978; BURGER; GOCHFELD, 1993). Essa condição favorece a ocorrência de maternidade múltipla nos ninhos. Estudos mais aprofundados sobre frequência e/ou ocorrência da participação de mais de uma fêmea na oviposição de uma ninhada e sobre os comportamentos reprodutivos que o explicam são escassos em ardeídeos em geral, principalmente do ponto de vista genético. Ao nosso conhecimento, até o momento nenhum estudo objetivando o estudo de maternidade múltipla na subespécie de *B. ibis* foi realizado.

A primeira proposta desse trabalho é levantar dados genéticos em uma colônia reprodutiva em Rio Claro-SP para se determinar se há ocorrência de MM na espécie *B. ibis* e em que frequência ocorre. Critérios de observação ecológica serão usados para selecionar ninhos suspeitos onde mais de uma fêmea pode contribuir em um mesmo ninho e para se definir um grupo de ninhos onde a abordagem genética desenvolvida no presente trabalho será testada. A hipótese levantada é a de que observações ecológicas de MM serão confirmadas pela abordagem genética utilizada.

A segunda proposta visa contribuir para o esclarecimento de como a garça-vaqueira colonizou as diversas regiões brasileiras. Foram amostradas sete populações brasileiras, localizadas mais próximas ou mais distantes do suposto ponto de entrada (Região Norte) da espécie no país. Essas sete populações brasileiras serão avaliadas quanto à distribuição da diversidade genética do DNAMit. Segundo os primeiros registros na América do Sul (PALMER, 1962; WETMORE, 1963) e no Brasil (SICK, 1965), *B. ibis* entrou na América do Sul e no Brasil pelo norte do continente. Desta forma, a hipótese é de as populações brasileiras localizadas mais próximas do ponto de entrada, ou seja, no Norte e no Nordeste, apresentarão maior diversidade genética do que as populações localizadas no Sudeste e no Sul do país, caso essas últimas sejam derivadas das populações localizadas mais ao norte, e supondo que a dispersão ocorreu

num padrão *stepping stone*. Objetiva-se com esse passo iniciar um estudo para esclarecer o processo de colonização e expansão da espécie no Brasil.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 Áreas de estudo

2.1.1 A colônia reprodutiva de Rio Claro

No Município de Rio Claro, Estado de São Paulo, encontra-se uma colônia reprodutiva na qual a garça-vaqueira nidifica junto a outras espécies de aves, principalmente outros ardeídeos. A colônia reprodutiva localiza-se no Parque Municipal Lago Azul (S 22°30' / W 47°35'), o qual abriga uma área de aproximadamente 130.000 m² e contém um lago que ocupa uma área de aproximadamente 35.600 m². No interior do lago existe uma ilha de aproximadamente 50 metros de diâmetro, a qual é utilizada pelas aves para a nidificação (Figs. 4 e 5). A ilha contém diversas árvores, principalmente de duas espécies, que são utilizadas pelas aves como suporte para seus ninhos, a amoreira-negra (*Morus nigra*) e o jambolão (*Syzygium cumini*).



Figura 4. Foto aérea do Parque Lago Azul no município de Rio Claro (SP). Ressaltado com círculo amarela a ilha na qual se encontra a colônia reprodutiva na qual o estudo foi realizado. Fonte: earth.google.com.



Figura 5. Foto aproximada da colônia reprodutiva de Rio Claro, na qual foi realizado o estudo de maternidade múltipla em *Bubulcus ibis*.

Quatro espécies de ardeídeos foram identificadas nidificando na ilha; o savacu (*Nitycorax nitycorax*), a garça-branca-pequena (*Egretta thula*), a garça-branca-grande (*Ardea alba*) e a garça-vaqueira. A garça-vaqueira é a espécie mais abundante, com cerca de 1.000 ninhos por estação reprodutiva. A biguatinga (*Anhinga anhinga*) também nidifica no local, em pequenos números. A ocorrência de colônias reprodutivas mistas é bastante comum nos ardeídeos (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

2.1.2 Populações estudadas quanto à distribuição da diversidade genética

Para a avaliação da distribuição da diversidade genética foram utilizadas amostras de sete populações brasileiras, localizadas nos estados do Amazonas (AM, S 03°09' / O 59°54'), Pará (PA, S 00°30' / O 49°13'), Rio Grande do Norte (RN, S 5°37' / O 36°52'), Pernambuco (PE, S 8°52' / O 36°28'), Minas Gerais (MG, S 20°59' / O 46°06'), São Paulo (SP, S 22°30' / O 47°35') e Rio Grande do Sul (RS, S 30°01' / O 51°31').

2.2 Estudo de maternidade múltipla

As coletas dos dados foram realizadas na colônia reprodutiva de Rio Claro (item 2.1.1) em duas estações reprodutivas, nos anos de 2010 e 2011. Cada temporada reprodutiva se estende do início de outubro até o final de dezembro de cada ano. Foram monitorados um total de 85 ninhos na temporada de 2010 e 250 ninhos na temporada de 2011.

2.2.1 Coleta de dados ecológicos para o estudo de maternidade múltipla

Observações ecológicas foram utilizadas para a escolha de ninhos nos quais houve maior probabilidade da ocorrência de MM para serem utilizados na abordagem genética. Foi monitorada a postura de ovos em cada ninho identificado com um número em uma placa numerada. O ninho foi monitorado diariamente, no período da manhã (das 08:00 as 11:00 horas) e novamente no período da tarde (das 13:00 as 16:00 horas) até a eclosão dos ovos ou até o ninhos serem perdidos (ovos ou ninhos inteiros perdidos). Cada ovo recém ovipositado teve material biológico coletado por *swabbing* (conforme protocolo descrito no item seguinte) e recebeu uma marcação numérica com tinta a base de corante natural para identificação do mesmo (Fig. 6).



Figura 6. Exemplo de um ninho de *Bubulcus ibis*, que foi monitorado neste estudo. Observa-se a placa numerada para identificação do ninho e marcação numérica com tinta a base de corante natural para identificação dos ovos.

Como o registro da ocorrência de poligamia requer horas de observação de ninhos focais, optou-se por utilizar critérios que são usados como base para se evidenciar o PNI, os quais não requerem um esforço tão grande de observação no campo. Pela metodologia ecológica os critérios que podem ser utilizados para sugerir a ocorrência de PNI são: i) se as ninhadas apresentam tamanho anormal de ovos (YOM-TOV, 1980); ii) se a sequência de oviposição é irregular, ou seja, quando ovos aparecem no ninho em intervalos < 1 ou > 4 dias do ovo anterior (YOM-TOV, 1980; BROWN, 1984); iii) se há aparição de ovos extras depois da postura ter sido completada (YOM-TOV, 1980; FREDERICK; SHIELDS, 1986); iv) ou se a sequência de eclosão é irregular (YOM-TOV, 1980; EARLÉ, 1986). Os três primeiros critérios foram considerados no presente estudo como indicativo de PNI. Embora os ninhos tenham sido monitorados até a eclosão dos ovos, o quarto critério não foi utilizado porque houve uma frequente perda de ovos e ninhos na fase de incubação. Após a seleção dos ninhos, foram analisados pela metodologia genética 18 ninhos na temporada de 2010 e 30 ninhos na temporada de 2011, totalizando 55 e 114 *swabs* analisados respectivamente.

2.2.2 Coleta de amostras para o estudo genético de maternidade múltipla

A coleta do *swabb* é um método não-invasivo que permite obter DNA materno (SCHMALTZ et al., 2006). Ao ovipositar, a ave deixa sangue na casca do ovo, o qual foi retirado da superfície esfregando um algodão embebido em solução salina. A ponta do *swabb* foi cortada e estocada em tubos eppendorf em freezer (Fig. 7). A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de *swabb* contendo DNA materno. As amostras foram extraídas utilizando-se o kit de extração DNesay Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Dusseldorf, Alemanha), seguindo as alterações propostas por Schmaltz et al. (2006): 1) Durante o processo de digestão com proteinase K, as amostras são vortexadas quatro vezes, em intervalos de uma hora cada; 2) A solução resultante da digestão é colocada na coluna de centrifugação desprezando-se o cotonete do *swabb*; e 3) É adicionado 105 μ l da solução de eluição E na coluna e deixado em banho-maria por 10 min, a 55°C, antes da centrifugação final.



Figura 7. Coleta por *swabbing* do material biológico contendo o DNA materno na casca do ovo de *Bubulcus ibis*.

2.2.3 Sexagem molecular

Segundo Martín-Gálvez et al. (2011), que testou a metodologia do *swabb* da casca do ovo para a obtenção de DNA materno para uso em 23 espécies de aves, existe a possibilidade de se amostrar DNA paterno também. Essa possibilidade aumenta com o tempo decorrido desde a postura do ovo até a coleta do *swabb*. Quanto menor o tempo, menor a probabilidade de se amostrar o DNA paterno. Para minimizar a possibilidade de amostrar o DNA paterno ao invés do materno, os *swabbs* foram realizados nos ovos no dia em que os mesmos foram ovipositados. Além disto, todas as amostras foram sexadas pelo gene CHD (GRIFFITHS et al., 1998) para confirmar que trabalhou-se com DNA materno. Caso alguma amostra tenha sido sexada como macho, a sexagem foi repetida uma segunda vez para confirmação e se confirmado o sexo masculino a amostra foi eliminada das análises posteriores.

2.2.4 Amplificação dos locos de microssatélites

A tabela 1 detalha os locos de microssatélites utilizados nesse estudo. Esses marcadores foram escolhidos porque já foram desenvolvidos e padronizados pela Mestre Emeline Boni Campanini nessa espécie (CAMPANINI et al., 2012). Mais um loco heterólogo, Ah536, desenvolvido para *Ardea herodias* (MCGUIRE; NOOR, 2002), espécie da mesma família de *B. ibis*, foi também utilizado.

Os marcadores foram amplificados por PCR segundo os protocolos específicos para cada um deles. Tipicamente, uma reação de PCR envolve: 10 mM Tris (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM Mg²⁺Cl₂, 0,25 mM dNTPs, 1 U *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha), 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*) e 120 ng de DNA genômico como molde. Um ciclo de PCR consiste do seguinte: desnaturação a 96°C por 5 min, 20 ciclos a 96°C por 45 s, 30 s à temperatura de hibridação de cada iniciador, e extensão de 90 s a 72°C; 10 ciclos a 96°C por 45 s, 30 s à temperatura de hibridação - 0,5°C por ciclo (*touchdown*), e extensão de 90 s a 72°C; 10 ciclos a 96°C por 45 s, 30 s a 55°C, 53°C ou 50°C (dependendo do iniciador), e extensão de 90 s a 72°C. Todas as reações foram terminadas com extensão final de 10 min a 72°C.

Tabela 1. Locos de microssatélites com oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados no presente trabalho.

Loco	Motivo de Repetição	Oligonucleotídeos iniciadores (5'- 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Tm (°C)
Bi01	(GT) ₁₁	F - GAG CCC AGT GAA TTG TTT AG	244	57
		R - GAG AGT GGC AGG TGT ATA GG		
Bi15	(TTCC) ₂ (AG) ₄	F - GGG CTT GTA TGA TGA ACT TT	184	56
		R - TTT CTC CAC TCT AGT TGC TGT		
Bi18	(TA) ₈ (CA) ₆	F - CAT GAC CAT GTT CCT TCG	190	57
		R - TAG AGC ATT AGC TAA CGT AAG		

Bi 20	(TGC) ₅	F - TGG ATT AGG TCC TGT TAT TC R - ACA GTA AGT TCG GCT TCT G	230	56
Bi26	(AG) ₉	F - GCT TCA GAC CAC CCG TG R - CAC CGG TTA GCA AGG AAT	270	59
Bi30	(GT) ₇	F - ACC TTA GCA AAC CCC CTC R - GAG CGG GAT GAG CAT CA	208	60
Ah536	(AC) ₁₄	F - CCTGGTTTAGATCACATGATGGAG R - CTGGGCAACCTGTTCCATCT	130	58

As reações foram realizadas em termociclador e os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. A análise dos genótipos para cada indivíduo foi realizada após eletroforese capilar, utilizando-se o sistema MegaBACE™1000 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, Estados Unidos da América). Os eletroferogramas foram analisados pelo *software* Fragment Profiler v 2.2 usando MegaBACE™ ET Size Standard tendo EtROX (GE Healthcare) como marcador de padrão interno de corrida.

2.2.5 Análise dos genótipos dos locos de microssatélite para evidenciar maternidade múltipla

Os ninhos que foram analisados pelo método genético foram selecionados do total de ninhos monitorados pelo critério de observação comportamental. Para estes ninhos, após a sexagem e eliminação de possíveis amostras contendo o DNA paterno ao invés do materno, os DNAs coletados nas cascas dos ovos foram genotipados nos locos de microssatélites. Para a análise dos dados foi adotado o critério de que genótipos diferentes em pelo menos dois locos entre as amostras de DNA materno coletados nos *swabbs* dos ovos do mesmo ninho como evidencia de ocorrência de MM. Esse critério supõe que o DNA do *swabb* é o da fêmea que ovipositou e se o genótipo da fêmea que ovipositou um ovo de um ninho é diferente da fêmea que ovipositou outro ovo do

mesmo ninho, ocorreu MM. Foi calculada a probabilidade de identidade para o conjunto de locos utilizados, que prove uma estimativa da probabilidade média de que dois indivíduos aleatórios tirados de uma mesma população terão o mesmo genótipo multilocos, no programa GeneAlex v.6 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Para esse cálculo foram utilizados somente genótipos de diferentes fêmeas para cada um dos ninhos estudados.

