

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

**“ESTRUTURA GENÉTICA E RELAÇÕES DE PARENTESCO
EM POPULAÇÕES DE COLHEREIRO
(*PLATALEA AJAJA*, AVES: CICONIIFORMES)”**

CAROLINA ISABEL MIÑO

**SÃO CARLOS – SP
2006**

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

**“ESTRUTURA GENÉTICA E RELAÇÕES DE PARENTESCO
EM POPULAÇÕES DE COLHEREIRO
(*PLATALEA AJAJA*, AVES: CICONIIFORMES)”**

CAROLINA ISABEL MIÑO

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

SÃO CARLOS – SP

2006

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

M666eg

Miño, Carolina Isabel.

Estrutura genética e relações de parentesco em populações de colhereiro (*Platalea ajaja*, Aves: Ciconiformes) / Carolina Isabel Miño. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
97 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Genética de populações. 2. Colhereiro. 3. *Platalea ajaja*. 4. Parentesco genético. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

Orientadora

Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama

CAROLINA ISABEL MIÑO

**“ESTRUTURA GENÉTICA E RELAÇÕES DE PARENTESCO
EM POPULAÇÕES DE COLHEREIRO
(*PLATALEA AJAJA*, AVES: CICONIIFORMES)”**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Genética e Evolução.

BANCA EXAMINADORA

Presidente Professora Dra. Silvia Nassif Del Lama (DGE-UFSCar, São Carlos)
(Orientador)

1º Examinador Professora Doutora Anita Wanjtal (IB-USP, São Paulo)
(Instituição)

2º Examinador Professor Dr. Pedro M. Galetti Jr. (DGE-UFSCar, São Carlos)
(Instituição)

3º Examinador _____
(Instituição)

Dedico este trabalho aos meus pais, Chabela e Huguito e a minha avó, Irma, pela vida, o amor, o apoio e a força. Por terem me ensinado a lutar sempre pelo que queremos.

“Na lagoa Negra, cada praia começa a acolher seus ocupantes todo ano. Garças alvas e suas irmãs azuis enrolam e desenrolam os esses de seus longos pescoços e saltam, esbeltas, na sua ponta de areia. Colhereiros rosados, capas de carmim, berloques eriçados, colorem a sua beira. Jaburus-tuiuiús, escarafunchando o lodo para parecer tristonhos, se equilibram, alegres, numa perna só, lá no seu lugar. Guarás saltam daqui prali, pintando tudo.”

Ñandeiara. Maíra (Darcy Ribeiro, 1978).

AGRADECIMENTOS

- À professora Silvia Nassif Del Lama, por ter me recebido no seu laboratório e me ensinado a ser melhor pessoa cada dia. Pela formação acadêmica e pelo constante estímulo para trabalhar e crescer. Obrigada!
- Aos membros da banca Examinadora: Dra. Anita Wanjtal, Dra. Silvia Del Lama e Dr. Pedro M. Galetti Jr., pela menção de Louvor outorgada a este trabalho.
- Ao Professor Dr. Marco A Del Lama, pelo exemplo diário de trabalho duro. Ao Prof. Harold L. Gibbs pelos comentários muito úteis sobre os dados de parentesco.
- Ao Dr. Robert C. Benjamin e o Dr. Gregory M. Sawyer (University of North Texas, EUA) pela gentileza do envio de informações muito valiosas.
- Aos meus pais, por me apoiarem incondicionalmente em todos os meus empreendimentos e aos meus irmãos e avó, por terem estado sempre comigo, a pesar da distância.
- As minhas eternas amigas Coty e Rosanna. A Franquito, a minha luz.
- Aos meus amigos: Margarita, Iderval, El Negrito Reyes, Anita, Laura, Juan, César, Ângela, Federico e Sebastián, por ter estado aí para compartilhar não só os bons, mas também os maus momentos das nossas vidas.
- Aos meus colegas do Laboratório: Iara Freitas Lopes (pela paciência), Mateus Henrique Santos (sem você não teria sido possível nem a metade do trabalho) e Priscila Mussi Gonçalves pela colaboração, boa disposição, discussões estimulantes e bom humor durante esses dois anos.
- Aos colegas do Laboratório de Genética de Himenóptera: Thais, Mariana, Rogério, Kátia, Otávio, Cíntia, Vanessa, Amanda e Giuliano, pelas discussões, a colaboração e as risadas nos momentos de descontração. Obrigada pessoal!
- Agradeço especialmente a Margarita Maria Lópes-Uribe por ter fornecido os recursos computacionais para as análises de parentesco. Obrigada Maya, te adoro!
- A Érika Ramos, técnica do Laboratório de Genética de Aves, e Isabel Godoy, técnica do Laboratório de Genética de Himenóptera, pela sua ajuda em todo.
- Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução pelo carinho e os momentos compartilhados.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, em especial a Tatiane e Regiane, secretarias do PPGGEv, e ao Departamento de Genética e Evolução e seus funcionários, pela paciência.
- À CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.
- Ao Peko, por tudo.

RESUMO

O colhereiro (*Platalea ajaja*, Aves: Threskiornithidae) é uma ave aquática de porte médio, pernas longas e cor rosada que nidifica em colônias reprodutivas em áreas alagadas desde a porção meridional dos Estados Unidos da América (EUA) até as pampas da Argentina. As colônias brasileiras dessa espécie são abundantes no Pantanal, na região dos banhados do Rio Grande do Sul e no norte do país. Os adultos passam por duas mudas ao longo do ano que se sobrepõem, em parte, ao ciclo reprodutivo. A espécie foi descrita como socialmente monogâmica segundo observações de campo de um único casal. Neste trabalho, foram amostradas cinco colônias reprodutivas pantaneiras e uma colônia no Rio Grande do Sul, aplicaram-se estratégias convencionais e uma abordagem não-invasiva de coleta de penas de adultos. Quatro locos de microssatélites espécie-específicos e um heterólogo foram usados para: 1) caracterizar a distribuição da variabilidade genética e os níveis de estruturação genética dentro e entre as colônias; 2) estimar os níveis de parentesco genético entre ninhegos amostrados nos mesmos ninhos com o objetivo de inferir sobre o comportamento reprodutivo dos adultos na natureza e 3) estimar e comparar a distribuição da variabilidade genética e os níveis de parentesco genético entre machos e fêmeas adultos para inferir sobre padrões de dispersão natal na espécie. A heterozigosidade média observada (0,575) foi comparável à reportada para uma população de indivíduos capturados na natureza e mantidos em cativeiro num zoológico dos EUA. Os resultados são discutidos supondo pouca perda de variabilidade na população norte-americana após a redução no tamanho populacional por ela sofrido, ou uma rápida recuperação da mesma. Outra hipótese é levantada, considerando que as populações do Pantanal poderiam estar em declínio. Não foram encontradas evidências de estruturação genética nem diferenciação entre as colônias (F_{ST} global = -0.002, P : 0,59), o qual sugere a existência de altos níveis de fluxo gênico atual ou passado entre elas. Valores baixos, mas significativos, de parentesco genético foram observados para alguns pares encontrados nos mesmos ninhos. Sugere-se que a copula extra-par e/ou parasitismo de ninho, já observados em indivíduos em cativeiro, podem ocorrer em populações naturais, mas esses fatos devem ser mais profundamente investigados. A análises comparativas demonstraram que a distribuição da variabilidade genética e os valores de parentesco não diferiram entre machos e fêmeas. A interpretação desses resultados indica que ambos os sexos apresentariam padrões semelhantes de dispersão natal.

ABSTRACT

The Roseate Spoonbill (*Platalea ajaja*, Aves: Threskiornithidae) is a wading bird species which breeds in wetland colonies from the southern United States (US) to the pampas of Argentina. Brazilian colonies are abundant in the Pantanal region, Rio Grande do Sul marshes and in the north region of this country. Adults undergo two annual molt periods which partially overlap with the reproductive cycle. The species has been described as socially monogamous based on field observations of only one couple. We sampled five Pantanal and one Rio Grande do Sul breeding colonies, applying nestling blood and feather sampling and a new non-invasive methodology, the collection of adult molted feathers. Four species-specific and one heterologous microsatellite markers were used to characterize the genetic variability distribution and levels of genetic structure within and between the colonies; to estimate levels of genetic relatedness between nestlings found at the same nest to infer about breeding behavior in the wild; and to estimate and compare the distribution of genetic variability and values of genetic relatedness between male and female adults to infer about patterns of natal dispersal. Mean observed heterozygosity (0,575) was comparable to the reported for a wild-caught population maintained in a US zoo. Results are discussed supposing reduced losses of genetic variability in the US population after the population decline undergone by it, or by a rapid recovery of this population after the bottleneck. Another possibility was hypothesized considering that Brazilian Pantanal population may be declining. No evidences were found of genetic structuring nor differentiation between the colonies (global $F_{ST} = -0.002$, $P: 0,59$), thus suggesting the existence of high levels of recent or past gene flow between them. Unexpected low relatedness values with significant probability (LOD) values were observed for some dyads found at the same nests. We suggest that extra-pair copulation and/or brood parasitism, already observed in captivity birds, can be occurring in Roseate Spoonbill natural populations, but this fact may be further explored. Comparative analyses showed that genetic variability distribution and relatedness values did not differ significantly between male and female adult samples. The interpretation of these results indicates that both sexes of Roseate Spoonbill apparently present similar patterns of natal dispersal.