Objetivando-se verificar se existe alguma relação de parentesco entre fêmeas que ovipositaram em um mesmo ninho realizou-se uma análise para se determinar o mais provável vínculo de relacionamento entre essas fêmeas. 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 (MIÑO, 2010). 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). Segundo Csilléry et al. (2006) que avaliou o desempenho de vários estimadores de parentesco em populações naturais, o estimador de Queller e Goodnight (1989) tem seu desempenho melhor caracterizado. Primeiramente, esse estimador foi utilizado para calcular os valores de r para os pares de fêmeas com genótipos diferentes para cada um dos ninhos nos quais mais de uma fêmea ovipositou ovos. Em seguida, foram avaliados os valores de r e, com base neles, empregou-se a metodologia proposta por Blouin et al. (1996). Essa metodologia 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 de simulações das frequências alélicas de uma população ideal (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 (irmãos completos, meio-irmão e não relacionados) (BLOUIN et al., 1996). Segundo esse método, o valor de corte para se classificar um par de indivíduos entre as categorias não relacionados/relacionados é de 0,175 (média entre 0 e 0,25). O

valor de 0,175 foi utilizado como valor de corte para se distinguir entre pares de fêmeas não relacionadas e de fêmeas aparentadas.

Para a coleta de 2010 foram comparados os genótipos dos *swabs* coletados nos ovos de um mesmo ninho para se evidenciar a ocorrência de MM. A coleta de 2011 foi realizada em conjunto com a mestrandia Elaine Dantas, a qual coletou amostras de sangue dos adultos (parentais) nos ninhos estudados. A análise dos dados relativos a 2011 foi então realizada de forma diferente, ainda adotando-se o mesmo critério acima descrito para distinção de ovos ovipositados por duas fêmeas distintas. Os genótipos multilocus identificados nos *swabs* coletados nos ovos de um mesmo ninho foram comparados com os genótipos dos adultos (macho e fêmea – identificados por Elaine Dantas) para identificar dentre os ovos quais foram ovipositados pela fêmea do casal (fêmea “oficial”) e por exclusão os ovos que foram ovipositados por outra(s) fêmea(s), evidenciando-se assim a ocorrência de MM. A tabela contendo os genótipos dos adultos, utilizados para as comparações realizadas, encontra-se na sessão apêndices (Apêndice A).

Para a coleta de 2010, genótipos não coincidentes em um mesmo ninho foram repetidos três vezes para confirmação se os mesmos representavam uma ou mais de uma fêmea. Para a coleta de 2011, genótipos de uma segunda ou terceira fêmea, evidenciados por não serem coincidentes com o da fêmea “oficial”, identificada por Elaine Dantas, foram repetidos três vezes para confirmação.

2.3 Estudo da colonização do Brasil por *Bubulcus ibis*

2.3.1 Coleta de material biológico

Nas colônias acessadas para a coleta de material para a avaliação da distribuição da diversidade genética, foram coletadas um mínimo de 20 amostras (20 ninhegos) e/ou penas de muda reprodutiva dos adultos quando disponíveis no solo da colônia. Quando colônias reprodutivas ativas não foram encontradas, mas pousos foram, penas de muda dos adultos foram coletadas e o pouso foi considerado como uma unidade populacional amostrada. Amostras de sangue, de entre 0,2 ml e 0,2-0,4 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 96% (MERCK KGaA, Darmstadt, 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.

2.3.2 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído pelo método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (PCI) com adição de proteinase K, seguido de desidratação salina e precipitação alcoólica do DNA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para as amostras de sangue aproximadamente 20 μl de papa de hemácias foi colocado em microtubos de 2ml. Adicionou-se 300 μl de solução de extração (1XTNE: H₂O; Tris-HCl 50mM; NaCl 100mM; EDTA 6.3mM pH7.5) e 10U de Proteinase K. Em seguida, incubou-se a mistura a 56°C em banho-maria durante 12 horas. Após esse período, a extração de DNA realizou-se seguindo o protocolo PCI (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A extração do DNA de penas secas foi realizada seguindo-se protocolo de Miño e Del Lama (2009). A região do cálcio da pena, onde se encontram restos celulares do tecido sanguíneo foi picada com o auxílio de uma tesoura estéril. Este tecido foi colocado em microtubos de 2ml e foram adicionadas as mesmas quantidades dos reagentes como descrito acima para a extração do DNA das amostras de sangue. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por sete dias; a cada dia foram adicionadas 5U de Proteinase seguido de leve homogeneização em agitador orbital por 40 minutos. Decorrida uma semana de incubação a extração se deu pelo mesmo método descrito para as amostras de sangue acima. O DNA foi ressuspensionado em água destilada esterilizada e quantificado. Diluições do DNA estoque foram feitas a uma concentração de 40 ng/ μ para uso nas reações de PCR.

2.3.3 Sequenciamento do DNAmít

Antes de decidir qual região do DNAmít seria utilizada no trabalho, três regiões desse molécula foram amplificadas para 12 indivíduos provenientes das populações do RS (6 indivíduos) e de SP (6 indivíduos). Foram testadas as regiões do ND2, do

citocromo b e do Domínio I (DI) da região controladora. Os oligonucleotídeos iniciadores para as duas primeiras regiões foram descritos por Sorenson (1999) e para o DI foram descritos por Corrêa (2009). Os iniciadores são, respectivamente, os seguintes:

ND2: L5758 – 5' GGNGGNTGAATRGGNYTNAAYCARAC 3' $t_m=55^\circ\text{C}$

H6681 – 5' GGTATAGGGTGCCRATRTCTTTGTG 3' $t_m=57^\circ\text{C}$

Citocromo b: CITMYCF – 5' GCATCTCTCCTAGGCATCTGC 3' $t_m=51^\circ\text{C}$

CITMYCR – 5' GGGATTGAGCGTAGGATAGCG 3' $t_m=51^\circ\text{C}$

DI: Ardea L1 – 5' CGTCTGTATGCTCACGTCTTC 3' $t_m=60^\circ\text{C}$

Ardea L3 – 5' CACCTAACACAAAACACAAAC 3' $t_m=58^\circ\text{C}$

A região do DNAmít analisada nesse estudo foi a região do DI, considerada a mais variável dessa molécula. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os descritos por Corrêa (2009 – apresentados acima) e foram utilizados na amplificação dos fragmentos sequenciados.

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas para amplificação do DNAmít em um volume final de 12,5µl de reação, contendo aproximadamente 9,5mg/µl de DNA, 75mM Tris-HCl (pH 9), 50mM KCl, 20mM (NH₄)SO₄, 2mM MgCl₂, 0,25mM dNTPs, 10µM de cada iniciador e 1U Taq DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e H₂O. O programa utilizado na amplificação foi: 5 min a 94°C (desnaturação inicial); cinco ciclos de 20 s a 94°C, 20 s a temperatura de hibridização inicial (mais alta) e 20 s a 72°C; 21 ciclos de 20 s a 94°C, 20 s a temperatura de hibridização inicial menos 0.5°C por ciclo (“*touchdown*”) e 30 s a 72°C; 10 - 20 ciclos 20 s a 94°C, 20 s a temperatura de anelamento final (mais baixa) e 30 s a 72°C; 10 min a 72°C (extensão final); as temperaturas de hibridização iniciais utilizadas foram

diferentes para cada iniciador. Um microlitro do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para checar rendimento da reação de amplificação. Os produtos foram purificados e diretamente sequenciados utilizando Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer®) segundo instruções do fabricante. Os sequenciamentos foram realizados utilizando o sequenciador automático ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Estados Unidos da América).

2.3.4 Análise dos dados de DNAmIt

As sequências obtidas foram alinhadas, visualizadas e manualmente corrigidas utilizando os programas CodonCode Aligner 2.0.5 (CodonCode Corporation, Centerville, Estados Unidos da América) e BioEdit 7.0.9 (HALL, 1999). Todas as sequências foram manualmente alinhadas e tiveram seus tamanhos padronizados para a análise.

As diversidades haplotípica (h) nucleotídica (π) foram estimadas pelo programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) e comparadas entre as populações brasileiras. A diferenciação genética entre as populações foi investigada pela estimativa F_{st} e pela análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUARTO, 1992) realizadas também no programa Arlequin v.3.5.

A relação entre os haplótipos do DI foi inferida construindo-se uma rede de haplótipos utilizando-se o programa TCS v. 1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). Conexões ambíguas na rede (*loops*) foram resolvidas utilizando-se o conjunto hierárquico de diretrizes baseado em critérios da coalescência (CRANDALL; TEMPLETON, 1993).

Para se estudar o histórico demográfico das populações foi realizada a análise de *mismatch distribution* no programa Arlequin v.3.5. Esta análise determina a distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre os indivíduos, sendo esses valores plotados em um gráfico, cujos padrões das curvas permitem diferenciar populações que permaneceram estáveis daquelas que sofreram expansão ao longo do tempo, a partir de uma população fundadora (ROGERS; HARPENDING, 1992). A significância dos

desvios entre as curvas observadas e esperadas serão obtidos pela soma dos desvios dos quadrados (SSD) e pela estatística r (Raggedness).

A expansão populacional foi averiguada também pelos testes de neutralidade. Para essa abordagem, a região controladora estudada foi considerada neutra para a seleção natural e os desvios da neutralidade são indicativos de variação no tamanho populacional ao longo do tempo. Para análise de neutralidade foram realizados os testes de F_s proposto por Fu (1997), D de Tajima (TAJIMA, 1989) no programa Arlequin 3.5 e as estatísticas D^* e F^* de Fu & Li (FU; LI, 1993) e R_2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002) no programa DNAsp v.5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009), calculando-se a significância com análise de coalescência com número de réplicas igual a 10.000.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Parâmetros reprodutivos em *Bubulcus ibis*

A tabela 2 resume os dados dos parâmetros reprodutivos levantados durante as duas estações reprodutivas amostradas (2010 e 2011). O tamanho médio de ninhada foi de dois ovos. O intervalo médio de postura entre ovos foi de 2,42 dias. A incubação dos ovos durou em média 23 dias. A perda de ovos durante a fase de ovos foi de 53,5% e o sucesso de eclosão dos ovos foi de 46,5%.

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de *Bubulcus ibis* levantados na colônia reprodutiva do Parque Lago Azul, Rio Claro, SP, em duas estações reprodutivas.

Ano / Parâmetros reprodutivos	Tamanho médio da ninhada (ovos)	Intervalo médio de postura (dias)	Duração média da incubação (dias)	Perda de ovos (%)	Sucesso de eclosão (%)
2010 (N=85)	2,3 ± 0,6	2,1 ± 0,5	23,2 ± 1,0	47,1	52,9
2011 (N=275)	2,0 ± 1,1	2,6 ± 1,8	22,7 ± 1,4	59,9	40,1
Média	2,0 ± 1,0	2,4 ± 1,4	23,0 ± 1,2	53,5	46,5

3.2 Detecção de maternidade múltipla em ninhos de *Bubulcus ibis*

O material coletado nas duas temporadas reprodutivas foi analisado separadamente, pela natureza das amostras obtidas. Para a temporada de 2010 foram coletados somente *swabs* em ovos de um mesmo ninho. Já para a temporada de 2011, em virtude do trabalho da pesquisadora Elaine Dantas, foram disponibilizadas amostras dos adultos para os mesmos 30 ninhos analisados neste trabalho. Desta forma, foi possível comparar os genótipos identificados para as amostras dos *swabs* com os genótipos dos dois adultos (macho e fêmea) de um determinado ninho e identificar a postura de mais de uma fêmea em um mesmo ninho.

3.2.1 Temporada reprodutiva de 2010

Foram monitorados 85 ninhos da garça-vaqueira, contendo um total de 174 ovos. Utilizando-se os critérios de observação comportamental adotados foram detectados 18 ninhos com 20 ovos suspeitos de serem produtos de outra fêmea no ninho. As amostras de sangue coletadas nas cascas dos 55 ovos com *swab* nestes 18 ninhos tiveram seu DNA extraído e foram em seguida sexadas. Quatro dessas amostras de DNA (7,3%), sexadas como macho, foram eliminadas das análises subsequentes. Essa exclusão nos levou a eliminar dois ninhos que continham três ovos cada, reduzindo o número total de ninhos analisadas para 16. O ninho #12 foi mantido porque, mesmo após a exclusão do ovo que continha DNA do macho (último ovo da ninhada – ovo suspeito), depois da análise dos genótipos este continha um ovo fruto de MM (ver resultado abaixo).

A tabela 3 mostra os genótipos identificados para todas as amostras de DNA extraídas dos *swabs* dos ovos dos 16 ninhos analisados. Concordância completa foi observada entre as três genotipagens realizadas. A probabilidade de identidade calculada para o conjunto de locos utilizado foi de 0,002. Pela abordagem genética usada nesse estudo foram identificados 16 ovos, de 14 ninhos, como resultantes de oviposição por mais de uma fêmea. A figura 8 resume os resultados dessa análise. Nos ninhos #11 e #12, dois ovos (um em cada ninho) não foram detectados pelo critério comportamental, mas foram indicados como produto de uma segunda fêmea pelo critério genético; ambos os ovos foram o primeiro ovo a ser ovipositado no devido ninho. Nos ninhos #13 e #14, dois ovos foram indicados como sendo de mais de uma fêmea somente pelo critério comportamental; ambos os ovos foram ovipositados cinco dias após o ovo anterior, em cada um desses ninhos. Ovos de uma segunda fêmea foram observados como sendo o último ovo na sequência de oviposição da ninhada em 75% dos ninhos. Ovos de uma segunda fêmea foram ovipositados no mesmo dia de outro ovo da ninhada em três ninhos (ninhos #4, #8 e #10; isto é em 19% dos ninhos). Ovos que foram ovipositados por uma segunda fêmea num intervalo maior do que sete dias após a ninhada da fêmea incubante ter sido completada não vieram a eclodir. No ninho #10 foram registradas três fêmeas ovipositando.

Tabela 3. Genótipos em sete locos de microssatélites das amostras de DNA extraídas dos *swabs* coletados nos ovos de 16 ninhos de *Bubulcus ibis* na colônia de Rio Claro no ano de 2010. Em negrito estão evidenciados os genótipos não coincidentes entre ovos de um mesmo ninho.