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Amostras de sangue e penas em crescimento de ninhegos de colhereiro coletadas em sete colônias reprodutivas brasileiras.....	39
Tabela II. Amostras de pena de indivíduos adultos de colhereiro coletadas no solo de seis colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro.....	40
Tabela III. Oligonucleotídeos iniciadores de replicação testados em colhereiro.....	44
Tabela IV. Probabilidades acumulativas e total, nos seis locos de microssatélites para as amostras de pena coletadas no solo de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.....	54
Tabela V. Locos de microssatélites utilizados na análise de variabilidade genética das colônias reprodutivas de colhereiro. Na: número de alelos por loco, PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica.....	56
Tabela VI. Frequências alélicas nos seis locos de microssatélites analisados nas amostras de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.....	58
Tabela VII. Estimativas de diversidade genética baseadas em dados de cinco locos de microssatélites, em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.....	62
Tabela VIII. Valores de F_{ST} (Weir e Cokerham, 1984 abaixo a diagonal) e R_{ST} (Rousset, 1996; acima da diagonal) nas populações comparadas par-a-par, usando dados dos cinco locos polimórficos de microssatélites. Os maiores valores estão em negrito.....	61
Tabela IX. Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total presente nas colônias reprodutivas de colhereiro.....	63
Tabela X. Distâncias genéticas (Nei, 1978) (erro padrão) entre todos os pares de populações de colhereiro analisadas, calculadas a partir das frequências alélicas nos cinco locos de microssatélites. O maior e o menor valor estão assinalados em negrito.....	63
Tabela XI. Valores de parentesco genético, r , (Queller e Goodnight, 1989) entre pares de ninhegos de colhereiro, amostrados no mesmo ninho, usando dados nos cinco locos de microssatélites. LOD : valor de probabilidade.....	67
Tabela XII. Valores de estimativas de F_{IS} , F_{ST} , diversidade génica (H_s), média e variância de alocação ($mAlc$ e $vAlc$, respectivamente) e parentesco genético (r) para machos e fêmeas adultos de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro (Número de amostras analisadas).....	67
Apêndice I. Genótipos em seis locos de microssatélites e sexo de 30 amostras de penas de adultos de colhereiro coletadas na colônia reprodutiva de São Bom Jesus. S/D: Sem dado.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhe morfológico e padrão de plumagem característico do colhereiro (<i>Platalea ajaja</i>) durante o período reprodutivo.....	17
Figura 2. Ninhegos de colhereiro com cabeça coberta de penas e formato tubular do bico.....	18
Figura 3. Ciclo anual da reprodução, das mudas e migração das populações de colhereiro nos Estados Unidos. Listras largas representam picos de atividades; listras finas indicam pouca atividade. As letras maiúsculas no círculo externo se referem aos meses do ano. (modificado de Dumas, 2000).....	20
Figura 4. Mapa de distribuição da espécie <i>Platalea ajaja</i> no continente americano.....	22
Fig.5 Classificação dos microssatélites segundo composição de suas seqüências repetitivas (modificada de Jarne e Lagoda, 1996).....	24
Figura 6. Mapa que indica os pontos no território brasileiro de coleta de amostras de colhereiro.....	39
Figura 7. Pena de muda de colhereiro com coloração carmesim escura, característica dos adultos, coletada no solo das colônias reprodutivas.....	40
Figura 8. Ilustração de uma pena típica de ave. A) Detalhe da vista posterior da base da pena. B) Corte longitudinal do <i>calamus</i> . São mostradas as duas áreas utilizadas para extração de DNA: 1: parte basal do <i>calamus</i> e 2: coágulo de sangue no umbílico superior (extraído de Horváth e cols., 2005). A região 2 foi utilizada neste trabalho.....	43
Figura 9. Fotografia de gel de agarose 1,5% no qual se mostra o DNA genômico extraído de penas de muda de adultos de colhereiro coletadas no solo das colônias reprodutivas brasileiras. Linhas. 1 a 7: DNA extraído de penas; Linhas. 8: DNA extraído de sangue com concentração de 40ng/µl (controle de rendimento).....	52
Figura 10. Fotografia de um fragmento de gel de poliacrilamida 10% mostrando os padrões de amplificação do gene CHD em machos (390 pb, linhas 1, 3 e 6) e fêmeas (390 e 396 pb, linhas 2, 4, 5 e 7) em colhereiro.....	53
Figura 11. Fotografia de um gel de agarose 3% no qual se mostram os fragmentos obtidos na amplificação usando iniciadores heterólogos para o loco WS04 em colhereiro. Linhas 1 a 8: colhereiro, linha 9: cabeça-seca (controle de amplificação), linha 10: controle de contaminação (sem DNA).....	55
Figura 12. Eletroferogramas mostrando os padrões de amplificação nos locos heterólogos WS03 (a) e WS09 (b) em colhereiro.....	55
Figura 13. Fotografia de um gel de agarose 3% no qual se mostram os fragmentos de amplificação do loco Aaj3 em colhereiro. Linhas. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 14: indivíduos homocigotos. Linhas. 4, 9, 10, 11, 12 e 13: indivíduos heterocigotos.....	56
Figura 14. Distribuição das frequências alélicas dos locos de microssatélites Aaj1 e Aaj2 em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.....	59

Figura 15. Árvore UPGMA (Sneath e Sokal, 1973) construída a partir das distâncias genéticas (Nei, 1978) estimadas usando frequências alélicas nos cinco locos de microssatélites, nas cinco populações das colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.....	64
Figura 16. Curvas de simulação dos valores de parentesco entre pares de indivíduos, geradas ao acaso levando-se em conta as frequências alélicas nos cinco locos de microssatélites e as amostras das cinco colônias reprodutivas.....	65
Figura 17. Gráfico de dispersão dos valores de parentesco observados entre indivíduos encontrados nos mesmos ninhos, entre machos e entre fêmeas de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro. Note-se que a dispersão dos valores de parentesco entre fêmeas em torno à média populacional, é maior.....	68

SUMARIO

1 Introdução.....	16
1.1 Biologia da espécie <i>Platalea ajaja</i>	16
1.1.1 Sistemática.....	16
1.1.2 Descrição morfológica, muda e reprodução.....	16
1.1.3 Distribuição geográfica, dispersão e migração.....	20
1.2 Estrutura genética das populações.....	23
1.2.1 Uso de marcadores moleculares na determinação da estrutura genética das populações.....	23
1.2.2 Estrutura genética de populações de aves.....	25
1.3 Estudos de parentesco mediante uso de microssatélites.....	28
1.4 Padrões de dispersão natal.....	31
2. Justificativa.....	32
3. Objetivos.....	36
4. Material e Métodos.....	38
4.1 Amostras.....	38
4.2 Extração de DNA de sangue e penas em crescimento.....	42
4.3 Extração de DNA de penas de muda.....	43
4.4 Amplificação de microssatélites.....	44
4.5 Sexagem molecular.....	46
4.6 Análise de dados.....	46
4.6.1 Estimativas de variabilidade genética.....	46
4.6.2 Validação da amostragem não-invasiva.....	48
4.6.3 Estimativas de parentesco genético entre ninhegos.....	48
4.6.4 Padrões de dispersão natal.....	50
5 Resultados.....	51
5.1 Amostragem não-invasiva de adultos de colhereiro.....	52
5.2 Estimativas de variabilidade genética.....	54
5.3 Estimativas de parentesco genético entre ninhegos de colhereiro.....	64
5.4 Estimativas dos padrões de dispersão natal em colhereiro.....	66
6 Discussão.....	69
6.1 Amostragem não-invasiva.....	70
6.2 Estimativas de variabilidade genética e estruturação populacional.....	73

6.3 Estimativas de parentesco entre ninhegos.de colhereiro.....	78
6.4 Padrões de dispersão natal em colhereiro.....	81
7. Conclusões.....	84
8. Referências.....	86
9. Apêndice.....	97

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia da espécie *Platalea ajaja*.

1.1.1 Sistemática

A espécie *Platalea ajaja* (Vertebrata, Aves) pertence à família Threskiornithidae, ordem Ciconiiformes (Sick, 1997), composta por duas subfamílias (Threskiornithinae e Plataleinae), com um total de 34 espécies (del Hoyo e cols., 1992). O gênero *Platalea* inclui seis espécies, das quais somente uma (*Platalea ajaja*) ocorre no continente americano. As relações filogenéticas entre as espécies de colhereiros não estão ainda bem esclarecidas, mas de acordo com Hancock (1992), *Platalea ajaja* estaria mais próxima do colhereiro amarelo da Austrália (*Platalea flavipes*), do que dos táxons do velho mundo (colhereiro euro-asiático, *Platalea leucorodia*; colhereiro real *Platalea regia*; colhereiro de face-negra, *Platalea minor* e colhereiro africano, *Platalea alba*). Em relação à origem da espécie, fósseis de *Platalea ajaja* foram encontrados em sítios na Flórida, Califórnia (EUA) e no Peru (América do Sul) e atribuídos ao Pleistoceno-tardio (1,8 milhões a 10.000 anos atrás). Um fóssil da espécie *Ajaia chione*, possível ancestral de *Platalea ajaja*, foi localizado na Flórida (EUA) e atribuído ao período Irvingtoniano (1.3 milhões-40.000 anos atrás) (Emslie, 1995).

1.1.2 Descrição morfológica, muda e reprodução

O colhereiro é uma ave pernalta de porte médio, com altura entre 75-80 cm e peso de aproximadamente 1,2-1,8 kg. A envergadura das asas oscila entre 120-133 cm (Hancock e cols., 1992; Bjork e Powell, 1996). O bico é inicialmente tubular, mas com o desenvolvimento adquire a forma típica espatulada (formato de colher, o que dá nome à

espécie), medindo em média 15-18 cm de comprimento nos indivíduos adultos (Bjork e Powell, 1996). (Figura 1).

Os jovens possuem plumagem rosa claro, as pontas das coberteiras e penas primárias são escuras e a cabeça coberta de penas (Fig. 2). Depois da primeira muda pré-básica, os jovens adquirem coloração rósea mais intensa no corpo e asas, a cabeça perde as penas e a coloração rosada da plumagem do corpo intensifica-se, tornando-os mais semelhante aos adultos. Durante a estação reprodutiva, os adultos apresentam plumagem de coloração rosa carmesim, distinta dos tons róseos dos juvenis. Os adultos apresentam cabeça sem penas, com coloração esverdeada, pele negra ao redor dos olhos e nuca, saco gular com coloração alaranjada brilhante e olhos vermelhos. O pescoço, topo das costas e o peito são brancos, mas o restante da plumagem do corpo é de cor rosa carmesim, com longas pernas avermelhadas. A espécie não apresenta dimorfismo sexual secundário, mas os machos são levemente maiores do que as fêmeas. Fora do período reprodutivo, desaparecem os detalhes na coloração rosa carmesim das asas e cauda (Sick, 1997).



Figura 2. Detalhes morfológicos e o padrão de plumagem característico do colhereiro adulto (*Platalea ajaja*) durante o período reprodutivo (coloração carmesim das asas e cauda).



Figura 2. Ninhegos de colhereiro com a cabeça coberta de penas e bico com formato tubular.

Os colhereiros se reproduzem numa variedade de ambientes aquáticos, ao longo da sua distribuição, em manguezais, estuários, pântanos, lagos e lagoas entre outros (Dumas, 2000). Nidificam em colônias, construindo ninhos em árvores, arbustos ou sobre juncos. Allen (1942), a partir da observação comportamental de um único casal, descreveu que o ninho é construído basicamente pela fêmea, usando material recolhido pelo macho. Concluída a construção do ninho, a fêmea copula diversas vezes com o macho e deposita de 2 a 3 ovos. O período de incubação é de 22 dias (White e cols., 1982) e se inicia logo após a postura do primeiro ovo. Ambos os sexos se encarregam da incubação dos ovos (Allen, 1942). Os adultos reúnem-se nas proximidades das colônias 1-2 meses antes de se acasalarem (Allen, 1942; White e cols., 1982). O período de atividade das colônias reprodutivas varia de uma região para outra mas é de aproximadamente cinco meses por ano. Os acasalamentos ocorrem em sincronia com o período de seca e os filhotes nascem quando a disponibilidade alimentar é maior nas regiões alagadas. Os pares geralmente constroem seus ninhos durante o inverno (estação seca) no Pantanal (julho/agosto) e na primavera, no Rio Grande do Sul (outubro/novembro). Os casais de colhereiros podem se agrupar em colônias reprodutivas

grandes com pares de outras espécies como o cabeça-seca (*Mycteria americana*) e a garça branca grande (*Ardea alba*) (Yamashita e Valle, 1990; Dumas, 2000), ou nidificam em colônias menores, específicas da espécie.

Os filhotes nascem brancos e com aproximadamente 50g e ganham peso rapidamente (White e cols., 1982). Após o 14º dia de idade, os jovens são capazes de andar e podem explorar os arredores do ninho (Bjork e Powell, 1994). Os jovens introduzem o bico na lateral do bico dos pais até atingir a garganta, alimentando-se do alimento trazido por ambos os pais. Com aproximadamente seis semanas de vida os filhotes são capazes de voar (White e cols., 1982) mas permanecem até aproximadamente dois meses na colônia e proximidades, podendo ser alimentados pelos pais nesse período (Powell e Bjork, 1990).

Aproximadamente aos três anos de idade, os filhotes adquirem a plumagem característica de adultos, depois de terem passado por quatro mudas (Bent, 1926; Allen, 1942, Palmer, 1962). Os adultos passam por duas mudas anualmente, uma parcial antes do ciclo reprodutivo e outra completa depois do ciclo reprodutivo. Períodos de reprodução, muda e migração são mais conhecidos para a população norte americana. No hemisfério norte, os ciclos de reprodução e muda se sobrepõem até certo ponto (Fig. 3). Uma maior sobreposição entre os período da reprodução e da muda é esperada nas espécies de aves Neotropicais (Foster, 1974, Farnsworth e Simons, 2001). Esse período maior de sobreposição nas populações neotropicais permite a amostragem simultânea de duas gerações nas colônias reprodutivas: a coleta de sangue ou penas dos ninhegos e a coleta de penas rosa carmesim no solo abaixo dos ninhos, resultante da muda dos adultos.

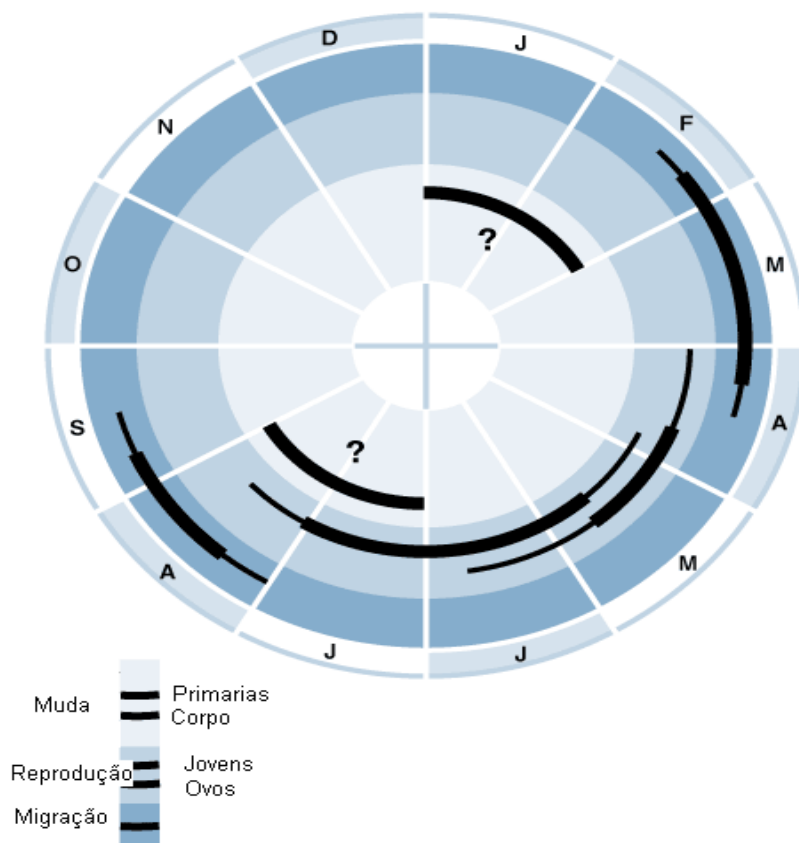


Figura 3. Períodos dos ciclos reprodutivos, das mudas e da migração das populações de colhereiro nos Estados Unidos. Listras largas representam picos de atividades; listras finas indicam pouca atividade. As letras maiúsculas no círculo externo se referem aos meses do ano. (modificado de Dumas, 2000).

1.1.5 Distribuição geográfica, dispersão e migração

O colhereiro (*Platalea ajaja*) é uma ave Neotropical cuja área de distribuição, embora descontínua, estende-se desde o centro da Argentina até o sul dos Estados Unidos da América (EUA) (Fig. 4). Nos EUA procriam ao longo das costas dos estados do Texas, Louisiana e sul da Flórida e, em menor proporção, no interior da Flórida e Louisiana.

Censos informativos sobre o número de indivíduos por colônia e o número total de colônias reprodutivas na América do Sul, em especial no Brasil, não foram ainda realizados. As populações distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina e Chile são consideradas com pouco risco de extinção e o total estimado de

indivíduos está entre 10.0000-250.000 (Canevari, P. 1993; Byers e cols., 1995). Registros de grandes concentrações dessas aves foram documentados nas regiões ao leste dos Andes e na porção sul, próximo ao centro da Argentina. Colônias ao longo da costa Atlântica já foram identificadas na Colômbia e Venezuela. Na Colômbia, foram encontrados somente ao leste de Cartagena e indivíduos vagando foram vistos no interior dos Llanos, Cauca e Valle Magdalena (Hilty e Brown, 1986). Na Venezuela, a espécie nidifica nos Llanos, mas se apresenta também ao longo do Rio Orinoco e no delta do Amacuro (Meyer de Schauensee e Phelps, 1978). Ao longo da costa do Atlântico, indivíduos foram registrados no Suriname, e uma colônia foi documentada em 1967, próxima a Gandu (Haverschmidt e Mees, 1994). São raros na Guiana Francesa (Tostain e cols., 1992). No Brasil, associação de indivíduos em pequenos grupos já foi reportada em diversas regiões. No Brasil central, grupos foram monitorados durante ciclo reprodutivo na região do Pantanal, nos estados de Mato-Grosso e Mato Grosso do Sul (Yamashita e Valle, 1990, Dubs, 1992). Colônias reprodutivas foram também localizadas no estado do Rio Grande do Sul (Belton, 1994; Silva e Bello Fallavena, 1995), na região costeira do norte, na ilha do Cajual e delta do Rio Paranaíba, no estado do Maranhão (Oren, 1991). Na Argentina, colônias foram localizadas ao sul de Córdoba e Buenos Aires. No leste do Uruguai, ocorrências já foram reportadas (Blake, 1977; Narosky e Yzurieta, 2003) e no Chile foram vistos ocasionalmente (Araya e Chester, 1993). Fora da época reprodutiva, os registros da espécie são comuns apenas para populações dos Estados Unidos de América.

As populações de *Platalea ajaja* dispersam após ciclo reprodutivo ao longo da sua distribuição geográfica. A dispersão pós-reprodutiva está relacionada aos ciclos de seca e inundação e com a conseqüente variação na disponibilidade alimentar das áreas ocupadas. No estado da Louisiana (EUA), por exemplo, indivíduos dispersam depois da reprodução para o interior do continente, em resposta à diminuição da concentração de alimento nas áreas

alagadas. No Brasil, na região do Pantanal e dos banhados do Rio Grande do Sul, os adultos migram para outras regiões onde permanecem fora do ciclo reprodutivo, mas os locais onde as aves passam esse período não foram ainda determinados. Silva e Bello Falavena (1995) sugerem que após a época reprodutiva na região sul do Brasil, os filhotes de colhereiro dispersam em várias direções. Um indivíduo anilhado, enquanto ninhego, no Rio Grande do Sul foi recuperado no Espírito Santo (aprox. 1147 km do local de anilhamento) (Silva e Bello Falavena, 1995). Outros jovens foram recuperados em diversas regiões dos estados de São Paulo e Espírito Santo, sugerindo que a migração pós-reprodutiva ocorre na direção sul→norte.

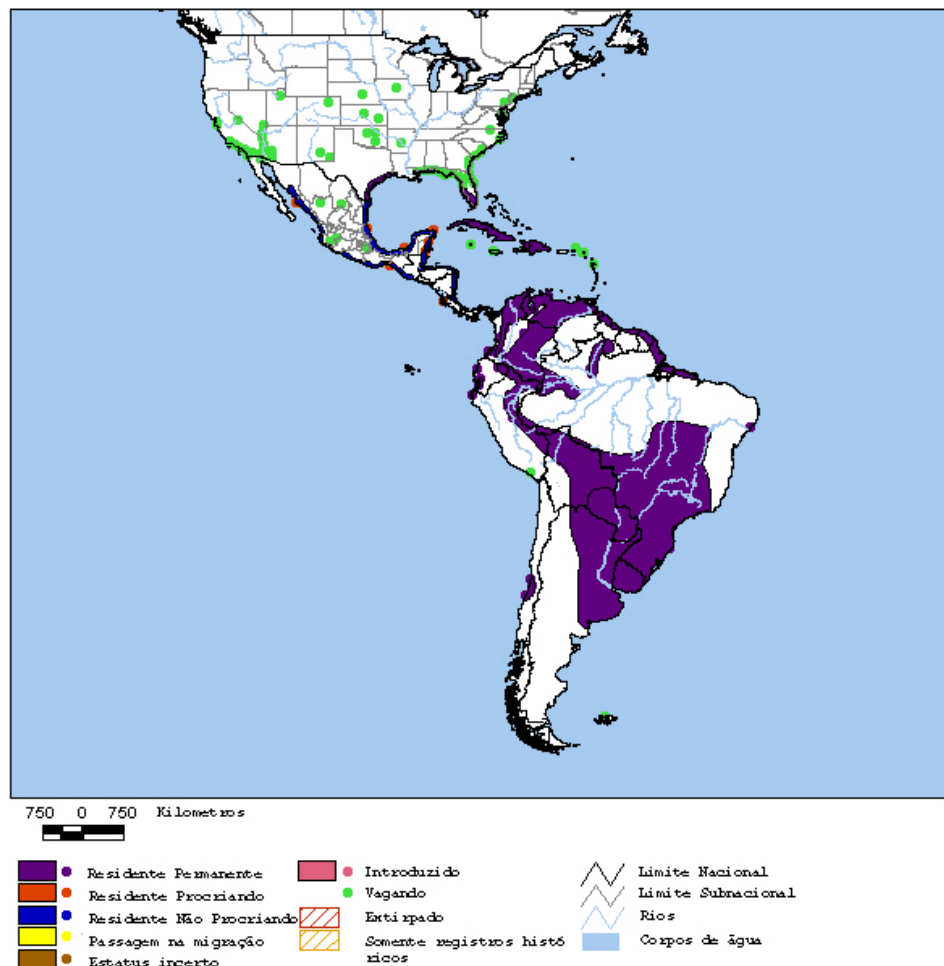


Figura 4. Distribuição da espécie *Platalea ajaja* no continente americano. (tomado de <http://www.natureserve.org/infonatura>).