Ninho	Ovo	Genótipos nos locos de microssatélites						
		Bi01	Bi15	Bi18	Bi20	Bi26	Bi30	Ah536
#1	1	247/249	183/183	192/194	232/235	271/271	206/206	102/106
	2	247/249	183/183	192/194	232/235	271/271	206/206	102/106
	3	247/247	181/183	192/192	232/235	271/271	206/210	104/104
#2	1	247/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	102/102
	2	247/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	102/102
	3	249/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	104/104
#3	1	245/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	102/104
	2	245/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	102/104
	3	247/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	104/104
#4	1	245/249	181/183	192/192	235/238	271/271	206/206	102/104
	2	245/249	181/183	192/192	235/238	271/271	206/206	102/104
	3	247/247	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	102/104
#5	1	247/249	183/183	192/192	232/235	271/273	206/206	102/104
	2	247/249	183/183	192/192	232/235	271/273	206/206	102/104
	3	247/247	181/183	192/192	232/235	271/273	206/206	104/104
#6	1	245/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	104/104
	2	245/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	104/104
	3	245/247	181/183	192/192	232/232	271/271	206/210	100/102
#7	1	249/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	106/106
	2	249/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	106/106
	3	247/249	183/183	192/192	235/235	271/271	206/210	102/102
#8	1	247/249	183/183	192/192	235/238	271/271	206/208	104/106
	2	247/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	104/106
	3	247/249	183/183	192/192	235/238	271/271	206/208	104/106
#9	1	245/249	181/181	192/192	235/235	271/271	206/206	104/104
	2	245/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	104/104
	3	249/249	181/183	192/194	235/235	271/271	206/206	104/106
#10	1	249/249	183/183	192/194	232/238	271/271	206/206	102/104
	2	249/249	183/183	192/194	232/238	271/271	206/206	102/104
	3	247/249	181/183	192/192	235/235	269/271	206/206	104/104
	4	247/247	183/183	192/194	232/232	271/271	206/206	104/104
#11	1	249/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/210	102/104
	2	249/249	183/183	192/192	232/235	271/271	208/208	100/104
	3	249/249	183/183	192/192	232/235	271/271	208/208	100/104
	4	247/249	183/183	192/192	232/235	271/271	206/206	102/102

#12	1	249/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	104/104
	2	249/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	104/106
	3	249/249	181/183	192/192	232/235	271/271	206/206	104/106
#13	1	247/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	102/104
	2	247/249	181/183	192/192	235/235	271/271	206/206	102/104
#14	1	247/249	181/183	192/194	232/232	271/271	206/206	102/104
	2	247/249	181/183	192/194	232/232	271/271	206/206	102/104
#15	1	247/247	181/183	192/194	235/235	271/271	206/206	102/104
	2	247/247	181/183	192/194	235/235	271/271	206/206	102/104
	3	247/249	183/183	192/196	232/235	271/271	206/206	100/100
#16	1	247/247	183/183	192/194	232/235	271/271	208/210	106/106
	2	247/247	183/183	192/194	232/235	271/271	208/210	106/106
	3	247/247	183/183	192/194	232/235	271/271	206/206	104/104

Os vínculos biológicos mais prováveis, supostos a partir dos valores de parentesco estimados entre as fêmeas que ovipositaram em um mesmo ninho, apontam que na maioria dos casos as fêmeas envolvidas não são relacionadas (valores abaixo de 0,175). Apenas no ninho #5 as duas fêmeas apresentaram um valor de vínculo biológico (0,270) condizente com o de indivíduos aparentados (Tabela 4).

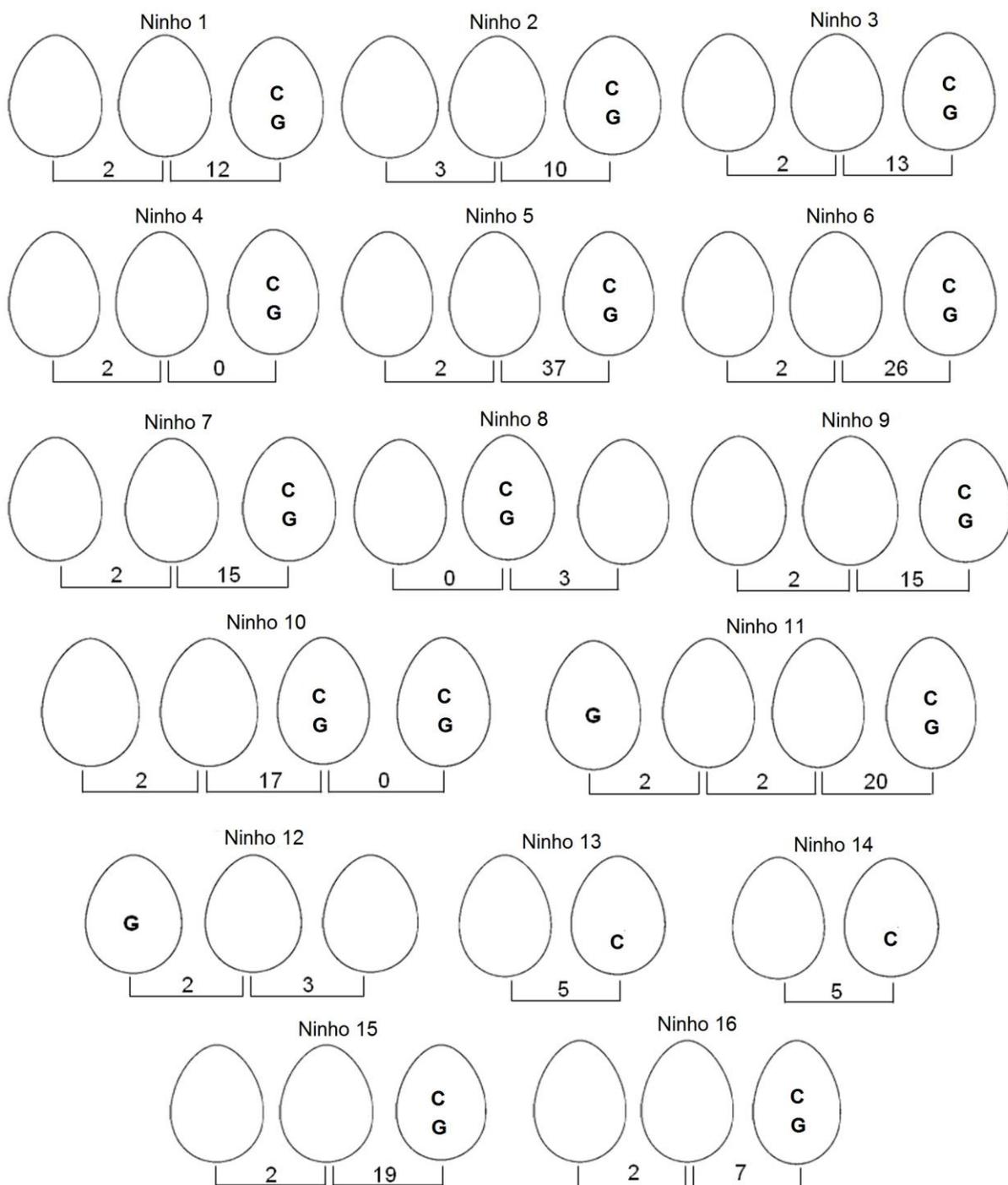


Figura 8. Múltipla maternidade (MM) evidenciada pelas abordagens comportamental e/ou genética em 16 ninhos de *Bubulcus ibis*. Os números sobre as barras entre os ovos indicam os intervalos de postura em dias. **C** indica um ovo suspeito de ser resultado da MM pelo critério de observação comportamental; **G** indica um ovo identificado resultante da MM pelo método genético.

Tabela 4. Vínculo biológico mais provável entre os pares de fêmeas distintas ovipositando em um mesmo ninho de *Bubulcus ibis*. QGM – valor médio calculado pelo estimador de QUELLER e GOODNIGHT (1989).

Pares de fêmeas	QGM
1.1/1.3	-0,634
2.1/2.3	0,009
3.1/3.3	0,114
4.1/4.3	0,170
5.1/5.3	0,270
6.1/6.3	-0,228
7.1/7.3	0,132
8.1/8.2	0,146
9.2/9.3	0,167
10.1/10.3	-0,445
10.1/10.4	0,045
11.3/11.4	0,009
15.1/15.3	-0,221
16.1/16.3	0,101

3.2.2 Temporada reprodutiva de 2011

Para todos os ninhos analisados, durante a fase inicial de genotipagem, uma única fêmea teve seu genótipo coincidente com o da fêmea incubante (identificada por Elaine Dantas). *Swabs* contendo DNA de possíveis fêmeas extras foram confirmados como tal após três rodadas de genotipagem. Como pode ser observado na tabela 5, foram analisados 30 ninhos de *B. ibis* totalizando 114 ovos na temporada de 2011. O DNA extraído das amostras de *swab* foi genotipado em seis locos de microssatélites. O loco heterólogo Ah536 não foi amplificado com sucesso para todas as amostras e, por esse motivo, optou-se por excluí-lo da análise. Das 114 amostras coletadas, 10 foram sexadas como machos (9,6% do total). Eliminadas as amostras de macho, foram

excluídos quatro ninhos dos 30 estudados, os quais após a eliminação não continham evidências de ocorrência de MM. As análises foram então baseadas em 26 ninhos. Sete dos 26 ninhos analisados (27%) apresentaram ovos ovipositados por uma única fêmea. Esse resultado foi confirmado pelo genótipo identificado como o da fêmea oficial na comparação com o genótipo dos adultos identificado pela colega de equipe Elaine Dantas (genótipos disponíveis no Apêndice A). Nos 19 ninhos restantes ficou evidenciada a presença de duas ou três fêmeas ovipositando em um mesmo ninho: uma fêmea “oficial” que seria a incubante e mais uma segunda ou terceira fêmea. Nos ninhos #5 e #7 o primeiro ovo da ninhada foi ovipositado por uma fêmea diferente da “oficial”. Em outros seis ninhos (#6, #8, #10, #16, #20, #23) o último ovo da ninhada foi ovipositado por uma segunda fêmea. Nos ninhos #12, #21, #24, #27, #28 o ovo de uma segunda fêmea foi ovipositado numa posição intermediária na sequência de oviposição. Em cinco ninhos (#9, #13, #15, #19, #30) duas outras fêmeas além da fêmea oficial também ovipositaram, sendo um ovo cada uma. No ninho #11 os dois primeiros ovos foram ovipositados pela fêmea “oficial” e os dois últimos por uma segunda fêmea.

Tabela 5. Genótipos em seis locos de microssatélites das amostras de DNA extraídas dos *swabs* nos ovos de 30 ninhos de *Bubulcus ibis* na colônia de Rio Claro no ano de 2011. Em negrito estão evidenciados os genótipos não coincidentes entre os ovos de um mesmo ninho para as amostras de fêmeas. Em verde a fêmea incubante (fêmea “oficial”), em vermelho o macho e em preto uma segunda ou terceira fêmea que ovipositou no mesmo ninho.

Ninho	Ovo	Genótipos nos locos de microssatélites					
		Bi01	Bi15	Bi18	Bi20	Bi26	Bi30
#1	1	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	3	249/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/206
#2	1	247/247	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	2	247/247	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	3	247/247	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
#3	1	247/251	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206
	2	247/249	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206
	3	247/249	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206
#4	1	249/249	184/184	192/192	235/235	271/271	208/208
	2	249/249	184/184	192/192	235/235	271/271	208/208
#5	1	247/249	184/184	192/192	232/235	269/271	206/206
	2	245/247	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206

	3	245/247	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	4	245/247	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	5	247/251	184/184	192/194	232/235	271/271	206/206
#6	1	247/247	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	2	247/247	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	3	247/247	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	4	247/249	182/184	192/194	232/235	271/271	206/206
#7	1	247/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	2	247/247	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	3	247/247	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	4	247/247	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
#8	1	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	2	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	3	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	4	247/247	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#9	1	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	206/210
	2	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	206/210
	3	247/247	184/184	192/192	235/238	271/271	206/210
	4	247/247	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	5	247/249	182/184	192/194	232/232	271/271	206/208
#10	1	247/251	182/184	192/192	232/235	271/271	206/210
	2	247/251	182/184	192/192	232/235	271/271	206/210
	3	247/251	182/184	192/192	232/235	271/271	206/210
	4	247/247	182/184	192/192	232/232	271/273	206/206
#11	1	249/249	182/182	192/192	232/232	271/271	206/206
	2	249/249	182/182	192/192	232/232	271/271	206/206
	3	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	4	249/249	182/182	192/192	232/238	271/271	206/206
	5	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#12	1	245/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	2	245/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	3	245/247	184/184	192/194	232/235	271/271	206/206
	4	245/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
#13	1	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/210
	2	245/247	182/182	192/194	232/235	271/271	206/206
	3	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/210
	4	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/210
	5	247/247	182/184	192/192	235/235	271/273	206/206
#14	1	247/249	184/184	192/194	232/235	271/271	208/208
	2	247/249	184/184	192/194	232/235	271/271	208/208
	3	247/249	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206

#15	1	245/247	182/184	192/192	232/232	269/271	206/206
	2	245/247	182/184	192/192	232/232	269/271	206/206
	3	245/247	182/184	192/192	232/232	269/271	206/206
	4	249/249	182/184	192/192	232/232	271/271	206/210
	5	247/249	184/184	192/192	235/235	271/271	206/206
#16	1	245/247	182/184	192/192	235/235	271/271	208/208
	2	245/247	182/184	192/192	235/235	271/271	208/208
	3	245/247	182/184	192/192	235/235	271/271	208/208
	4	245/249	182/184	192/192	235/238	271/271	206/206
#17	1	245/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	245/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	3	245/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#18	1	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	2	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	3	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
#19	1	247/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/206
	2	247/247	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	3	247/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/206
	4	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	5	247/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/206
	6	247/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/208
#20	1	247/249	182/184	192/194	232/232	269/271	206/210
	2	247/249	182/184	192/194	232/232	269/271	206/210
	3	247/249	182/182	192/192	232/238	271/271	206/206
	4	247/249	182/184	192/194	232/232	269/271	206/210
	5	247/249	184/184	192/192	232/232	269/269	206/206
#21	1	247/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/208
	2	247/247	184/184	192/194	232/235	271/271	206/206
	3	247/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/208
#22	1	249/249	182/182	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	249/249	182/182	192/192	232/235	271/271	206/206
	3	249/249	182/182	192/192	232/235	271/271	206/206
#23	1	249/249	184/184	192/194	232/235	269/271	206/206
	2	249/249	184/184	192/194	232/235	269/271	206/206
	3	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#24	1	247/249	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
	2	247/249	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
	3	245/247	182/184	192/194	232/235	271/271	206/206
	4	247/249	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
#25	1	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206

	3	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#26	1	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	208/208
	2	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	208/208
	3	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	208/208
#27	1	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	245/245	182/184	192/192	232/235	271/271	206/208
	3	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#28	1	247/247	184/184	192/194	232/232	271/271	206/206
	2	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	3	247/247	184/184	192/194	232/232	271/271	206/206
	4	247/247	184/184	192/192	232/232	269/271	206/210
#29	1	249/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	249/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	3	249/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#30	1	249/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	2	249/249	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
	3	247/247	182/184	192/194	232/235	271/271	206/206
	4	249/249	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
	5	245/247	182/184	192/192	232/232	271/271	206/206

Os vínculos biológicos mais prováveis supostos a partir dos valores de parentesco estimados entre as fêmeas que ovipositaram em um mesmo ninho apontam que na maioria dos casos as fêmeas envolvidas não são relacionadas (valores abaixo de 0,175). Apenas nos ninhos #7 e #9 as duas fêmeas apresentaram um valor de parentesco condizente com o de indivíduos aparentados (Tabela 6).