1.2 Estrutura genética das populações

1.2.1 Uso dos microssatélites na determinação da estrutura genética das populações

A população é uma unidade ecológica e evolutivamente funcional que pode ser definida como um conjunto de indivíduos da mesma espécie, com um mesmo sistema de acasalamento (Templeton, 2006). As populações da maioria das espécies apresentam algum grau de estruturação genética. De acordo com Templeton (2006), diversos fatores podem influenciar na distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações, entre os quais podemos destacar as barreiras ambientais, os processos históricos e os históricos de vida. A estruturação das populações é influenciada também pelo sistema de acasalamento, tamanho populacional, presença e intensidade do fluxo gênico e estrutura etária dos indivíduos dentro das mesmas. Informação acerca dessa estruturação e da distribuição da variabilidade genética nas populações é de fundamental importância para a definição de Unidades de Manejo (UM) da espécie ao longo de sua área de distribuição. Uma vez definida, cada unidade poderá ser manejada independente, garantindo sua preservação.

O uso de marcadores moleculares tem permitido a determinação da estrutura genética das populações. Uma grande variedade desses marcadores está disponível para análises genéticas. Entre os critérios considerados na escolha dessa ferramenta estão as características da espécie em estudo, o problema a ser abordado e a disponibilidade de tempo e dinheiro por parte do pesquisador. Com o desenvolvimento da técnica de PCR, a estrutura genética das populações tem sido mais frequentemente estudada mediante o uso direto de marcadores baseados nos polimorfismos de DNA, com padrões de herança nuclear ou mitocondrial (Avise, 1994).

Os microssatélites (ou *STR*, do inglês, *Sequence Tandem Repeats*; Tautz e cols, 1989) são marcadores moleculares constituídos de pequenas unidades repetidas e justapostas

de DNA (de um a seis pares de bases), espalhados no genoma dentro de seqüências únicas do genoma. Os *STRs* têm sido encontrados nos genomas de todos os organismos eucariotos estudados até o presente e, em menor freqüência, nos procariotos e eubactérias (Tautz e cols, 1989). São classificados, segundo a sua composição de bases, em três famílias: os simples, os compostos e os interrompidos (Jarne e Lagoda, 1996) (Figura 5). Os alelos nos diferentes locos são identificados após amplificação PCR específica, mediante o uso de oligonucleotídeos iniciadores especialmente desenhados para hibridizar com as seqüências flanqueadoras desses locos. Os fragmentos amplificados são depois separados, de acordo com o seu tamanho, mediante eletroforese em gel ou capilar. Diversas análises têm demonstrado que os microssatélites são co-dominantes e herdados de maneira mendeliana (Jarne e Lagoda, 1996). Além disso, esses marcadores são altamente polimórficos nas populações naturais e, na maioria das vezes, são considerados neutros desde o ponto de vista da Seleção Natural.

Simple	CACACACACACACACA
Composto	CACACACAGAGAGAGA
Interrompido	CATTCACATTCACATTC

Fig.5 Classificação dos microssatélites segundo composição de suas seqüências repetitivas (modificada de Jarne e Lagoda, 1996).

Um dos maiores impedimentos para o uso de microssatélites na análise de populações naturais é o desenvolvimento dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para regiões flanqueadoras, passo necessário para amplificação dessas regiões do genoma. Em aves, particularmente, esse processo é mais difícil, pois esses organismos apresentam uma baixa freqüência de microssatélites no genoma quando comparados com outros vertebrados (Primmer e cols, 1997). Uma vez que oligonucleotídeos iniciadores são desenvolvidos para uma espécie, entretanto, esses podem ser usados no estudo de populações de espécies filogeneticamente relacionadas (Primmer e cols, 1996, 2005). Existem na literatura vários

trabalhos que empregam essa estratégia com oligonucleotídeos iniciadores heterólogos (Brunner e cols., 1998; Johnsen e cols., 1998; Arguedas e Parker, 2001; Palo e cols., 2001).

A análise da estrutura das populações utilizando microsatélites como marcadores depende da compreensão correta dos mecanismos mutacionais que explicam a origem da variação genética desses marcadores. O desenvolvimento de estatísticas que possam refletir adequadamente a estruturação das populações também depende do conhecimento desses mecanismos. A taxa de mutação é de particular importância, pois é ela que determina a geração e o nível da variabilidade genética das populações (Jarne e Lagoda, 1996). As taxas de mutação dos microsatélites nas populações naturais vão desde 10^{-6} até 10^{-2} eventos por loco por geração (Li, 2002) e, em consequência, esses marcadores apresentam um grande número de alelos independentes, fornecendo um alto poder estatístico na detecção de estruturação genética das populações (Kalinowski, 2002). Segundo Ellegren (2000), o principal mecanismo mutacional que explica o surgimento de alelos nesses locos é o deslizamento da DNA Polimerase durante a replicação (*Replication Slippage*, em inglês). Os modelos de mutação dos microsatélites são ainda objetos de estudo, existindo evidências a favor de diferentes propostas (Ellegren, 2000; Kruglyak e cols, 2000; Whittaker e cols, 2003).

1.2.2 *Estrutura Genética de Populações de Aves*

Em termos de preservação das espécies de aves aquáticas, de acordo com Kushlan (1992) e Friesen (1997), os maiores esforços devem ser focados no “deme” ou população local intercruzante, pois essa é a unidade de conservação a ser manejada. No caso da conservação de uma espécie de ave aquática na qual as populações diferem geneticamente umas das outras, será necessário a manutenção da variação genética apresentada por cada uma das unidades populacionais independentes. Por outro lado, se a espécie apresenta um alto grau de fluxo gênico e, portanto, uma grande homogeneidade genética entre as populações ao

longo de sua área de ocorrência, sua proteção não implicará na preservação de todas as populações (Friesen, 1997).

A estrutura genética das populações de aves tem sido mais profundamente estudada nos Passeriformes de modo geral do que nos outros grupos de aves. Dentro desse grupo, os gêneros de climas temperados tem sido os mais estudados. Entre os escassos estudos realizados em espécies de aves neotropicais podemos citar os trabalhos de Brown e cols. (2004), McDonald (2003) e Francisco (2005). Esses autores estudaram a estruturação genética de diferentes populações de espécies de Passeriformes da Costa Rica, da Amazônia e da Mata Atlântica, respectivamente, usando locos de microssatélites.

Nas populações de aves aquáticas, os estudos de estruturação também são mais comuns entre espécies de climas temperados do que nas espécies tropicais. A estrutura genética de três populações de duas espécies de albatrozes da Nova Zelândia, *Thalassarche cauta* e *T. steadi*, foi determinada por Abbott e Doublé (2003), baseando-se em dados de seis locos de microssatélites. Nesse estudo, os autores reportaram altos níveis de diferenciação genética entre as duas espécies, diferenciação entre as populações de *T. cauta* e não diferenciação entre as populações de *T. steadi*. Desde o ponto de vista da conservação, recomendam, portanto, considerar as populações de *T. caudata* como unidades independentes.

No grupo das aves neotropicais, podem-se destacar os trabalhos de Baumgarten (2003) com atobás das espécies *Sula dactylatra* e *Sula leucogaster* (Pelecaniiformes, Aves), as quais que se reproduzem no litoral brasileiro, e o de Faria (2005), que estudou três espécies de trinta-réis da costa brasileira analisando níveis de variabilidade genética e estrutura populacional mediante seqüências do DNAmIt e microssatélites. Essa autora encontrou padrões diferentes de estruturação para ambos os tipos de marcadores nas espécies estudadas e evidenciou a aplicação conjunta desses marcadores para a detecção de eventos históricos distintos ocorridos nas populações. Um outro grupo de aves neotropicais

que tem sido intensivamente estudado desde o ponto de vista biogeográfico e sistemático, com o uso de diferentes marcadores moleculares, é o dos Psitacídeos (Miyaki e cols., 1998; Ribas e cols., 2004, 2005).

Estudos genéticos em populações brasileiras de espécies de aves aquáticas da ordem Ciconiiformes têm sido desenvolvidos principalmente na família Ciconiidae. Os trabalhos de Lopes (2002), Rocha e cols. (2002, 2004) e Tomasulo-Secomandi (2004) evidenciaram baixos níveis de diferenciação genética entre colônias pantaneiras e entre colônias do cabeça-seca (*Mycteria americana*) brasileiras e dos EUA, mediante o uso de marcadores alozímicos e de microssatélites.

Na família Treskiornithidae, a espécie asiática ameaçada de extinção *Nipponia nippon* foi estudada por Zhang e cols (2004), mediante o seqüenciamento de 648 pares de bases da região controladora do DNA mitocondrial. Os autores reportaram baixos níveis de variabilidade genética (avaliada pelos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica) e recomendaram cautela nos planos de manejo para re-introdução de populações desta espécie. Dentro do gênero *Platalea*, Yeung e cols. (2006) estudaram outra espécie ameaçada, o colhereiro de cabeça preta, *Platalea minor*, endêmica do leste asiático. Esses autores aplicaram uma abordagem genético-demográfica, estimando o tamanho das populações da espécie a partir do polimorfismo de uma região de 2369 pares de bases, referente a três genes codificadores de proteínas do DNAmít. Com uma amostra de 87 indivíduos, os autores estimaram um tamanho populacional histórico de 10320 indivíduos e apontaram a ocorrência de uma redução pronunciada no tamanho da população, dado que os registros atuais estimam um total de 1206 indivíduos da espécie no mundo todo. Dentre as possíveis causas levantadas para explicar esta redução populacional, os autores citam o uso de pesticidas e a poluição ambiental.

Na espécie *Platalea ajaja* Sawyer (2002) descreveu quatro locos de microsatélites variáveis e analisou a variabilidade genética em amostras de indivíduos criados em cativeiro e de uma pequena amostra (15) de indivíduos selvagens mantidos em cativeiro, provenientes da região sul dos EUA. Nas análises da diversidade genética de duas gerações de oito indivíduos criados em cativeiro, o autor concluiu que houve perda de variabilidade genética na população de zoológico, em comparação com a diversidade apresentada pelos indivíduos da população selvagem, e supõe que esta redução se deve a endogamia ocasionada por acasalamentos entre indivíduos aparentados.

No único estudo de genética de populações naturais brasileiras de colhereiro, Santos (2005) analisou a variabilidade genética de um fragmento de 483 pares de bases do primeiro domínio da região controladora do DNAmít, em amostras de quatro colônias do Pantanal e uma do Rio Grande do Sul (Banhado do Taim). O autor não encontrou diferenciação genética entre as populações das duas regiões, avaliada em termos de F_{ST} e considerou as populações estudadas como pertencentes à uma mesma unidade de manejo. No mesmo estudo, análise da distribuição de frequências relativas das diferenças pareadas (*mismatch distribution*) revelou a provável ocorrência de uma expansão populacional recente na população dos colhereiros no Pantanal.

1.3 Estudos de parentesco mediante uso de microsatélites

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

Ch. Darwin, 1859.

O parentesco entre os indivíduos formadores de uma população natural ou deme, é um dos fatores que influenciam na estruturação genética das populações. Estudos de parentesco genético podem esclarecer aspectos da biologia das espécies, como por exemplo, o comportamento reprodutivo. A aplicação recente da genética molecular à investigação dos sistemas de acasalamento e parentesco entre indivíduos dentro das populações tem fornecido

grande quantidade de informação acerca da biologia de muitos organismos (Taylor e cols, 1997). Os microssatélites foram introduzidos nas análises de parentesco por Queller e cols. (1993), e são considerados marcadores ideais para esse tipo de estudo (Webster e Westneat, 1998; Webster e Reichart, 2005). Essas análises têm sido realizadas para uma grande variedade de organismos, incluindo as aves (Webster, Chuang-Dobbs e Holmes, 2001, Alderson e cols., 2001; Bentzen e cols., 2001; Høglund e Shorey, 2003; Caparroz, 2003; Bouzat e Johnson, 2004; Gibson e cols., 2005; Webster e Reichart, 2005).

Uma das principais vantagens do uso de microssatélites nos estudos de parentesco é que esses são marcadores co-dominantes, permitem, portanto, a distinção dos indivíduos homozigotos e heterozigotos, e as comparações diretas entre indivíduos. A alta taxa de mutação nos locos dos microssatélites é também favorável nas estimativas de parentesco genético, pois resulta numa grande quantidade de alelos por loco, diminuindo a chance de dois indivíduos não relacionados compartilharem esses alelos (Webster e Reichart, 2005). A metodologia de amplificação por PCR utilizada para amplificar esses marcadores permite que pequenas quantidades de DNA obtidas, por exemplo, mediante amostragem não-invasivas, sejam usadas nestas análises (Pearce e cols, 1997).

Os microssatélites apresentam também algumas desvantagens que devem ser levadas em conta na hora da análise de dados. Entre elas, encontra-se o fenômeno dos “alelos nulos”, causado geralmente por um evento mutacional no lugar de hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA molde (Ishibashi e cols, 1996). A presença de uma mutação nesses sítios causa falha na amplificação de um dos alelos do indivíduo, resultando na classificação errônea de heterozigotos como homozigotos. Técnicas estatísticas para estimar o efeito desse fenômeno foram desenvolvidas, mas devem ser cautelosamente tratadas (Brookfield, 1996). Estimativas de parentesco baseadas em microssatélites podem ser robustas se um bom número de locos for empregado. Vários métodos têm sido desenvolvidos

para inferir parentesco a partir desse tipo de dados (Queller e cols, 1993; Blouin, 2003). Entre os métodos mais utilizados estão os “softwares” que aplicam abordagens de tipo máxima verossimilhança para calcular a categoria mais adequada de relacionamento entre dois indivíduos, levando-se em conta seus genótipos e a distribuição dos genótipos na população (ex: RELATEDNESS 5.0.8, Queller e Goodnight, 1989 e KINSHIP, Goodnight e Queller, 1999).

Os microssatélites são poderosas ferramentas na determinação de parentesco em casos de conjuntos complexos de dados. Liliandt e cols. (2001) determinaram a paternidade de 298 indivíduos nas populações da espécie *Perisoreus infaustus*, o gáio-da-Sibéria, mediante o uso de nove locos polimórficos de microssatélites. Os autores conseguiram identificar os pais de 89% de todos os jovens estudados e sugeriram que informação prévia sobre as identidades das mães ou sobre a formação dos casais é importante para a correta determinação da paternidade em populações com estrutura familiar nessa espécie. Liliandt e cols. (2003) desenvolveram um projeto de longa duração no gáio-da-Sibéria, utilizando análises de microssatélites do DNA extraído de penas em crescimento e sangue para esclarecer relações de parentesco entre grupos familiares territoriais. Os autores reportaram que dos 311 grupos que incluíam indivíduos que não eram donos dos territórios analisados, 74% eram famílias com indivíduos em reprodução e 1-3% delas incluíam filhos; 26% dos grupos eram casais com filhos de outros indivíduos. Suas observações sugeriram que, independentemente do parentesco genético, os indivíduos se beneficiavam das associações territoriais.

Estudos sobre estrutura familiar e sistemas de acasalamento em populações naturais de aves como os citados acima, são dificilmente executados porque a informação dos genótipos de todos os indivíduos que compõem as famílias nem sempre é obtida. Por exemplo, os colhereiros adultos, parentais dos ninhegos, se comportam de forma inquieta e

são dificilmente capturados. A abordagem invasiva como a coleta de sangue utilizada na amostragem dos ninhegos não pode ser utilizada, portanto, na coleta de amostras dos adultos nessa espécie, dificultando os estudos de parentesco dessas famílias. Em termos de comportamento reprodutivo, *Platalea ajaja* foi descrita como socialmente monogâmica, mas essa afirmação está baseada somente na observação de um casal no campo (Dumas, 2000). Colhereiros criados em cativeiro foram vistos realizando cópulas extra-par e cuidando de ovos que não pertenciam ao casal (Chris Brown, com. pess. ao Sawyer G, 2002). Essas observações foram confirmadas geneticamente pelo Sawyer (2002). Se esse comportamento não-monogâmico ocorre nas colônias reprodutivas de colhereiro na natureza é uma questão a ser investigada.

1.4 Padrões de dispersão natal

O grau de dispersão é um dos fatores que influenciam na distribuição da variabilidade genética nas populações (SurrIDGE e col., 1999). As aves apresentam maior grau de dispersão quando comparadas com outros vertebrados distribuídos nas mesmas áreas geográficas (Avisé, 1994). Embora tenham sido observadas algumas exceções, na maioria das espécies de aves o padrão observado de dispersão é sexo-diferenciado e as fêmeas são usualmente mais dispersivas do que os machos (Greenwood e Harvey, 1982). Ferramentas genéticas, incluindo as estimativas de parentesco, têm sido muito importantes no estudo da dispersão em várias espécies de aves (Steiner, 2005; Wright e cols., 2005). Diversos estudos têm demonstrado que os padrões de estruturação em escala fina podem providenciar evidências sobre a dispersão dos indivíduos (Queller e Goodnight, 1989; Rousset, 2000; Stow e cols., 2001).

Para espécies pertencentes à ordem Ciconiiformes, a filopatria natal não está completamente esclarecida. Frederick e Ogden (1997) compararam os níveis de filopatria entre duas espécies dessa ordem: *Mycteria americana* (Ciconiidae) e *Eudocimus albus*

(Treshkiornithidae) e concluíram que os indivíduos de *E. albus* dispersaram mais e são mais nômades. O grau de filopatria em *Platalea ajaja* não foi suficientemente investigado. O único estudo do qual se tem conhecimento é o de Silva e Bello Falavena (1995), no qual foram anilhados 1226 ninhegos de colhereiros no Rio Grande do Sul. Baseados na recaptura de 35 indivíduos, os autores propõem uma tendência à filopatria natal na espécie sem especificar se há diferenças na magnitude da dispersão de cada sexo.

2- JUSTIFICATIVA

Espécies que apresentam ampla distribuição no continente americano, como o colhereiro (*Platalea ajaja*) podem ter se tornado vulneráveis em algumas regiões, enquanto que, em outras podem ter permanecido estáveis. Segundo a perspectiva da genética de populações, a redução no número de indivíduos das populações de aves, implica numa redução no tamanho efetivo dessas populações, podendo resultar num efeito chamado de gargalo populacional. A redução no *pool* gênico das populações localizadas na América do Norte pode ter implicado em perda de variação genética total entre os sobreviventes desse processo populacional, resultando numa maior homogeneidade genética da população e, conseqüentemente, no aumento da vulnerabilidade da espécie com relação às diferentes pressões evolutivas. As conseqüências dessa redução populacional para a espécie, entretanto, poderão ser mais ou menos graves, dependendo da estrutura genética de suas populações. Se as populações de *Platalea ajaja* estiverem estruturadas espacialmente, isto é, diferenciadas, o declínio populacional pode ter afetado apenas a população norte-americana. Se há troca gênica entre as populações vizinhas, o efeito já pode ter sido tamponado pela entrada de genes provenientes das populações vizinhas, uma vez que já se passaram 16 gerações (7 anos/geração) desde a redução populacional no norte.

Dumas (2000) ressaltou a necessidade de serem desenvolvidos estudos nas populações de *Platalea ajaja*. Santos (2005) estudou as populações naturais brasileiras utilizando um fragmento parcial da região controladora do DNAmít, não encontrando diferenciação genética entre as colônias do Pantanal, nem entre o Pantanal e o Banhado do Taim (RS). Uma expansão populacional recente no Pantanal foi sugerida pela análise da distribuição unimodal do histograma de frequências relativas das diferenças pareadas e testes de neutralidade (Santos, 2005). O único estudo desenvolvido com marcadores nucleares foi realizado por Sawyer (2002), em populações norte americanas de cativeiro. Nessa amostra, proveniente de zoológicos norte americanos, o autor encontrou um baixo nível de variabilidade com relação à ocorrência de locos de microssatélites estimada por Linn (1993), com aproximadamente um microssatélite para cada 1.6-4.0 Mb. Além disso, dos 32 locos de microssatélites isolados na espécie apenas cinco se mostraram polimórficos, sendo um ligado ao sexo. Sawyer (2002) considerou baixo o nível de variabilidade genética encontrado no seu estudo com relação à frequência dos microssatélites, numa amostra de colhereiros norte-americanos de três zoológicos.

Neste trabalho, propõe-se analisar a distribuição da variabilidade genética em cinco colônias reprodutivas de colhereiro, utilizando marcadores de microssatélites, considerados neutros e altamente variáveis. Considerando a baixa ocorrência de locos polimórficos de microssatélites em colhereiro reportada por Sawyer (2002), serão testados locos heterólogos além dos espécie-específicos. Caso não sejam encontradas evidências de diferenciação genética entre as colônias, a hipótese de altos níveis de fluxo gênico (atual ou passado) entre as populações de colhereiro será aceita. Caso os microssatélites revelem diferenciação genética, propor-se-ão outras causas para explicar esses achados.

Em termos de sistema de acasalamento, a espécie tem sido descrita como socialmente monogâmica, embora essa informação baseia-se só em observações

comportamentais de um casal realizadas no campo. Por outro lado, evidências moleculares foram reportadas por Sawyer (2002) de que, em cativeiro, os adultos copulam com parceiros extra-par e cuidam de ovos alheios, confirmando observações comportamentais realizadas no zoológico de Bronx NY, EUA (Chris Brown, com. pess. ao Sawyer, 2002). O sistema de acasalamento do colhereiro na natureza não foi ainda estudado, devido à dificuldade de se coletar amostras de famílias completas, procedimento esse que envolve a captura dos indivíduos adultos. Neste trabalho, será estudado o parentesco genético entre os filhotes encontrados nos mesmos ninhos para inferir sobre o comportamento reprodutivo de colhereiros na natureza. Caso o parentesco entre os ninhegos esteja dentro do valor teórico esperado para irmãos-completos, a hipótese de monogamia genética será confirmada. Caso os valores de parentesco genético entre esses ninhegos diferirem significativamente do esperado para indivíduos relacionados em primeiro grau, a hipótese de monogamia genética não será aceita, e outras causas para explicar os valores observados serão supostas.