Tabela 6. Vínculo biológico mais provável entre os pares de fêmeas distintas ovipositando em um mesmo ninho de *Bubulcus ibis*. QGM – valor médio calculado pelo estimador de QUELLER e GOODNIGHT (1989).

Pares de fêmeas	QGM
5.1/5.2	-0,527
6.1/6.2	0,045
7.1/7.2	0,228
8.1/8.4	0,067
9.1/9.4	-0,245

9.1/9.5	-0,128
9.4/9.5	0,185
10.1/10.4	-0,137
11.1/11.3	0,046
11.1/11.5	0,106
11.3/11.5	-0,245
12.1/12.3	0,095
13.1/13.2	-0,010
13.1/13.5	0,171
13.2/13.5	0,151
15.1/15.4	-0,036
15.1/15.5	0,129
15.4/15.5	0,069
16.1/16.4	-0,027
19.1/19.2	-0,213
19.1/19.6	0,111
19.2/19.6	0,089
20.1/20.5	0,157
21.1/21.2	-0,054
23.1/23.3	0,005
24.1/24.3	0,203
27.1/27.2	-0,002
28.1/28.2	-0,187
30.1/30.3	0,012
30.1/30.5	0,245
30.3/30.5	-0,097

3.3 Testes para detecção de variação em genes do DNAmít

As regiões ND2 e Citocromo b do DNAmít foram sequenciadas para 12 indivíduos, sendo um único haplótipo encontrado nesse conjunto. Esse achado indicou que estas regiões não apresentam variação genética ou que ela ocorre em níveis muito baixos. A região do DI da região controladora se mostrou bem mais variável. No mesmo conjunto de 12 indivíduos seis haplótipos foram encontrados. Desta forma a região do DI foi então escolhida para a realização deste trabalho.

3.4 Distribuição e estruturação da diversidade genética no Brasil

Um fragmento de 643 pb do DI da região controladora foi sequenciado para 148 indivíduos de *B. ibis*, provenientes de sete populações brasileiras. Dezesesseis haplótipos foram encontrados no Brasil (Tabela 7). Os níveis de diversidade genética determinados para as regiões brasileiras são semelhantes entre si (Tabela 8).

O *Fst* par-a-par entre as populações brasileiras revelou que há baixo nível de estruturação genética entre as sete populações analisadas. Nenhum valor significativo foi registrado entre os pares de populações analisados (Tabela 9). Da mesma forma, verificou-se pela AMOVA que a maioria da variação genética (~ 98,5%) é explicada pela variação dentro das populações e não pela variação detectada entre elas (Tabela 10).

Testes de neutralidade (D de Tajima, F_s de Fu, D^* e F^* de Fu e Li, R_2 de Ramos-Onsins e Rozas) foram realizados assumindo-se que a região controladora do DNAmít é neutra e não está sob seleção. Desvios da neutralidade nesses testes não foram detectados (todos os valores de p foram não significativos) nas populações brasileiras analisadas (Tabela 11). Esses resultados foram interpretados como ausência de sinais de expansão demográfica. As curvas de *mismatch distribution*, distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas, apresentaram padrões de distribuição multimodal para a maioria das populações; com exceção das populações de SP e do RS que apresentaram distribuição unimodal, assim como a curva da população brasileira total – juntando-se todas as sete populações estudadas (Fig. 9). Todos os valores de p para SSD não foram significativos, indicando que as curvas observadas não diferiram significativamente do modelo de expansão populacional. Da mesma forma os valores de

p da estatística *Raggedness* (r), que testa a homogeneidade da curva, não se mostraram significativos, resultado esperado quando não se tem fortes sinais de crescimento populacional.

A rede de haplótipos gerada pela análise no programa TCS está apresentada na figura 10. Os haplótipos de maior frequência (HAP-1, HAP-2 e HAP-5) são compartilhados entre todas as sete populações amostradas. O haplótipo apontado pela análise como sendo o provável haplótipo ancestral das populações brasileiras foi o HAP-6, o qual está presente em cinco das sete populações amostradas e é o quarto em maior frequência nessas populações. O haplótipo HAP-7, quinto em frequência, também ocorre em cinco das populações amostradas. O restante dos haplótipos tem ocorrência mais restrita. Três deles (HAP-4, HAP-9 e HAP-10) são compartilhados somente entre as populações do Norte e Nordeste do país. O haplótipo HAP-16 é compartilhado somente entre as populações do Sudeste e Sul do país. Haplótipos compartilhados entre populações do Norte ou Nordeste com as populações do Sudeste ou Sul do país também ocorreram (HAP-3, HAP-8, HAP-13 e HAP-15). Somente as populações do Norte e Nordeste do país apresentaram haplótipos exclusivos (HAP-11, HAP-12 e HAP-14).

Tabela 7. Haplótipos do DI da região controladora do DNAmi amostrados em *Bubulcus ibis* no Brasil, com suas frequências de ocorrência em cada uma das populações estudadas. S = sítios variáveis, H = haplótipos.

S	3	4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	Frequência de ocorrência									
																AM	PA	RN	PE	MG	SP	RS	Total		
/	7	8	1	4	8	1	4	5	5	6	6	8	9	4	4	7									
H			6	8	3	0	6	6	8	2	4	4	2	3	6	1									
Hap-1	G	T	A	A	C	T	C	C	C	A	T	G	A	T	T	A	2	6	9	3	3	3	6	32	
Hap-2	T	C	T	T	.	.	C	.	.	C	C	.	1	2	2	2	5	8	5	25	
Hap-3	T	C	T	T	C	C	2	-	-	1	-	-	2	5	
Hap-4	T	.	.	T	.	G	C	.	2	1	-	-	-	-	-	3	
Hap-5	T	.	T	T	C	.	1	9	2	4	3	2	3	24	
Hap-6	T	C	.	-	-	1	1	1	5	6	14	
Hap-7	T	.	.	T	.	.	.	A	.	.	C	.	-	1	1	-	1	4	3	10	
Hap-8	T	C	T	.	T	.	.	.	G	C	C	.	-	1	-	-	-	-	1	2	
Hap-9	T	C	.	T	.	G	C	.	-	1	1	3	-	-	-	5	
Hap-10	T	C	T	.	T	.	C	.	.	C	C	.	-	1	3	3	-	-	-	7	
Hap-11	.	.	.	G	-	1	-	-	-	-	-	1	
Hap-12	T	C	T	.	T	.	C	.	.	.	C	.	-	-	-	4	-	-	-	4	
Hap-13	A	.	G	.	T	C	C	.	-	-	-	1	-	2	2	5	
Hap-14	A	.	.	.	T	C	C	.	-	-	1	-	-	-	-	1	
Hap-15	A	C	.	.	T	C	T	C	.	-	-	1	-	-	2	-	3	
Hap-16	T	.	T	T	C	.	-	-	-	-	-	5	2	7	

Tabela 8. Diversidade genética das populações brasileiras de *Bubulcus ibis*. N - número de indivíduos analisados, S - número de sítios segregantes, H - número de haplótipos, h - diversidade haplotípica, π - diversidade nucleotídica.

Região	N ¹	N ²	S	H	h	π
PA	23	-	11	9	0,794 ± 0,065	0,00449 ± 0,00273
AM	-	8	8	5	0,893 ± 0,058	0,00517 ± 0,00338
RN	21	-	11	9	0,805 ± 0,078	0,00546 ± 0,00323
PE	-	22	12	9	0,905 ± 0,029	0,00564 ± 0,00332
MG	-	13	7	5	0,795 ± 0,076	0,00463 ± 0,00291
SP	-	31	11	8	0,871 ± 0,030	0,00490 ± 0,00290
RS	-	30	12	9	0,887 ± 0,026	0,00479 ± 0,00285
Brasil	44	104	16	16	0,881 ± 0,012	0,00506 ± 0,00290

N¹ amostras sequenciadas por Carlos Congrains; N² amostras sequenciadas no presente trabalho.

Tabela 9. F_{st} par-a-par comparando as populações brasileiras de *Bubulcus ibis*.

	PA	AM	RN	PE	MG	SP
AM	-0,0389					
RN	-0,0056	-0,0169				
PE	0,0779	0,0260	0,0649			
MG	-0,0018	-0,0109	0,0015	0,0185		
SP	0,0234	0,0085	0,0387	0,0215	-0,0140	
RS	-0,0115	-0,0339	0,0014	0,0523	-0,0078	-0,0113

O valor de p não foi significativo para nenhum dos resultados.

Tabela 10. Resultado da AMOVA entre as populações brasileiras de *Bubulcus ibis*.

Fonte da variação	G.L	Soma dos quadrados	Componente de variação	% da variação
Entre as populações	6	12,708	0,025	1,53
Dentre os indivíduos das populações	141	226,096	1,603	98,47
Total	147	238,804	1,628	

FST = 0,01529; $p = 0,14$

Tabela 11. Resultado dos testes de neutralidade realizados para as populações brasileiras de *Bubulcus ibis*.

Região	D de Tajima	Fs de Fu	D^*	F^*	R2
AM	0,370	-0,072	0,634	0,633	0,195
PA	-0,109	-1,481	0,053	0,006	0,123
RN	0,512	-1,069	0,094	0,250	0,150
PE	0,353	-0,822	0,190	0,277	0,145
MG	1,208	0,934	0,792	1,025	0,205
SP	0,458	0,308	1,440	1,329	0,143
RS	0,048	-0,598	1,000	0,825	0,126

O valor de p não foi significativo para nenhum dos resultados.

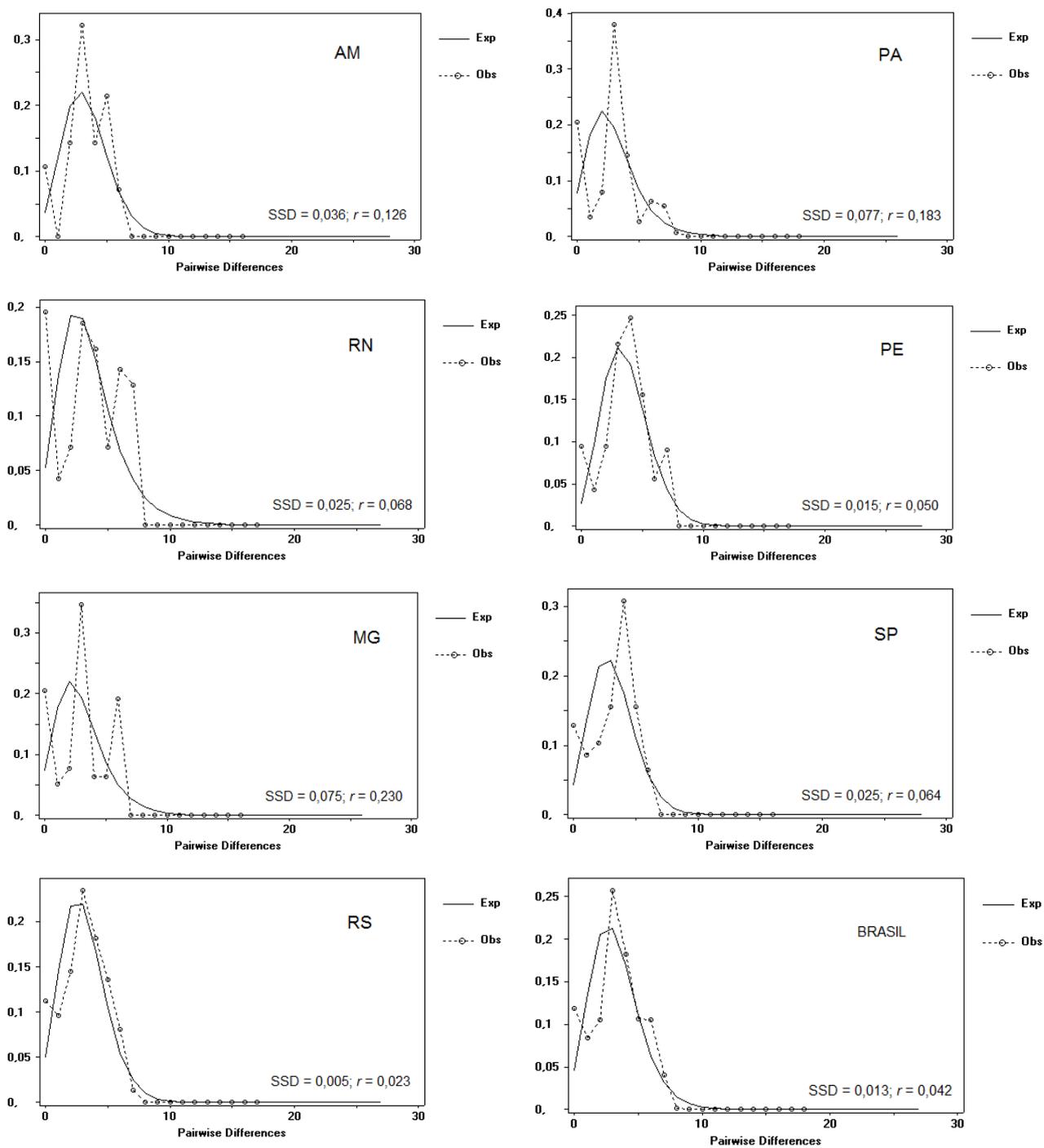


Figura 9. Gráficos da *mismatch distribution* para as sete populações brasileiras de *Bubulcus ibis* analisadas e para a população brasileira como um todo, juntando-se todas as sete populações.