A ocorrência e os padrões de dispersão natal na espécie serão investigados utilizando uma abordagem genética (metodologia indireta). Parâmetros populacionais e graus de parentesco genético serão estimados independentemente e comparados entre os adultos de cada sexo. Caso esses parâmetros diferirem significativamente entre machos e fêmeas adultos, um padrão de dispersão sexo-diferenciado será proposto para explicar os achados. Caso os sexos não apresentem diferenças significativas entre eles em relação às estimativas de variabilidade genética e parentesco, um padrão semelhante na dispersão em ambos os sexos será proposto para a espécie.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo principal

- ❖ Caracterizar geneticamente as populações das colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro, *Platalea ajaja* (Aves: Threskiornithidae) mediante o uso de marcadores moleculares variáveis e neutros, como os microssatélites.

Objetivos específicos

- ❖ Estimar o nível e o padrão de distribuição da variabilidade genética em cinco colônias brasileiras de colhereiros, representantes da região central do país (Pantanal) e uma colônia do sul (Banhado do Taim, RS), usando locos de microssatélites específicos e heterólogos.
- ❖ Inferir sobre o comportamento reprodutivo do colhereiro mediante estimativas de parentesco genético entre filhotes encontrados nos mesmos ninhos.
- ❖ Inferir sobre padrões de dispersão natal mediante comparação entre estimativas da distribuição da variabilidade genética e valores de parentesco, calculados para amostras de adultos, de ambos os sexos, em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram utilizadas duas estratégias de amostragem: a coleta de sangue e penas em crescimento de ninhegos, retirados dos ninhos e retornados após manipulação, e a coleta de penas da muda dos adultos no solo das colônias reprodutivas (amostragem não-invasiva). Durante os ciclos reprodutivos ocorridos entre 1997 e 2003 foram coletadas amostras de sangue e penas em crescimento em colônias na região norte do Pantanal Norte Mato-Grossense brasileiro em: Baía de Gaíva ($16^{\circ}35'06.0''$ S, $57^{\circ}14'03.7''$ O e $16^{\circ}34'55.7''$ S $57^{\circ}10'$ O), Quilú ($17^{\circ}17'08.9''$ S, $56^{\circ}21'07.3''$ O), Fazenda Camalote ($16^{\circ}51'10.0''$ S, $56^{\circ}50'05.9''$ O), Fazenda Ipiranga ($16^{\circ}25'25.7''$ S, $56^{\circ}36'58.0''$ O) e Porto da Fazenda ($16^{\circ}27'S$; $56^{\circ}07'O$). No Pantanal Sul, as amostras foram coletadas na Fazenda Retirinho ($19^{\circ}50'S$; $56^{\circ}02'O$). Também foram coletadas amostras representativas de uma colônia reprodutiva do Rio Grande do Sul (Banhado do Taim, $32^{\circ}29'S$, $52^{\circ}32'O$) (Tabela I, Fig. 6).

Pela estratégia de amostragem não-invasiva nesta espécie, foram coletadas um total de 97 penas provenientes da muda dos adultos na vizinhança dos ninhos no solo das colônias reprodutivas: Fazenda Ipiranga, São Bom Jesus ($S16^{\circ}47'54.2''$, $O56^{\circ}37'23.9''$), Fazenda Camalote, Baía de Gaíva e Quilú (Tabela II). As penas dos colhereiros adultos possuem uma coloração rosa carmesim escura que permite diferenciá-las perfeitamente das dos ninhegos, coloridas de rosa muito claro (Fig.7).

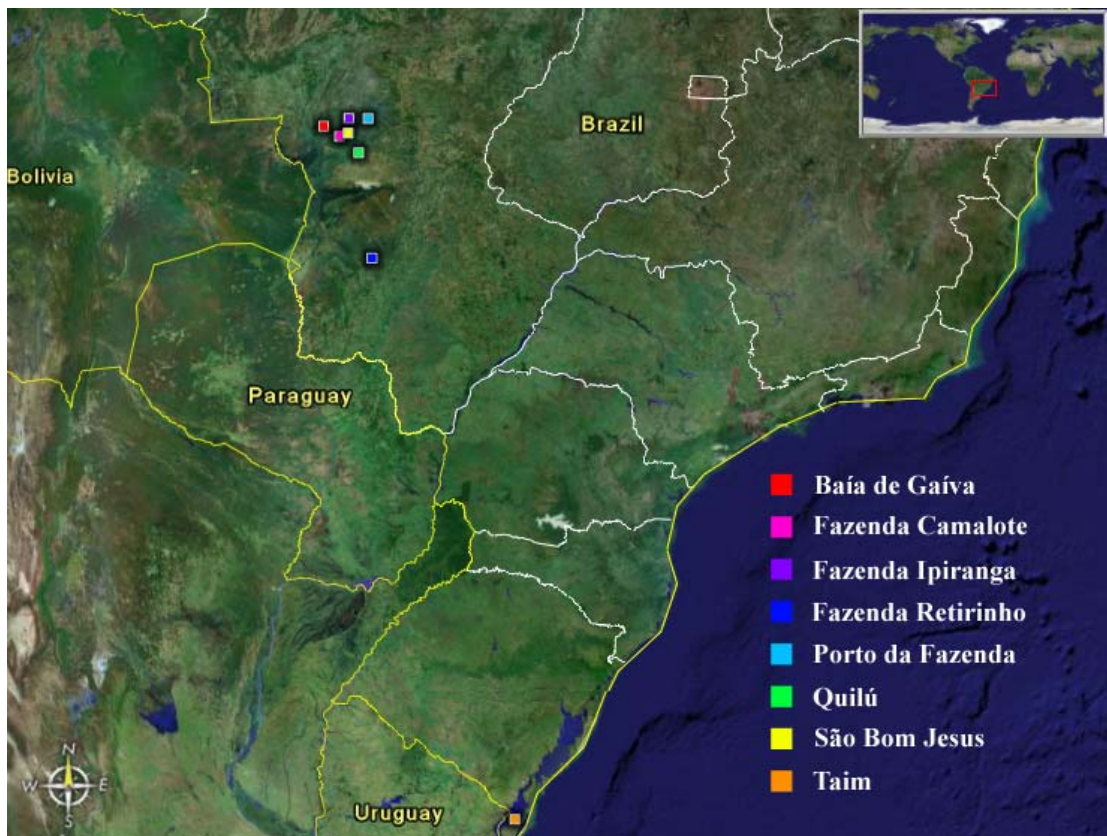


Figura 6. Mapa que indica os pontos no território brasileiro de coleta de amostras de colhereiro.

Tabela I. Locais de coleta de amostras de sangue e penas em crescimento de ninhegos de colhereiro coletadas em sete colônias reprodutivas brasileiras. N: número de amostras coletadas. O sexo foi determinado molecularmente (ver secção *Sexagem Molecular*). * Um indivíduo não sexado.

POPULAÇÃO	N	ANO DE COLETA	FEMEAS	MACHOS
Baía de Gaíva (MT)	21	2003	8	12*
Quilú (MT)	2	2003	1	1
Fazenda Camalote (MT)	2	2003	1	1
Fazenda Ipiranga (MT)	8	2003	4	4
Porto da Fazenda (MT)	8	2000	3	5
Fazenda Retirinho (MS)	18	1999	10	8
Banhado do Taim (RS)	13	2002	5	7*
TOTAL	72		32	38

Tabela II. Locais de coleta de amostras de penas de indivíduos adultos de colhereiro coletadas no solo de seis colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro. N: número de amostras coletadas. O sexo foi determinado molecularmente (ver secção *Sexagem Molecular*). * Alguns indivíduos não sexados.

POPULAÇÃO	N	ANO DE COLETA	FEMEAS	MACHOS
Baia de Gaiva (MT)	30	2003	15	14*
Quilú (MT)	6	2003	4	2
Fazenda Camalote (MT)	15	2003	6	9
Fazenda Ipiranga (MT)	7	2003	4	3
Fazenda Ipiranga (MT)	6	2004	2	3*
São Bom Jesus (MT)	33	2003	15	15*
TOTAL	97		46	46



Figura 7. Pena de muda de colhereiro com coloração carmesim escura, característica dos adultos, coletada no solo das colônias reprodutivas.

4.2 Extração de DNA de sangue e penas em crescimento

O DNA do sangue e das penas em crescimento foi extraído pelo método convencional de fenol-clorofórmio (Sambrook e cols., 2001). Utilizaram-se 30µl de papa de hemácias ou 100 µl do conteúdo das penas em crescimento, aos quais foram adicionados 220µl de tampão de lise (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 e KCl 50mM) e 0,15 mg. de proteinase K e a mistura foi homogeneizada. Após homogeneização, a solução foi incubada em banho-maria por 12 horas a uma temperatura de 55°C. A extração iniciou-se com a adição de 250µl de fenol em cada microtubo e a agitação por 10 min, seguida de centrifugação por 10 min a

12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e misturado com uma solução de fenol-clorofórmio 1:1 (250µl por tubo). A mistura foi agitada vagarosamente por 10 min. e centrifugada por 10 min a 12.000rpm. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para tubo estéril e acrescido de uma mistura de 250µl de clorofórmio-isoamilico 24:1. A pós vagarosa agitação por 10 min e centrifugação por 10 min a 12.000 rpm., os sobrenadantes resultantes desse último passo foram transferidos para tubos limpos, aos quais se adicionou acetato de sódio 3M (10% do volume) e 250% do volume de etanol absoluto gelado. Após leve agitação e centrifugação por 10 min a 12.000 rpm., o sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado a temperatura ambiente a fim de que o etanol evaporasse. Após esse processo foram acrescentados entre 100 a 200µl de água destilada para que o DNA fosse re-suspendido.

A quantificação das amostras de DNA foi realizada utilizando um espectrofotômetro (Beckman, DU 520, com lâmpada UV). Depois de quantificadas, as amostras foram diluídas em água destilada a fim de se obter uma concentração de DNA de 40ng/µl por amostra. O DNA diluído foi estocado em freezer a -20°C.

4.3 Extração de DNA de penas de muda

Neste trabalho, padronizou-se o protocolo de extração de DNA de penas de muda dos indivíduos adultos, coletadas no solo das colônias reprodutivas. Para obtenção de uma boa quantidade de DNA, com qualidade suficiente para a posterior amplificação dos marcadores moleculares escolhidos foi usada uma parte da pena aonde se encontra um coágulo de sangue, resultante do desenvolvimento da mesma (Fig. 8). Hórvath e cols. (2005) descreveram essa região como boa fonte de DNA para estudos não-invasivos em águias imperiais espanholas (*Aquila heliaca*). No protocolo padronizado no presente trabalho o procedimento de extração de DNA reportado por esses autores foi modificado e testado com penas de colhereiro.

As penas foram limpas com a ajuda de uma escova de dentes embebida em álcool 70% até que não restasse qualquer sujeira visível. Cortou-se a região que se estende desde a ponta da pena até o umbílico superior, aonde se encontra um coágulo de sangue, aproximadamente uns 5 cm. O material foi picado (~150 mg. de pena) e colocado em microtubos de 2ml. Adicionaram-se 500µl de solução de extração (1XTNE: H₂O; Tris-HCl 50mM; NaCl 100mM; EDTA 6.3mM pH7.5); 0,30 mg. de Proteinase K e 8µl de SDS 25%. Em seguida, a mistura foi incubada à 37°C em banho-maria durante a noite. No dia seguinte, foram adicionados mais 0,20 mg de Proteinase K à mistura a qual foi agitada vagarosamente em agitador orbital à temperatura ambiente durante uma hora. Após esse passo, a mistura foi retornada ao banho-maria por 24 horas. O procedimento de adição de enzima e agitação foi repetido durante 7 dias. Após esse período, o tecido da pena foi dissolvido pela atividade enzimática, tornando a solução viscosa e esbranquiçada. A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo convencional de extração com fenol: clorofórmio (Sambrook e cols., 2001). Após precipitação e secagem o DNA foi re-suspendido em água destilada estéril e quantificado. Diluições do DNA estoque foram feitas na concentração de 40 ng/µl.

4.4 Amplificação dos locos de microssatélites

Foram testados quatro locos de microssatélites descritos para *P. ajaja* por Sawyer (2002): Ajµ1, Ajµ2, Ajµ3 e Ajµ5. Além disso, foram testados 13 oligonucleotídeos iniciadores heterólogos descritos para descritos para cabeça-seca (*Mycteria americana*), espécie pertencente à mesma ordem do que colhereiro (Van Den Bussche e cols., 1999; Tomasulo-Seccomandi e cols., 2003) (Tabela III).

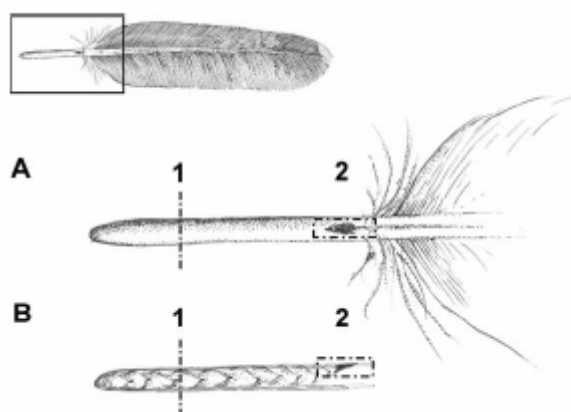


Figura 8. Ilustração de uma pena típica de ave. A) Detalhe da vista posterior da base da pena. B) Corte longitudinal do *calamus*. São mostradas as duas áreas utilizadas para extração de DNA: 1: parte basal do *calamus* e 2: coágulo de sangue no umbílico superior (extraído de Horváth e cols., 2005). A região 2 foi utilizada neste trabalho.

A amplificação usando oligonucleotídeos heterólogos na espécie estudada foi otimizada testando-se várias condições de reação e vários ciclos de PCR nos quais foram modificadas temperatura e tempo de duração de cada passo, assim como o número de ciclos. As condições de amplificação mais eficientes foram obtidas num volume final de 25 μ l com os seguintes reagentes: 10 mM Tris (pH 8.4), 50 mM KCl, 2,5 mM $Mg^{2+}Cl_2$, 0,25 mM dNTPs, 1 U *Taq* DNA polimerase (Biotools), 10 μ M de cada iniciador (*forward* e *reverse*), 50 μ g.de BSA (albumina de soro bovino) e 120 ng de DNA genômico como molde. Os programas de PCR padronizados foram os seguintes: um ciclo de desnaturação a 96°C por 5 min., seguido de 20 ciclos a 96°C por 45 seg, 30 seg à temperatura de hibridação (ver Tabela III), e um passo de extensão de 90 seg à 72°C; 10 ciclos à 96°C por 45 seg, 30 seg à temperatura de hibridação -0,5°C por ciclo (*touchdown*), e um passo de extensão de 90 seg a 72°C; seguidos de 10 ciclos a 96°C por 45 seg, 30 seg a 55°C, 53°C ou 50°C (dependendo do iniciador), e um passo de extensão de 90 seg a 72°C. Todas as reações foram terminadas com um passo de extensão final de 5 min a 72°C.

Tabela III. Oligonucleotídeos iniciadores de replicação testados em colhereiro.

Loco	Seqüência do iniciador <i>forward</i> (5'-3')	Temp. de hibridação	Seqüência repetitiva	Ref†.
WS μ 03	AGAAGCCAAATTGATTAGA	60°C	(AG) ₁₂	2
WS μ 04	TCATGTGTACACATAGGAAAAAGT	60°C	(GT) ₁₅	1
WS μ 06	AGTACATGAGGAGATGGAAGTCTG	60°C	(GT) ₁₄	1
WS μ 08	TGTCTTTCCAGGTAGTTTT	60°C	(AC) ₉	2
WS μ 09	GGTAACAGCGAGTTGGAT	60°C	(AAC) ₇	2
WS μ 13	AGGGTCATCAATAGTGT	60°C	(AC) ₁₀	2
WS μ 14	AAATGAGCACGGTATT	60°C	(AAGG) ₇	2
WS μ 17	GGCAAGCTGTTATAQCTAAT	60°C	(AAGG) ₉ (AAAG) ₅	2
WS μ 18	CATATACTAACTGGGTTTAATC	55°C	(AAGG) ₆ (AAAG) ₅ (AAGG) ₈	2
WS μ 19	AACAAGTGGAGCATGTG	55°C	(AC) ₈	2
WS μ 20	CGGGCCTTTATCTATC	55°C	(AGAT) ₁₀	2
WS μ 23	TTTTGGTGGGATTCATA	55°C	(AGAT) ₆	2
WS μ 24	GTAAGGCATGAGAGACTAAG	55°C	(AG) ₁₃	2
Aaj μ 1	GATCACCACCATCTTAAATGATAA	55°C	(GAT) ₁₅	3
Aaj μ 2	CTTGATGCAAAGGAAACATCC	55°C	(AACT) ₁₃ TA(CTTT) ₆ CT(CTTT) ₃	3
Aaj μ 3	CCCATGGCCACATTATAAACTT	55°C	(GAT) ₁₃	3
Aaj μ 5	GGCTGAACACTGTTGTGCTCT	58°C	(GAT) ₂ T(GAT) ₁₅	3

†1 Van Den Bussche e cols. 1999

2 Tomasulo-Seccomandi e cols. 2003

3 Sawyer, 2002

As reações de PCR com oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos “Aaj” foram padronizadas num volume final de 25 μ l utilizando: 10 mM Tris (pH 8,4), 50 mM KCl, 50 μ g de BSA, 2,5 mM Mg²⁺Cl₂, 0,25 mM dNTPs, 0,5 U *Taq* DNA polimerase, 0,1mM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e 120 ng de DNA genômico. Os programas do termociclador incluíram: um passo de desnaturação à 96°C por 5 min, seguidos de 10 ciclos à 96°C por 45 seg, mais 45 seg nas temperaturas de hibridação correspondentes e um min à 72°C; mais 10 ciclos à 96°C por 30 seg, 30 seg às temperaturas de hibridação (-0,5°C por ciclo programa “touchdown”) e um min. a 72°C; e mais 10 ciclos à 96°C por 30 seg, 50°C ou 53°C (dependendo do iniciador) por 30 seg e um min.a 72°C Todos os ciclos foram terminados com um passo de extensão final de 10 minutos à 72°C. As reações foram

realizadas num termociclador GeneAmp® 2400 PCR System (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 3% corados com brometo de etideo.

Os oligonucleotídeos iniciadores “forward” usados portavam marcação fluorescente o que permitiu a identificação dos genótipos dos indivíduos em cada loco por eletroforese capilar, utilizando o sistema MegaBACE™1000 (Amersham Biosciences). Os eletroferogramas foram analisados pelo *software* GeneticProfiler usando MegaBACE™ ET Size Standard (Amersham Biosciences) marcado com ROX como marcador padrão interno.

4.5 Sexagem Molecular

A sexagem molecular foi realizada segundo o método de Griffiths e cols. (1998) a partir do DNA extraído das amostras de sangue, penas em crescimento e penas coletadas no solo das colônias reprodutivas. As amplificações do intron do gene CHD (Griffiths e cols., 1998) foram feitas utilizando oligonucleotídeos iniciadores P₂ e P₈ e um volume final de 10 µl. contendo: 50 mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 8,3); 2,25mM Mg²⁺Cl₂; 50µg de BSA; 0,25mM de cada dNTP; 10µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*), 1 U de *Taq* polimerase (Biotools) e 120 ng de DNA genômico como molde. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador GeneAmp® 2400 PCR System (Applied Biosystems), com um passo de desnaturação a 94°C (4 min), cinco ciclos a 94°C (30 seg.), 47°C (30 s) e 72°C (30 seg.), seguidos de 35 ciclos a 94°C (30 seg.), 47°C (20 seg.) e 72°C (20 seg.) e um passo final de extensão a 72°C (5 min). Os produtos de PCR foram visualizados em géis de poliacrilamida 10% corados com nitrato de prata.

4.6 Análise de dados

4.6.1 Estimativas de variabilidade genética

Para realizar as análises das estimativas de variabilidade genética foram excluídos: sete indivíduos de Baía de Gaíva, dois de Fazenda Ipiranga, dois de Porto da Fazenda, três de Fazenda Retirinho e três da colônia de Rio Grande do Sul, por terem sido capturados no mesmo ninho e, por tanto, considerados aparentados com outros indivíduos da mesma colônia. Além disso, um indivíduo de Baía de Gaíva foi excluído porque não foi possível genotipá-lo para a maioria dos locos. Esse indivíduo foi achado morto e o seu DNA pode ter se encontrado muito degradado para a amplificação dos microssatélites. As amostras de Quilú e Fazenda Camalote, com só dois ou três indivíduos que provinham do mesmo ninho, também foram excluídas para as análises das estimativas de variabilidade genética.