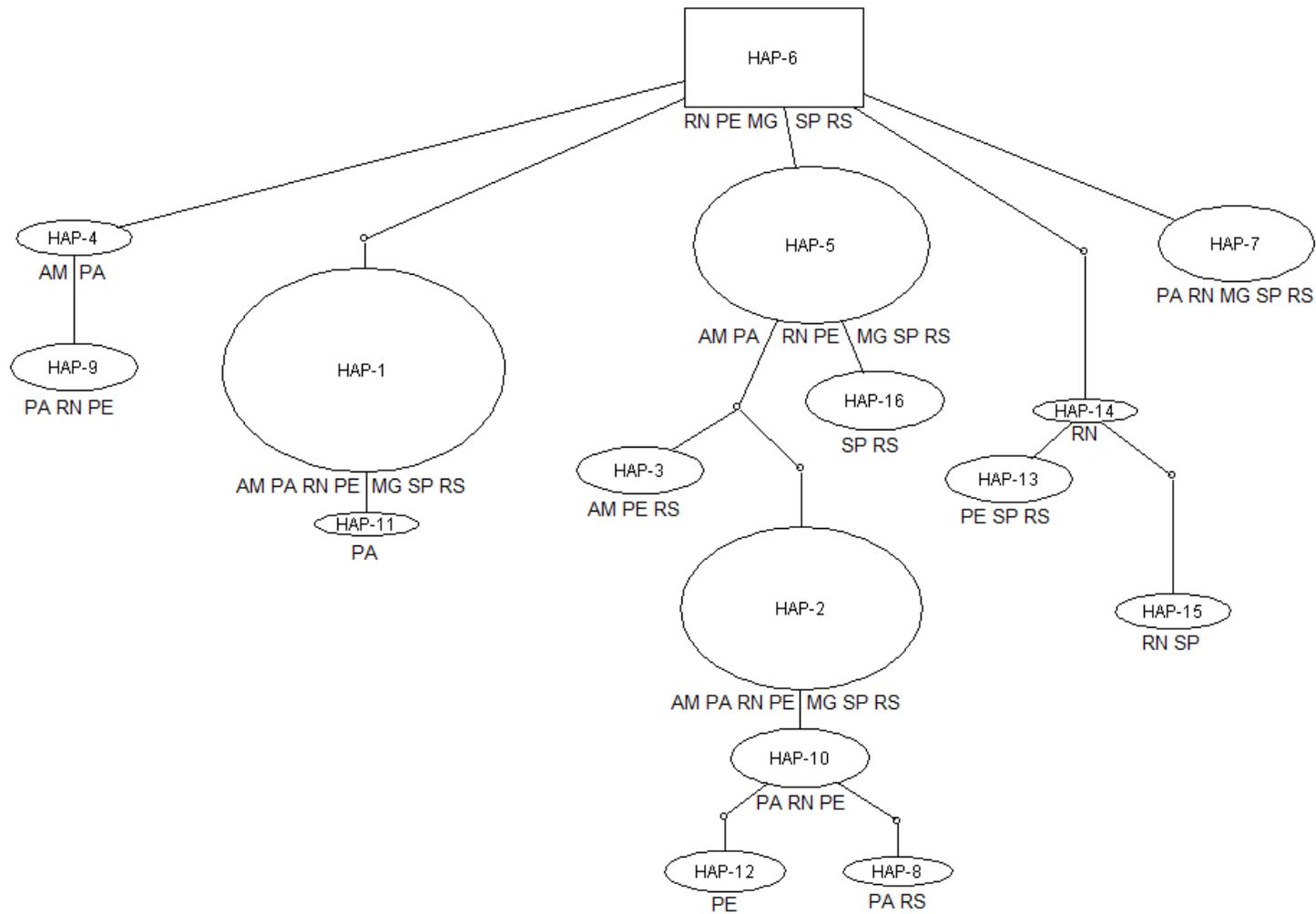


Figura 10. Rede de haplótipos das populações brasileiras de *Bubulcus ibis*. O tamanho dos polígonos é correspondente à frequência de ocorrência de cada haplótipo. Abaixo de cada haplótipo as populações nas quais este foi amostrado.

Capítulo 4

Discussão

4.1 Parâmetros reprodutivos em *Bubulcus ibis*

O tamanho médio da ninhada para *B. ibis* em Rio Claro (SP) (2,0 ovos) não é muito diferente dos valores observado para a espécie em outros lugares do mundo, apesar de ser um pouco mais baixo. Nos Estados Unidos, as ninhadas apresentaram maior tamanho, variando de 2,9 ovos (WEBER, 1975) a 3,0 (MAXWELL; KALE, 1977) e 3,5 (JENNI, 1969; PARSONS, 1995). A média observada por Lowe-McConnel (1967) e Arendt e Arendt (1988) nas Guianas e Índias Ocidentais, respectivamente, foi similar à deste trabalho (2,2 ovos). Ninhadas com tamanhos maiores foram registradas na Argélia (3,1 – SAMRAOUI; MENAI; SAMRAOUI, 2007; 2,9 - SI BACHIR et al., 2008), na África do Sul (3,1 – SIEGFRIED, 1972; 3,0 - KOPIJ, 1997) e na Espanha (4,0 – RUIZ; JOVER; MONTORI, 1981). Na Austrália, o tamanho médio de ninhada variou de 2,8 a 3,5 ovos (MCKILLIGAN, 2005) e na Índia a média foi de 3,0 ovos (HILALUDDIN; SHAWL, 2003). No estudo desenvolvido por Telfair e Bister (2004), durante 28 anos, na população de garça-vaqueira no Texas (EUA), o tamanho médio de ninhada anual variou de 2,7 a 3,7. Nos outros três estudos realizados no Brasil, nos quais o tamanho médio da ninhada foi registrado, foi registrado um tamanho médio similar ao do presente estudo: 2,2 ovos em Fernando de Noronha (BARBOSA-FILHO et al., 2009) , de 2,5 a 2,6 no Rio Grande do Sul (PETRY; FONSECA, 2005). Conclui-se que o tamanho médio de ninhada de 2,0 ovos registrado para *B. ibis* em Rio Claro está compatível com o número médio de filhotes encontrado na espécie na maioria dos estudos realizados (ex. SAMRAOUI; MENAI; SAMRAOUI, 2007; TELFAIR; BISTER, 2004; PETRY; FONSECA, 2005). De acordo com Telfair (1983), as ninhadas com dois ovos são as mais eficientes porque na colônia monitorada por ele 88,8% dessas ninhadas resultaram em dois filhotes. Siegfried (1972) também observou que ninhadas de dois ovos apresentaram maior sucesso reprodutivo.

O período de incubação registrado no presente trabalho (23,0 dias) foi também similar ao observado para a espécie em outros locais. Na América do Norte, Jenni (1969) registrou uma média de 22,9 dias e Telfair (1983) de 24 dias. Tejera e de Wilson (1990) registraram um período de incubação de 23,4 dias no Panamá e na Índia a média foi de 23 dias (HILALUDDIN; SHAWL, 2003).

O intervalo médio de postura entre ovos registrado na colônia de Rio Claro (SP) ($2,4 \pm 1,4$ dias) foi similar ao encontrado para outras populações da espécie, porém o

desvio observado foi maior nesse estudo. Maxwell e Kale (1997) registraram um intervalo de $2,2 \pm 0,1$ dias. Telfair (1983) registrou um intervalo de $2,0 \pm 0,5$ dias. Neste trabalho foi registrado pela primeira vez intervalos de mais de 11 dias entre ovos que foram ovipositados sucessivamente em um mesmo ninho e até um intervalo de 37 dias (surpreendentemente) foi detectado. Isso pode estar refletindo um comportamento oportunístico de fêmeas parasitas na espécie (ver item 4.2.1).

A perda de ovos no ninhal de Rio Claro foi de 53,5% (considerando-se as duas estações reprodutivas). Do total de ovos perdidos, 10,6% foram durante a fase de postura e 36,5% durante o período da incubação. Telfair (1983) registrou perda de 37,2%, mas 79,4% das perdas ocorreram durante a fase de postura, sendo a perda de ovos maior durante a fase de postura do que na fase de incubação. Petry e Fonseca (2005) observaram no Rio Grande do Sul: perda de ovos de 37,1 a 47,1%, sendo 14,1-17,7% dos ninhos perdidos durante a fase de postura. Comparando-se o resultado deste estudo com os demais estudos, verificamos que o padrão registrado no presente trabalho assemelha-se ao encontrado por Petry e Fonseca (2005). A perda de ovos em uma mesma colônia pode também variar entre as estações reprodutivas ano após ano. Si Bachir et al. (2008) registraram na Argélia, em três anos consecutivos, perdas de sete, 28 e 43%. Em Rio Claro a perda de ninhos na fase de ovos também sofreu variação considerando-se os dois anos estudados, porém em menor magnitude – aproximadamente 10% de variação entre os anos (ver tabela 2).

O sucesso de eclosão registrado neste trabalho (46,5%) foi baixo em comparação com a maioria dos valores registrados para esse parâmetro na espécie. Nos Estados Unidos, Maxwell e Kale (1977) registraram sucesso de eclosão de 78,0%, Telfair (1983) de 71,1% e Telfair e Bister (2004) registraram sucesso de eclosão entre 86,0 e 88,0% ao longo dos 28 de estudo realizados no Texas. Na Índia, Hilalluddin e Shawl (2003) registraram sucesso de eclosão de 72,8% e na Argélia este variou de 56,6-93,0% (SI BACHIR et al., 2008). Sucesso de eclosão similar (48,7%) ao do presente estudo foi registrado por Siegfried (1972) na África do Sul.

No geral, *B. ibis* apresentou na colônia de Rio Claro parâmetros reprodutivos similares aos reportados para a espécie em diferentes partes de sua distribuição geográfica. O tamanho de ninhada registrado foi pequeno comparado a dos outros estudos, porém Telfair (1983) afirma ser esse o tamanho mais eficiente na produção de filhotes. A perda de cerca de 50% dos ovos durante a fase de incubação observada pode

ter levado a um baixo sucesso reprodutivo da espécie em Rio Claro. Sucesso de eclosão não necessariamente resulta em sucesso quanto ao número de filhotes que chegam à idade adulta. É possível que mesmo com um menor sucesso de eclosão a colônia de Rio Claro tenha um sucesso reprodutivo total similar ao observado em outros locais. Os objetivos do presente trabalho não foram se aprofundar nessas questões, mas foi possível registrar esses parâmetros e acrescentar mais dados ao conhecimento da biologia reprodutiva da espécie no país. Maiores esforços em estudos posteriores serão necessários para se determinar a eficiência reprodutiva da espécie na colônia de Rio Claro e para se verificar se um tamanho médio de ninhada de dois ovos leva ou não a um baixo sucesso reprodutivo para a espécie neste local.

4.2 Maternidade múltipla em *Bubulcus ibis*

O método do *swab* foi proposto por Schmaltz et al. (2006) para a coleta do DNA materno no campo, de *Larus argentatus* e *Sterna caspia*. Mais recentemente, Martín-Gálvez et al. (2011) expandiram a aplicação do método de coleta para uma variedade de espécies de aves filogeneticamente distantes umas das outras (23 espécies), com diferentes tamanho e traços de história de vida. A metodologia do *swab* dos ovos de um mesmo ninho não havia sido utilizada antes deste trabalho para a detecção de MM em ninhos de aves. Neste trabalho essa nova abordagem molecular foi testada e validada, utilizando-se ninhadas de *B. ibis* como modelo de estudo. Os resultados demonstraram que os genótipos multilocus de fêmeas que ovipositaram em um mesmo ninho podem ser facilmente diferenciados.

A presença de machos foi confirmada nas amostras dos *swabs* analisados (7,3% na amostra de 2010; e 9,6% na de 2011). De acordo com Martín-Gálvez et al. (2011), a possibilidade de se amostrar o DNA do macho ao invés do DNA da fêmea é uma desvantagem do método do *swab*, quando se espera coletar o DNA materno. A possibilidade da amostragem errada aumenta com o tempo decorrido entre a oviposição e a coleta com o *swab*. Se ambos os pais incubam os ovos, as chances do macho deixar algum material biológico (células epiteliais ou fezes) na casca dos ovos aumentam se a coleta demorar muito para ser realizada. Os resultados do presente trabalho demonstraram que, mesmo com duas visitas diárias à colônia para se coletar o *swab* nos

ovos no mesmo dia em que esses foram ovipositados, houve possibilidade da coleta de material biológico do macho. Uma sugestão para otimizar o uso das amostras obtidas por essa técnica é incluir a sexagem das amostras de DNA no primeiro passo do protocolo, visando a identificação e exclusão de possíveis machos das análises, assim como foi realizado no presente trabalho.

Na temporada reprodutiva de 2010, nos ninhos #13 e #14, os genótipos determinados para os ovos supostamente parasitas, ovipositados cinco dias após o último ovo em ambos os ninhos, não diferiram do genótipo encontrado para os outros ovos da mesma ninhada. Uma explicação para esse achado é que a mesma fêmea ovipositou dois ovos consecutivos com um intervalo de cinco dias entre eles. O intervalo máximo de oviposição entre ovos consecutivos considerado na literatura para essa espécie é de quatro dias (TELFAIR, 1983). O fato de termos encontrado um intervalo maior de cinco dias em ovos com genótipos idênticos aos da ninhada nos leva a propor que esse intervalo na oviposição pode variar entre localidades e merece ser revisto. Uma explicação alternativa seria considerar que o painel de microssatélites utilizado neste estudo teria um poder limitado para distinguir entre ovos de duas fêmeas diferentes. A probabilidade de identidade calculada para o conjunto de locos utilizado é baixa (0,002), tornando essa explicação improvável.

Alguns comportamentos podem levar à ocorrência de mais de uma fêmea da mesma espécie ovipositando em um mesmo ninho, entre eles destacam-se o PNI, a poligamia e a tomada de ninho. O PNI foi relatado com maior frequência nessa espécie, tendo sido evidenciado por observações de sequência irregular na oviposição e/ou tamanhos aumentados de ninhadas (TELFAIR, 1983; TELFAIR; BISTER, 2004; PETRY; FONSECA, 2005; SI BACHIR et al., 2008). A poligamia numa forma particular denominada biginia foi também reportada na espécie (FUJIOKA, 1986). Esse autor descreveu dois casos em que um trio, formado por um macho e duas fêmeas, atende a um único ninho, onde todos provêm cuidado parental. Esses dois casos de bigamia reportados por esse autor são os únicos na espécie e foram caracterizados pela presença de sete a oito ovos ovipositados por duas fêmeas no mesmo ninho, cuja postura foi alternada e ocorreu em dias consecutivos. A tomada de ninho ocorre quando um novo casal assume o ninho de outro casal, seja por disputa ou porque o primeiro casal abandonou o ninho por algum outro motivo. O casal que toma posse do ninho

mantém os ovos pré-existentes juntamente com sua própria ninhada; essa é uma situação já observada em outras espécies de aves (WALDECK; ANDERSSON, 2006), mas ainda não identificada em *B. ibis*.

Teoricamente, o PNI é esperado como um comportamento comum em garças e aves desse grupo (YOM-TOV 1980, 2001; GONZÁLEZ-MARTÍN; RUIZ, 1996; LYON; EADIE, 2008). *Bubulcus ibis*, assim como outras espécies de ardeídeos, apresenta algumas características que podem favorecer o comportamento de PNI. A reprodução em colônias, comum nas espécies do grupo (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) é uma dessas características. Em colônias reprodutivas, os indivíduos têm mais chances de aproveitar dos esforços reprodutivos dos outros indivíduos da mesma espécie (BROWN; BROWN, 2001; LYON; EADIE, 2008). A reprodução em colônias promove ainda o agrupamento de indivíduos em um espaço limitado (BIRKHEAD; MØLLER, 1992; STUTCHBURY; MORTON, 1995), o que também pode favorecer o comportamento de PNI. Outro fator que pode contribuir é a sincronia do ciclo reprodutivo dos indivíduos dentro da colônia. Quando muitos indivíduos se agrupam para se reproduzir em uma colônia, muitos deles se encontrarão em uma mesma fase do ciclo reprodutivo. Como os ninhos estão próximos entre si, fêmeas que estiverem no mesmo período de postura podem ovipositar em seus ninhos e nos vizinhos. Esse efeito é multiplicado pela colônia uma vez que *B. ibis* reproduz-se normalmente em colônias contendo de centenas a milhares de ninhos (TELFAIR, 1983). Outro fator que pode contribuir é a existência de fêmeas não pareadas nas colônias reprodutivas. Todos estes fatores podem contribuir para a ocorrência do PNI nessa espécie e em outras três espécies de garças nas quais esse comportamento já foi registrado: *Egretta rufescens* (ROHWER; FREEMAN, 1989), *Ardea purpurea* e *Ardeola relloides* (GONZÁLEZ-MARTÍN; RUIZ, 1996).

Algumas das características mencionadas acima (agrupamento de muitos indivíduos em uma mesma colônia, sincronia no ciclo reprodutivo, a existência de fêmeas não pareadas) podem favorecer também a ocorrência de poligamia na espécie. Em *B. ibis* somente dois casos de poligamia foram previamente reportados e os padrões dos ninhos com múltiplas fêmeas observados no presente trabalho apresentam algumas características diferentes das reportadas nos dois casos de biginia registrados por Fujioka (1986). O número máximo de ovos/ninho registrado no presente trabalho foi de

seis ovos, número esse encontrado em apenas um ninho (#19) da coleta de 2011 num total de 50 ninhos. Além disso, não foram registradas posturas com padrões alternados e consecutivos como os observados por Fujioka (1986) em nenhum dos ninhos. A maioria dos ovos ovipositados por uma segunda ou terceira fêmea nesse estudo se caracterizou por serem os últimos nas ninhadas observadas e uma pequena proporção (cinco ovos) foi detectada em uma posição intermediária.

A genética permite a detecção de ocorrência de MM, mas não define qual comportamento explica o achado. Para se diagnosticar se a causa é PNI, biginia ou tomada de ninho será necessário um alto investimento paralelo na observação focal no campo. Para cumprir esse protocolo será preciso identificar os indivíduos envolvidos nos ninhos, o que requer a captura dos mesmos para marcação, uma tarefa nem sempre fácil. Ovos e filhotes resultantes de um comportamento não podem ser diferenciados dos resultantes de outro, pois todos são morfologicamente idênticos, sejam ovos ou filhotes de uma fêmea estranha ou da fêmea incubante (ANDERSSON, 1984).

Apesar do objetivo do presente trabalho não ser o de determinar qual comportamento explica a presença de múltiplas fêmeas ovipositando em um mesmo ninho, pode-se afirmar que as características dos ninhos estudados com fêmeas múltiplas são mais compatíveis com PNI do que com a biginia reportada na espécie. Reforçando essa hipótese, pode-se verificar que entre os genótipos dos adultos determinados por Elaine Dantas (ver Apêndice A) não se verifica mais de uma fêmea em nenhum dos 30 ninhos analisados para o ano de 2011, uma condição esperada na biginia onde as fêmeas se revezam na incubação dos ovos. Por esse motivo, discute-se no item 4.2.1 as implicações do PNI na espécie.

Para alguns dos casos estudados, nem biginia nem PNI explicam o padrão observado. Nos ninhos #11 e #12 (da temporada reprodutiva de 2010) e nos ninhos #5, #7 (da temporada reprodutiva de 2011) o primeiro ovo da ninhada foi ovipositado por uma fêmea diferente, isto é, uma fêmea com genótipo multilocus diferente do genótipo da fêmea que ovipositou os outros ovos da mesma ninhada. Essas observações não estão de acordo com as características esperadas para ovos frutos de PNI, pelo critério da sequência de oviposição, pois eles são colocados em ninhos ativos, onde já existem ovos. Uma explicação mais plausível seria considerar que foi uma tomada de ninho a

causa de tal achado. Um casal iniciou o ninho e a fêmea deste casal ovipositou o seu primeiro ovo, em seguida, por alguma razão, esse casal abandonou o ninho que foi ocupado por outro casal, o qual manteve o ovo pré-existente junto com sua própria ninhada. Alguns autores discutem esse comportamento como adoção de ovo que claramente não pertence ao casal, mas que estava presente no ninho já construído. Robertson (1998) observou adoção em *Somateria molissima* e Lank et al. (1991) em *Chen caerulescens*, espécies de Anseriformes. No ninho #11 (da temporada reprodutiva de 2011) os dois primeiros ovos foram ovipositados pela fêmea oficial e os dois últimos por uma segunda fêmea. Da mesma forma que nos casos discutidos anteriormente, essa observação sugere reutilização do ninho por um segundo casal, o qual manteve os dois ovos pré-existentes juntamente com sua própria ninhada. Em algumas espécies, como *Somateria mollissima sedentaria*, por exemplo, a tomada de ninho é um comportamento comum (ROBERTSON; WATSON; COOKE, 1992; ROBERTSON, 1998; WALDECK; ANDERSSON, 2006).

4.2.1 Parasitismo de ninho intraespecífico em Bubulcus ibis, revelado pela metodologia genética

Em um ninho da temporada reprodutiva de 2010 e em cinco ninhos de 2011, foram registradas três fêmeas ovipositando no mesmo ninho com duas fêmeas parasitas diferentes. Esse achado é até certo ponto inesperado e novo para a espécie, assim como para a família Ardeidae. Nenhum caso de três fêmeas ovipositando em um mesmo ninho ainda tinha sido registrado para espécies de garças. Três fêmeas ovipositando em um mesmo ninho já foi registrado para outras espécies de aves, como *Larus ridibundus* (DUDA et al., 2008) e *Somateria mollissima sedentaria* (WALDECK; ANDERSSON, 2006).

Ovos parasitas foram ovipositados mais frequentemente por último nas ninhadas em que ocorreram e muitas vezes esses não chegaram a eclodir. Em alguns casos ocuparam posição intermediária na sequência de oviposição. O comportamento de parasitismo de ninho em *B. ibis* é oportunístico, pois a fêmea parasita parece não escolher um ninho baseando-se no período do ciclo reprodutivo em que a fêmea

hospedeira se encontra, mas coloca seus ovos num ninho que não está sendo vigiado no momento.

Em espécies nas quais as fêmeas em uma área (ex. colônia reprodutiva) são aparentadas, custos diretos para o hospedeiro podem ser mais do que compensados pelos ganhos em *fitness* inclusive pelo aumento na reprodução de uma parasita aparentada (ANDERSSON, 2001). O *fitness* inclusivo é a soma do sucesso reprodutivo alcançado pelos próprios esforços mais o número equivalente de filhotes que um indivíduo pode adicionar à população ao ajudar outros indivíduos aparentados (HAMILTON, 1964). A relação de parentesco entre o hospedeiro e o parasita é mais provável de ocorrer em animais nos quais os custos de ser parasitado são baixos e a resistência do hospedeiro pode marcadamente reduzir o sucesso de um parasita não relacionado. Quando os custos são altos, o parasitismo entre não-relacionados pode ser mais vantajoso (ANDERSSON, 2001). Em *Bucephala clangula* foi demonstrado que as fêmeas, hospedeira e parasita são, na verdade, muitas vezes aparentadas (ANDERSSON; ÅHLUND, 2000). Fêmeas jovens que voltam para se reproduzir pela primeira vez parasitam, mais do que o esperado, suas mães ou irmãs de ninhada, as quais são normalmente também suas mães e irmãs de sangue. Em *Somateria mollissima* (WALDECK et al., 2004) e *Croicocephalus ridibundus* (DUDA; CHĘCTNICKI, 2012), também foi demonstrado que as fêmeas parasitas preferem botar seus ovos em ninhos de fêmeas aparentadas. No presente estudo, observou-se entretanto, um padrão diferente, pois a fêmea de *B. ibis* parasita botou seu(s) ovo(s) em um ninho que estava disponível no momento, indiferente do vínculo biológico com a fêmea hospedeira. O mesmo foi observado por Lyon (1993) para *Fulica americana*. Pode-se especular que as fêmeas parasitas de *B. ibis* botam seus ovos em ninhos de fêmeas não relacionadas porque os custos relacionados ao PNI são altos. No entanto, estudos sobre os custos do PNI em *B. ibis* se fazem necessários para se confirmar ou não essa hipótese.

Segundo Andersson (1984) não há a necessidade de evolução de características complexas para que haja evolução do PNI: o filhote parasita recebe cuidado parental espécie-específico se o hospedeiro o aceitar, uma condição esperada; e só não prevista se o hospedeiro conseguir distingui-lo de sua própria prole. O PNI pode evoluir, portanto, mais facilmente do que o parasitismo interespecífico (ANDERSSON, 1984). Discutem-se as vantagens do PNI em relação aos possíveis ganhos ou perdas das fêmeas

envolvidas. E por consequência os mesmos ganhos ou perdas que a fêmea possa vir a ter, o macho que fertilizou seus ovos também terá.

Quando ocorre PNI, a fêmea parasita aumenta o seu sucesso reprodutivo relativo, pois é aumentado o número de ovos que possam vir a eclodir e gerar filhotes seus (ZINK, 2000; YOM-TOV, 2001). Por exemplo, em *B. clangula* algumas fêmeas podem dobrar seu sucesso reprodutivo ao combinar o PNI com a nidificação normal (ÅHLUND, ANDERSSON, 2001). Discute-se que em espécies com custos altos associados ao cuidado parental, o que é o caso de *B. ibis*, o PNI poderia vir a contribuir com o aumento do sucesso reprodutivo dos indivíduos. Nestes casos, a sobrevivência dos pais poderia ser afetada pelos custos altos associados ao cuidado parental. Indivíduos que conseguem ter seus filhotes criados por outros adultos pelo PNI podem, portanto, ter maior sucesso do que pais que criam seus filhotes por si só (ANDERSSON, 1984). O PNI poderia então representar uma maneira de reduzir os custos associados ao cuidado parental e aumentar o sucesso reprodutivo dos indivíduos envolvidos (YOM-TOV, 1980; ZINK, 2000). Ao botar um ovo no ninho de outra fêmea da mesma espécie, a fêmea parasita pode aumentar as chances de que seus filhotes recebam cuidado parental adequado, seja na forma de alimentação ou de proteção contra predadores ou intempéries climáticas (PAYNE, 1977).

O PNI representa então uma alternativa interessante quando são grandes as probabilidades de perda de ovos e/ou filhotes por predação. Em situações nas quais a probabilidade de perdas é grande, a fêmea parasitada pode também diluir as chances de perda de seus ovos e/ou filhotes ao aceitar o ovo(s) da fêmea parasita (YOM-TOV, 1980; ZINK, 2000). Esta poderia ser uma alternativa para explicar porque os adultos de *B. ibis* não rejeitam ovos parasitas em seus ninhos. No presente trabalho foi registrada uma taxa de perda de ovos em torno de 50% e também muitos dos ovos parasitas identificados foram ovipositados muitos dias após a ninhada do hospedeiro ter sido completada e não vieram a eclodir. Supõe-se, portanto, que ao aceitar estes ovos parasitas, o casal hospedeiro poderia estar diminuindo as chances de que seus próprios ovos sejam perdidos. McRae (1997) demonstrou que quando há taxas altas de predação e perda de ovos, *Gallinula chloropus* aumenta sua taxa de PNI. O mesmo foi reportado para duas outras espécies de aves por Sorenson (1991; 1993).

O PNI pode ocorrer também como uma resposta a situações nas quais há baixa disponibilidade de recursos para a nidificação. Em condições não favoráveis, a fêmea parasita transfere os esforços do cuidado parental para fêmeas mais bem sucedidas, não perdendo por completo a estação reprodutiva e garantindo seu sucesso reprodutivo mínimo (LYON; EVERDING, 1996). No outro extremo, quando as condições são particularmente favoráveis na estação reprodutiva, com recursos para a nidificação e para a criação dos filhotes abundantes, as taxas de PNI também podem aumentar. Nesse caso, as fêmeas conseguirão se reproduzir em seus próprios ninhos e, além disso, farão oviposição de ovos em ninhos alheios, prática essa que funcionaria como um bônus reprodutivo (MCRAE, 1997).

Além desses, outros aspectos ecológicos, como por exemplo, a densidade de indivíduos e dos ninhos na colônia, a disponibilidade de recursos para alimentação, também estão envolvidos com a ocorrência do PNI. Como o objetivo do presente trabalho não foi discutir as prováveis razões para a ocorrência deste comportamento em *B. ibis*, esses tipos de dados ecológicos não foram coletados, impossibilitando maior aprofundamento nesse tópico.

4.3 Distribuição e estruturação da diversidade genética no Brasil

Um nível de diversidade genética comparável ao registrado para outras espécies proximamente relacionadas foi encontrado para *B. ibis* no Brasil, como pode ser observado pelos parâmetros calculados ($h = 0,088$ e $\pi = 0,005$). A diversidade nucleotídica (π) reflete a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes em uma população. Segundo Nei e Li (1976) esse índice é menos influenciado pelo tamanho amostral do que a diversidade haplotípica (h), sendo π mais adequado para a comparação da variabilidade genética entre populações e espécies.

Entre as sete populações brasileiras analisadas o π variou muito pouco (entre 0,004 e 0,006), mostrando que a diversidade genética de *B. ibis* no Brasil está distribuída de forma homogênea entre as populações da espécie. Esses achados não confirmam a hipótese levantada de que as populações mais próximas da região onde foram efetuados os primeiros registros da espécie no Brasil (Pará) apresentassem um

grau de diversidade maior. Uma possibilidade é que o processo de colonização no país tenha ocorrido de acordo com um padrão diferente do modelo *stepping-stone* ou que o DNAmít não apresentou variação genética num grau suficiente para detectar diferenças entre as populações.

Se comparar-se a diversidade nucleotídica encontrada para *B. ibis* ($\pi = 0,005$) com valores encontrados para outras espécies proximamente relacionadas em estudos semelhantes, que também utilizaram a região controladora do DNAmít, observa-se que o nível de diversidade registrado para a espécie está entre os valores registrados para as demais. Verificou-se que para *Ardea alba* (CORRÊA, 2009) e *Mycteria americana* (AVELAR, 2008) a diversidade observada foi um pouco maior ($\pi = 0,006$) e para *Platalea ajaja* (SANTOS; LOPES; DEL LAMA., 2008) e *Jabiru mycteria* (LOPES; MIÑO, DEL LAMA, 2007) esta foi um pouco mais baixa ($\pi = 0,004$).

Não foi observada estruturação genética, baseando-se nos resultados do *Fst* para-para e da AMOVA, demonstrando-se não haver diferenciação entre as diferentes populações estudadas. Diferenciação também não foi observada entre as populações de *B. ibis* no Brasil estudadas por Campanini (2011) em sua análise através de locos de microssatélites. A falta de estruturação detectada pode ser explicada supondo um passado comum destas populações e o pouco tempo passado desde então, o que não permitiria detectar diferenciação entre populações pelo DNAmít. Uma hipótese alternativa seria a retenção de polimorfismo ancestral e, boa parte da variação observada hoje, seria fruto desse polimorfismo e não de diferenças novas acumuladas desde a ocupação do Brasil pela espécie. Outro fator que poderia contribuir para a falta de estruturação entre essas populações seria o fluxo gênico (migração de indivíduos) entre diferentes populações. Campanini (2011) detectou fluxo gênico maior que um indivíduo por geração (1,11 migrantes/geração) na análise feita pelo *Fst*, o que já garantiria a homogeneização entre as populações. Não existem estudos sobre os padrões de migração da espécie no Brasil ou na América do Sul, porém *B. ibis* é considerada uma espécie fortemente migratória e com alto poder de dispersão (TELFAIR, 1983, KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Na América do Norte e na África, onde padrões de migração já foram estudados, observa-se que a espécie se desloca por grandes distâncias entre períodos reprodutivos e não reprodutivos (SIEGFRIED, 1970; BROWDER, 1973). Outro resultado que também ilustra a falta de diferenciação e estruturação

encontrada entre as populações estudadas é a rede de haplótipos. Nessa rede pode-se observar que vários haplótipos estão compartilhados entre as diferentes populações, sendo somente três haplótipos exclusivos de uma única população.

Embora a colonização do Brasil por *B. ibis* seja recente, com o primeiro registro no país em 1964 na ilha de Marajó, no Estado do Pará (SICK, 1965), hoje a espécie é encontrada em abundância por todo o país. Diferentes testes realizados para se testar expansão demográfica não revelaram valores significativos. Pelo pouco tempo decorrido desde sua chegada ao Brasil e a grande abundância hoje registrada, podemos considerar que as populações da espécie apresentam um nível alto de crescimento populacional. No entanto, pouco tempo foi decorrido desde sua entrada no país e, por esse motivo, pode se supor que o sinal genético de expansão demográfica não pode ser ainda detectado pelos testes realizados.

Conclusões

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram:

- Agregar a uma metodologia de coleta não-invasiva, a análise genética e registrar a postura em um único ninho por múltiplas fêmeas. Mostrando que a abordagem molecular diferencia o DNA materno de diferentes fêmeas, coletado nas cascas dos ovos de um mesmo ninho, com base nos genótipos multilocus de marcadores microssatélites.
- Comprovar geneticamente a ocorrência de maternidade múltipla em ninhos de *Bubulcus ibis*, demonstrar que não existe relação entre as diferentes fêmeas que ovipositam no mesmo ninho e, baseando-se nas características ecológicas e genéticas levantadas supor que a maioria dos casos estudados caracteriza-se como PNI.
- Registrar pela primeira vez três fêmeas ovipositando em um mesmo ninho na espécie, assim como na família Ardeidae. Assim como registrar possíveis eventos de tomada de ninho, nos quais o novo casal de garças mantém os ovos pré-existentes juntamente com sua própria ninhada.
- Detectar nível de diversidade genética de *Bubulcus ibis* no Brasil comparável a outras espécies de garças, ciconídeos e threskiornitídeos estudadas na mesma região do DNAmít. Demonstrar que esta diversidade está distribuída de forma homogênea entre populações de diferentes regiões brasileiras e que não há estruturação genética populacional para a espécie no Brasil, achados esses compatíveis com a alta capacidade dispersora da espécie.

Referências

ÅHLUND, M.; ANDERSSON M. Female ducks can double their reproduction. **Nature**, v. 414, p. 600–601, 2001.

ÅDAHL, E. et al. Can intraspecific brood parasitism be detected using egg morphology only? **Journal of Avian Biology**, v. 35, p. 360-364, 2004.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H. Invasive species. In: ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H.; AITKEN, S. N. **Conservation and genetics of populations**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006. p. 482-501.

ANDERSSON, M. Brood parasitism within species. In: BARNARD, C.J. **Producers and scroungers: strategies of exploitation and parasitism**. New York: Chapman & Hall, 1984. p. 195-228.

ANDERSSON, M. Relatedness and the evolution of conspecific brood parasitism. **American Naturalist**, v. 158, p. 599–614, 2001.

ANDERSSON, M; ÅHLUND, M. Host-parasite relatedness shown by protein fingerprinting in a brood parasitic bird. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 13188–13193, 2000.

ARENDRT, W. J.; ARENDRT, A. I. Aspects of the breeding biology of the Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) in Montserrat, West Indies and its impact on nest vegetation. **Colonial Waterbirds**, v. 11, p. 72–84, 1988.

AVELAR, L. H. **Estrutura genética e histórico demográfico de populações de *Mycteria americana* (Linnaeus 1758) (Aves: Ciconiiformes: Ciconiidae)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

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

BATTLE, P. F. et al. Social foraging by waterbirds in shallow coastal lagoons in Ghana. **Waterbirds**, v. 26, p. 26-34, 2003.

BELTON, W. Cattle Egrets in Rio Grande do Sul, Brazil. **Bird Banding**, v. 45, p. 59, 1974.

BELZER, W. R.; LOMBARDI, J. R. Cattle Egret symbiosis and heronry abandonment. **Colonial Waterbirds**, v. 12, p. 115–117, 1989.

BIRKHEAD, T. R.; MØLLER, A. P. **Sperm competition in birds: evolutionary causes and consequences**. London: Academic Press, 1992.

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

- BLOUIN, M. S. et al. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 393-401, 1996.
- BOHLEN, J. et al. Across Siberia and over Europe: phylogenetic relationships of the freshwater fish genus *Rhodeus* in Europe and the phylogenetic position of *R. sericeus* from the River Amur. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v. 40, p. 856–865, 2006.
- BROWDER, J. A. Long-distance movements of Cattle Egrets. ***Bird Banding***, v. 44, p. 158–170, 1973.
- 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.
- BROWN, C. R.; BROWN, M. B. Avian coloniality: progress and problems. In: NOLAN Jr, V.; THOMPSON, C. F. ***Current ornithology***. New York: Kluwer Academic; Plenum Publishers, 2001. p. 1-82. v. 16.
- BROWN, L. H.; URBAN, E. K; NEWMAN, K. ***The birds of Africa Volume I***. Princeton: Academic Press, 1982.
- BURGER. J. The pattern and mechanism of nesting in mixed-species heronries. In: SPRUNT, A.; OGDEN, J. C.; WINCKLER, S. ***Wading birds***. New York: National Audubon Society, 1978. p. 45-58. (Research Report, 7).
- BURGER, J; GOCHFELD, M. When is a heronry crowded? A case study of Huckleberry Island, New York, USA. ***Journal of Coastal Research***, v. 9, p. 221–228, 1993.
- CALDWELL, G. S. Attraction to tropical mixed-species heron flocks: proximate mechanism and consequences. ***Behavioral Ecology and Sociobiology***, v. 8, p. 99-103, 1981.
- CAMPANINI, E. B. et al. Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) and cross-amplification in other Ardeidae species. ***Conservation Genetics Resources***, v. 4, p. 19-22, 2012.
- CAMPANINI, E.B. **Populações brasileiras da espécie exótica invasora *Bubulcus ibis***: distribuição da diversidade genética avaliada pelos microssatélites. 2011. 107 p. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. ***Molecular Ecology***, v. 9, p. 1657–1659, 2000.
- CORRÊA, T. C. **Histórico-demográfico e filogeografia em populações brasileiras de *Ardea alba egretta***. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

- CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A. R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, v. 134, p. 959–969, 1993.
- CSILLÉRY, K. *et al.* Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. **Genetics**, v. 173, p. 2091-2101, 2006.
- CUSTER, T. W.; OSBORN, R. G. Feeding habitat use by colonially-breeding herons, egrets and ibises in North Carolina. **Auk**, v. 95, p. 733-743, 1978.
- DUDA, N. *et al.* Multiple maternity in black-headed gull *Larus ridibundus* clutches as revealed by protein fingerprinting. **Journal of Avian Biology**, v. 39, p. 116–119, 2008.
- DUDA, N.; CHĘCZNICKI, W. Conspecific brood parasitism is biased towards relatives in the Common Black-headed Gull. **Ardea**, v. 100, p. 63-70, 2012.
- EADIE, J. M.; SHERMAN, P. W.; SEMEL, B. Conspecific brood parasitism, population dynamics, and the conservation of cavity-nesting birds. In: CARO, T. **Behavioral ecology and conservation biology**. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 306–40.
- EARLÉ, R.A. Does intraspecific brood parasitism occurs in the Cape Sparrow? **Bokmakierie**, v. 38, p. 70, 1986.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUARTO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.
- SAMRAOUI, F.; MENAIË, R.; SAMRAOUI, B. Reproductive ecology of the Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) at Sidi Achour, north-eastern Algeria. **Ostrich**, v. 78, p. 481-487, 2007.
- FICETOLA, G.F.; BONIN, A.; MIAUD, C. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. **Molecular Ecology**, v.17, p.773-782, 2008.
- FORD, L. 1983. Variation in mate fidelity in monogamous birds. In: JOHNSTON, R.F. **Current Ornithology**. New York: Plenum Press. p. 329-356. v. 1.
- FREDERICK, P. C.; SHIELDS, M. A. Corrections for the underestimation of brood parasitism frequency derived from daily nest inspection. **Journal of Field Ornithology**, v. 57, p. 224-226, 1986.

- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality against populations growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.
- FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.
- FUJIOKA, M. Two cases of bygyni in the Cattle Egret *Bubulcus ibis*. **Ibis**, v. 128, p. 419-422, 1986.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, M.; RUIZ, X. Brood Parasitism in Herons. **Colonial Waterbirds**, v. 19, p. 31-38, 1996.
- GRIFFITHS, R. et al. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1071-1075, 1998.
- GRØNSTØL, G.; BLOMQVIST, D.; WAGNER, R. H. The importance of genetic evidence for identifying intra-specific brood parasitism. **Journal of Avian Biology**, v. 37, p. 197-199, 2006.
- HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behavior. **Journal of Theoretical Biology**, v. 7, p. 1-52, 1964.
- HANCOCK, J.; KUSHLAN, J. A. **The herons handbook**. New York: Harper and Row, 1984.
- HILALUDDIN, J. N. S.; SHAWL, T. A. Nest site selection and breeding success by Cattle Egret and Little Egret in Amroha, Uttar Pradesh, India. **Waterbirds**, v. 26, p. 444-448, 2003.
- HUEY, R. B. et al. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. **Science**, v. 287, p. 308-309, 2000.
- HUNT, G.L., Jr. Mate selection and mating systems in seabirds. In: BURGER, J.; OLLA, B. L.; WINN, H. E. **Behavior of marine animals**. New York: Plenum Press, 1980. p. 118-151. v. 4.
- JENNI, D. A. A study of the ecology of four species of herons during the breeding season at Lake Alice, Alachua County, Florida. **Ecological Monographs**, v. 39, p. 245-270, 1969.
- KOPIJ, G. Timing of colony occupation, clutch size and breeding success in the Cattle Egret *Bubulcus ibis* related to nest location in a South African heronry. **Acta Ornitologica**, v. 32, p. 169-174, 1997.

- KUSHLAN, J. A.; HAFNER, H. **Heron conservation**. San Diego: Academic Press, 2000.
- KUSHLAN, J. A.; HANCOCK, J. A. **The herons, bird families of the world**. Oxford: Oxford University Press, 2005.
- LANK, D. B. et al. Why do snow geese adopt eggs? **Behavioral Ecology**, v. 2, p. 181-187, 1991.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LOPES, I. F.; MIÑO, C. I.; DEL LAMA, S. N. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, v. 29, p. 241-250, 2007.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. Biology of the immigrant Cattle Egret *Ardeola ibis* in Guyana, South America. **Ibis**, v. 109, p. 168-179, 1967.
- LYON, B.E. Conspecific brood parasitism as a flexible female reproductive tactic in American coots. **Animal Behaviour**, v. 46, p. 911-928, 1993.
- 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.
- LYON, B. E.; EVERDING, S. A high frequency of conspecific brood parasitism in a colonial waterbird, the Eared Grebe (*Podiceps nigricollis*). **Journal of Avian Biology**, v. 27, p. 238 - 244, 1996.
- MARTÍN-GÁLVEZ, D. et al. DNA sampling from eggshell swabbing is widely applicable in wild bird populations as demonstrated in 23 species. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 481-493, 2011.
- MAXWELL, G. R., II; KALE, H. W., II. Breeding biology of five species of herons in coastal Florida. **Auk**, v. 94, p. 689-700, 1977.
- MCCRACKEN, K. G.; SHELDON, F. H. Molecular and osteological heron phylogenies: sources and incongruence. **Auk**, v. 115, p. 127-141, 1998.
- MCGUIRE, H.L.; NOOR, M.A.F. Microsatellite loci for great White herons and great blue herons (Aves, *Ardeidae*, *Ardea herodias*). **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.170-172, 2002.
- MCKILLIGAN, N.G. **Hérons, Egrets and Bitterns: their biology and conservation in Australia**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2005.

- MCRAE, S. B. A rise in nest predation enhances the frequency of intraspecific brood parasitism in a moorhen population. **Journal of Animal Ecology**, v. 66, p. 143-153, 1997.
- MEESE, R. J. Cattle egret predation causing reproductive failures of nesting tricolored blackbirds. **California Fish and Game**, v. 98, p. 47-50, 2012.
- MIÑO, C.I.; DEL LAMA, S.N. Molted feathers as a source of DNA for genetic studies in waterbird populations. **Waterbirds**, v.32, p.322-329, 2009.
- MIÑO, C. I. **Genética de Populações e Relações de Parentesco em Ciconiiformes (Aves)**. 2010, 157 p. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- MIÑO, C. I. et al. Reconstructing genetic mating systems in the absence of parental information in colonially breeding waterbirds. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 196, 2011.
- NEI, M; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- PALMER, R. S. **Handbook of North American birds: loons through flamingos**. New Haven: Yale University Press, 1962. v. 1.
- PARSONS, K. C. Heron nesting at pea-patch island, upper Delaware Bay, USA - abundance and reproductive success. **Colonial Waterbirds**, v. 18, p. 69-78, 1995.
- PAYNE, R. B. The ecology of brood parasitism in birds. **Annual Review in Ecology and Systematics**, v. 8, p. 1-28, 1977.
- PAYNE, R. B. Family Ardeidae. In: MAYR, E; COTTRELL, G. W. **Check-list of birds of the World**. Cambridge: Museum of Comparative Zoology, 1979. p. 193-244. v. 1. ed. 2.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2005.
- PETRY, M. V.; FONSECA, V. D. S. Breeding success of the colonist species *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) and four native species. **Acta Zoologica**, v. 86, p. 217-221, 2005.
- PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**, v. 52, p. 273-288, 2005.
- QUELLER, D .C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, p. 258-275, 1989.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality test against population growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 2092–2100, 2002.

ROBERTSON, G. J.; WATSON, M. D.; COOKE, F. Frequency, timing and costs of intraspecific nest parasitism in the common eider. **Condor**, v. 94, p. 871–879, 1992.

ROBERTSON, G. J. Egg adoption can explain joint egg-laying in common eiders. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 43, p. 289-296, 1998.

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

ROHWER, F. C.; FREEMAN, S. The distribution of conspecific nest parasitism in birds. **Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie**, v. 67, p. 239-253, 1989.

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

RUIZ, X.; JOVER, L.; MONTORI, A. Primeros datos sobre la reproducción de la garcilla buoiera – *Bubulcus ibis ibis* (L.) – em el Delta del Ebro, Tarragona (España). **Publicaciones del Departamento de Zoología**, Barcelona, v. 7, p. 77-86, 1981.

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

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. p. 290-319.

SANTOS, M. H.; LOPES, I. F.; DEL LAMA, S. N. Population genetic study of mitochondrial DNA in Roseate Spoonbill (Aves; *Platalea ajaja*) breeding colonies from the Pantanal Wetlands, Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 46, p. 492-505, 2008.

ŠEDIVÁ, A. et al. Around or across the Carpathians: colonization model of the Danube basin inferred from genetic diversification of stone loach (*Barbatula barbatula*) populations. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1277-1292, 2008.

SCHMALTZ, G. et al. Nondestructive sampling of maternal DNA from the external shell of bird eggs. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 543–549, 2006.

SHELDON, F. H. Phylogeny of herons estimated from DNA-DNA hybridization data. **Auk**, v. 104, p. 97-108, 1987.

SHELDON, F. H.; MCCRACKEN, K. G.; STUEBING, K. D. Phylogenetic relationships of the Zigzag Heron (*Zebrilus undulatus*) and White-crested Bittern (*Tigrionis leucolophus*) estimated by DNA-DNA hybridization. **Auk**, v. 112, p. 672-679, 1995.

- SI BACHIR, S. et al. Nest site selection and breeding success in an expanding species, the Cattle Egret *Bubulcus ibis*. **Ardea**, v. 96, p. 99–107, 2008.
- SICK, H. *Bubulcus ibis* (L.) na Ilha de Marajó, Pará: garça ainda não registrada no Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.37, p.567-570, 1965.
- SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.
- SIEGFRIED, W. R. Mortality and dispersal of ringed Cattle Egrets. **Ostrich**, v. 41, p. 122–135, 1970.
- SIEGFRIED, W. R. Breeding success and reproductive output of the Cattle Egret. **Ostrich**, v. 43, p. 43–55, 1972.
- SIEGFRIED, W. R. Habitat and the modern range expansion of the Cattle Egret. In: SPRUNT, A.; OGDEN, J. C.; WINCKLER, S. **Wading birds**. New York: National Audubon Society, 1978. p. 315-324. (Research Report, 7).
- SILVA-JR, J.M.; PÉRES-JR, A.K.; SAZIMA, I. *Euprepis atlanticus* (Noronha Skink) Predation. **Herpetological Review**, v. 36, p. 62-63, 2004.
- SIMON, A. et al. Invasive cyprinid fish in Europe originate from the single introduction of an admixed source population followed by a complex pattern of spread. **PLoS ONE**, v. 6: e18560. doi:10.1371/journal.pone.0018560, 2011.
- SMITH, J. P. Foraging flights and habitat use of nesting wading birds (Ciconiiformes) at Lake Okeechobee, Florida. **Colonial Waterbirds**, v. 18, p. 139-158, 1995.
- SORENSEN, M. D. The functional significance of parasitic egg laying and typical nesting in redhead ducks: an analysis of individual behaviour. **Animal Behaviour**, v. 42, p. 771-796, 1991.
- SORENSEN, M. D. Parasitic egg laying in canvasbacks: frequency, success, and individual behaviour. **Auk**, v. 110, p. 57-69, 1993.
- SORENSEN, M. D. et al. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, p. 105-114, 1999.
- STRAYER, D. L. et al. Understanding the long-term effects of species invasions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, p. 645-651, 2006.
- 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.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989.

TEJERA, V. H.; DE WILSON, V. Un estudio de *Bubulcus ibis* en Panamá (Ciconiiformes, Ardeidae). **Scientia (Panamá)**, v. 5, p. 61–71, 1990.

TELFAIR, R.C., II. **The Cattle Egret: a Texas focus and world view**. The Texas Agricultural Experimentation Station: Texas A&M University, College Station, 1983.

TELFAIR, R.C., II.; BISTER, T. J. Long term breeding success of the cattle egret in Texas. **Waterbirds**, v. 27, p. 69-78, 2004.

TELFAIR, R.C., II.; RAYMOND, C. Cattle Egret (*Bubulcus ibis*). In: **The Birds of North America Online**. POOLE, A. Ithaca: Cornell Lab of Ornithology, 2006. Disponível em: <<http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/113>>. Acesso em: dez 2012.

TORRES-LEGUIZAMÓN, M. et al. Inferring native range and invasion scenarios with mitochondrial DNA: the case of *T. solanivora* successive north-south step-wise introductions across Central and South America. **Biological Invasions**, v. 13, p. 1505–1519, 2011.

WALDECK, P. et al. Brood parasitism in a population of common eider (*Somateria mollissima*). **Behaviour**, v. 141, p. 725–739, 2004.

WALDECK, P.; ANDERSSON, M. Brood parasitism and nest takeover in common eiders. **Ethology**, v. 112, p. 616-624, 2006.

WEBER, W. J. Notes on Cattle Egret breeding. **Auk**, v. 92, p. 111–117, 1975.

WETMORE, A. An early record of the Cattle Egret in Colombia. **Auk**, v. 80, p. 547, 1963.

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, p. 133-143, 2001.

ZINK, A. G. The evolution of intraspecific brood parasitism in birds and insects. **American Naturalist**, v. 155, p. 395-405, 2000.

Apêndices

APÊNDICE A - Genótipos em seis locos de microssatélites das amostras de DNA extraídas do sangue coletado de ambos os adultos (Macho – M e fêmea – F) nos 30 ninhos de *Bubulcus ibis* analisados no presente estudo, na colônia de Rio Claro, na temporada reprodutiva de 2011.

Ninho	Ovo	Genótipos nos locos de microssatélites					
		Bi01	Bi15	Bi18	Bi20	Bi26	Bi30
#1	F	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	249/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/206
#2	F	247/247	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	M	247/249	184/184	192/192	235/235	271/271	206/210
#3	F	247/249	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206
	M	247/251	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206
#4	F	249/249	184/184	192/192	235/235	271/271	208/208
	M	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	208/208
#5	F	245/247	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	247/251	184/184	192/194	232/235	271/271	206/206
#6	F	247/247	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	M	247/247	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#7	F	247/247	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	M	247/247	182/182	192/194	235/235	269/271	206/208
#8	F	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	208/208
	M	247/247	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
#9	F	247/249	182/184	192/194	235/235	271/271	206/210
	M	247/247	184/184	192/192	235/238	271/271	206/210
#10	F	247/251	182/184	192/192	232/235	271/271	206/210
	M	247/249	182/182	192/194	232/235	271/271	206/210
#11	F	249/249	182/182	192/192	232/232	271/271	206/206
	M	249/249	182/182	192/192	232/238	271/271	206/206
#12	F	245/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
	M	245/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#13	F	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/210
	M	247/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/210
#14	F	247/249	184/184	192/194	232/235	271/271	208/208
	M	247/249	184/184	192/194	235/235	271/271	206/206
#15	F	245/247	182/184	192/192	232/232	269/271	206/206
	M	247/249	182/182	192/192	232/235	271/271	206/206
#16	F	245/247	182/184	192/192	235/235	271/271	208/208
	M	247/247	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#17	F	245/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	247/249	184/184	192/192	232/238	271/271	206/206

#18	F	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
	M	247/249	182/182	192/192	235/235	271/271	206/206
#19	F	247/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/206
	M	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#20	F	247/249	182/184	192/194	232/232	269/271	206/210
	M	247/249	182/182	192/192	232/238	271/271	206/206
#21	F	247/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/208
	M	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#22	F	249/249	182/182	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	247/247	182/184	190/192	235/235	271/271	208/210
#23	F	249/249	184/184	192/194	232/235	269/271	206/206
	M	247/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
#24	F	247/249	184/184	192/192	232/232	271/271	206/206
	M	247/249	182/184	192/192	235/235	271/271	206/206
#25	F	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	249/249	182/184	192/192	232/235	269/271	206/208
#26	F	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	208/208
	M	249/249	182/184	192/192	232/232	271/271	206/206
#27	F	247/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	245/251	182/184	192/192	232/235	271/271	206/208
#28	F	247/247	184/184	192/194	232/232	271/271	206/206
	M	247/247	184/184	192/192	232/232	269/271	206/210
#29	F	249/249	184/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	249/249	182/184	192/192	232/232	269/271	206/206
#30	F	249/249	182/184	192/192	232/235	271/271	206/206
	M	247/249	182/184	192/194	232/235	271/271	206/206