As frequências alélicas, a heterozigosidade esperada (H_e) e a observada (H_o) foram calculadas usando o programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). A riqueza alélica foi calculada segundo El Mousadik e Petit (1996) utilizando-se o software FSTAT (versão 2.3.9.2, Goudet, 2001). O programa BIOSTAT 3.0 (Ayres e cols., 2003) foi utilizado para realizar análise de regressão linear simples entre o número de alelos por loco e o tamanho amostral. Testou-se a hipótese de Equilíbrio de Hardy-Weinberg mediante o teste exato (Haldane, 1954, Weir, 1990, Guo e Thompson, 1992), com ajuda do programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). As significâncias das diferenças entre os valores observados e os esperados das frequências genotípicas foram testadas pelo mesmo software segundo Weir e Cockerham (1984) e Robertson e Hill (1984). O Desequilíbrio de Fase Gamética entre os locos analisados foi verificado utilizando-se também o pacote GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) o qual checa se os genótipos de um dado loco são independentes dos genótipos de outro loco. O mesmo programa foi utilizado para o cálculo do número de migrantes por geração (N_m) segundo Slatkin (1985) e corrigido segundo Barton e Slatkin (1986). O estimador θ , do parâmetro F_{ST} ($1 - H_s/H_t$) foi determinado de acordo com Weir e Cockerham (1984), com ajuda do programa FSTAT versão 2.3.9.2

(Goudet, 2001). O estimador R_{ST} foi calculado segundo Rousset (1996) pelo programa GENEPOP. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC, Bolstein, 1980) por loco foi calculado usando-se o programa CERVUS (Marshall, 1998). As heterozigosidades foram comparadas com os valores observados por Sawyer (2002) mediante o teste G de contingência (Zar, 1996), calculado pelo programa BIOSTAT 3.0 (Ayres e cols., 2003).

Os níveis de estruturação genética nas populações estudadas foram avaliados pela Análise de Variância Molecular (AMOVA, Excoffier e cols., 1992), com ajuda do “software” ARLEQUIN (Schneider e cols., 2000). Essa análise está baseada na variação das frequências alélicas e leva em conta o número de mutações entre os diferentes haplótipos encontrados nas populações, considerando uma estruturação populacional pré-definida que é testada pelo *software*. Os componentes da variância molecular foram explicados pelas diferenças intra-individuais, inter-individuais e inter-populacionais.

As distâncias genéticas entre as cinco colônias estudadas foram calculadas segundo Nei (1978), com ajuda do programa Dispan (Ota, 1993). Essas distâncias foram utilizadas para a construção de uma árvore pelo método de UPGMA (Sneath e Sokal, 1973), facilitando a visualização das relações genéticas entre as ditas colônias.

Análises de alocação dos adultos amostrados não-invasivamente às populações aonde as amostras de pena foram coletadas foram realizadas com auxílio do programa GENECLASS versão 2 (Piry e cols., 2004). Esse programa leva em conta os genótipos multi-locos e as frequências alélicas para alocar indivíduos nas populações de origem.

4.6.2 Validação da amostragem não-invasiva

Os programas API-CALC (Ayres e Overall, 2004) e GENECAP (Willberg e Dreher, 2004) foram empregados no cálculo das Probabilidades de Identidade (PI), levando

em conta diferentes parâmetros populacionais. O programa API-CALC (Ayres e Overall, 2004) calcula PI usando a fórmula de Paetkau e Strobeck (1994) modificada, para levar em conta os efeitos de estruturação populacional e a presença de indivíduos possivelmente aparentados na amostra. O programa GENECAAP calcula a probabilidade de diferentes indivíduos de a mesma população compartilhar genótipos segundo Paetkau e Strobeck (1994). A probabilidade para todos os locos foi calculada multiplicando-se as probabilidades individuais.

4.6.3 Estimativas de parentesco genético entre ninhegos

Os valores de parentesco genético entre os indivíduos de cada colônia foram estimados mediante a estatística r (Queller e Goodnight, 1989), definida como a probabilidade de um alelo do indivíduo x ser idêntico por descendência a um alelo do indivíduo y . Nesta análise foi utilizado o programa RELATEDNESS 5.0.8 (Queller e Goodnight, 1989). O programa calcula r dando pesos diferentes a cada alelo, isto é, os valores dos alelos são inversamente proporcionais às suas frequências na população, de maneira que alelos raros têm maior peso (Queller and Goodnight, 1989). A fórmula geral derivada pelos autores é:

$$r = \frac{\sum_x \sum_k \sum_l (P_y - P^*)}{\sum_x \sum_k \sum_l (P_x - P^*)}$$

onde, P_x é a frequência do alelo encontrado no loco k e posição alélica l ; P_y é a frequência do mesmo alelo em um grupo de indivíduos encontrados na mesma população onde está inserido o indivíduo x ; e P^* é a frequência do alelo na população em conjunto, excluindo da mesma todos os possíveis parentes de x (Queller e Goodnight, 1989). Os valores teóricos esperados

de r são 0,5 (irmãos completos), 0,25 (meio irmãos) e 0,0 (indivíduos não relacionados). Valores negativos de r podem ocorrer se as frequências gênicas dos indivíduos comparados diferirem em direção oposta com relação à média populacional (Queller e Goodnight, 1989).

Para estimar a significância estatística dos valores de r calculados pelo programa acima, foram feitas várias simulações de valores de parentesco esperados para duplas geradas ao acaso, levando-se em conta as frequências alélicas observadas em filhotes (excluindo-se os pares encontrados nos mesmos ninhos) nas colônias amostradas (1000 simulações) no programa KINSHIP 1.3.1 (Goodnight e Queller, 1999). Este programa calcula a probabilidade de dois indivíduos estarem relacionados segundo hipóteses primárias escolhidas pelo pesquisador versus uma hipótese nula de não relacionamento. O valor dessa probabilidade é apresentado como LOD (probabilidade da hipótese primária/ probabilidade da hipótese nula). Valores altos de LOD favorecem a hipótese primária, enquanto que valores baixos rejeitam a hipótese primária em favor da hipótese nula. Nas hipóteses primárias testadas neste trabalho, os indivíduos achados no mesmo ninho foram considerados como meio irmãos ($r_m=r_p= 0,25$) ou irmãos completos ($r_m=r_p= 0,5$) (dois testes de hipóteses independentes), enquanto que na hipótese nula os indivíduos foram considerados como não relacionados ($r_m=r_p= 0,0$).

4.6.4 Padrões de dispersão natal

O comportamento dispersivo dos colhereiros foi examinado, de maneira indireta, segundo proposta de Goudet e cols. (2002). Várias estimativas da distribuição da variabilidade genética foram determinadas separadamente para amostras de machos e fêmeas adultos de uma mesma colônia. Os genótipos nos seis locos de microsatélites foram identificados a partir do DNA extraído das penas da muda dos adultos e usados no cálculo dos testes de média da alocação ($mAlc$); variância da alocação ($vAlc$); F_{ST} ; F_{IS} e diversidade

gênica (H_s). O programa FSTAT versão 2.9.3.2 (Goudet, 2001) foi usado no cálculo de todas as estimativas para ambos os sexos e nas comparações entre elas. Todos os testes realizados foram unicaudais com 10.000 randomizações.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Amostragem não-invasiva de adultos de colhereiro

No presente trabalho foi utilizada pela primeira vez uma abordagem não-invasiva para amostrar populações de indivíduos adultos de colhereiros presentes nas colônias reprodutivas. Penas perdidas durante a muda reprodutiva, de coloração rosa-carmesim, foram coletadas no solo das colônias visitadas para a identificação dos genótipos dos indivíduos adultos, (i.e., os parentais dos ninhegos presentes nas colônias). O protocolo de extração de DNA dessas penas foi padronizado neste trabalho e resultou na obtenção de material de boa qualidade para a posterior amplificação dos marcadores escolhidos (ver seções 5.2 e 5.3). Em média, cada pena rendeu 1200 ng. de DNA, com pouca ou nenhuma degradação (Fig. 9).

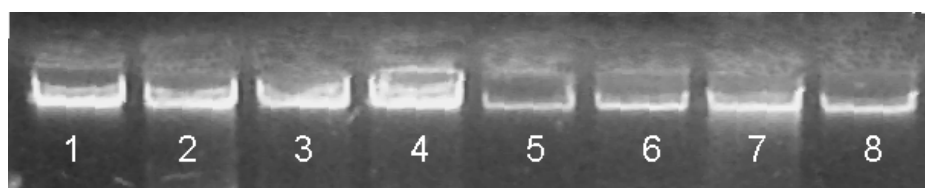


Figura 9. Fotografia de gel de agarose 1,5% no qual se mostra o DNA genômico extraído de penas de muda de adultos de colhereiro coletadas no solo das colônias reprodutivas brasileiras. Linhas 1 a 7: DNA extraído de penas; Linha 8: DNA extraído de sangue com concentração de 40ng/ μ l (controle de rendimento).

A sexagem molecular, utilizando DNA extraído de pena ou sangue, foi realizada pela amplificação do gene CHD, segundo o método de Griffiths e cols. (1998). A amplificação nos machos, o sexo homogamético nas aves, resultou na amplificação de um fragmento Z-específico de 390 pares de bases e, nas fêmeas, de dois fragmentos, um de 390 pb Z-específico e outro de 396 pares de bases W-específico (Figura 10), esperado para o sexo heterogamético.

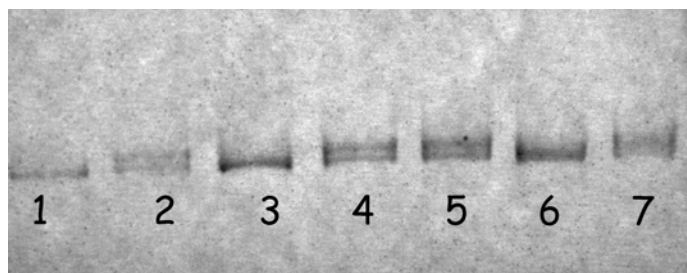


Figura 10. Fotografia de um fragmento de gel de poliacrilamida 10% mostrando os padrões de amplificação do gene CHD em machos (390 pb, linhas 1, 3 e 6) e fêmeas (390 e 396 pb, linhas 2, 4, 5 e 7) em colhereiro.

Em estudos de genética de populações nos quais se utiliza a amostragem não-invasiva, é importante conhecer o poder do conjunto de marcadores escolhidos para identificar corretamente aos indivíduos, a fim de que as posteriores análises dos resultados não sejam inadequadamente realizadas. A Probabilidade de Identidade (PI) é uma medida que estima esse poder para a identificação de indivíduos na população. Neste trabalho, a PI segundo Paetkau e Strobeck (1994) calculada considerando somente os locos específicos foi de 0,00015. A Probabilidade Total de Identidade (P_{ave}), calculada mediante a formulação utilizada no software API-CALC (Ayres e Overall, 2004), considerando ausência de estruturação populacional, foi de 0.000000243. A tabela IV mostra os valores de probabilidades acumulativas observadas nos seis locos, calculadas pelo mesmo método. A Probabilidade Cumulativa Total foi 0.0000016. Esses valores expressam o alto grau de discriminação dos genótipos nesses locos como observado qualitativamente na análise de 30 penas da muda reprodutiva dos colhereiros adultos coletadas no solo da colônia São Bom Jesus, as quais apresentaram cada um delas um genótipo distinto nos seis locos de microssatélites (Apêndice 1).

Tabela IV. Probabilidades de Identidade (PI) acumulativas e total, nos seis locos de microssatélites, para as amostras de pena coletadas no solo de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

Locos	Probabilidade de Idenidade Acumulativa
Aaj1	0.038113
Aaj1, Aaj3	0.001914
Aaj1, Aaj3, Aaj2	0.000164
Aaj1, Aaj3, Aaj2, Aaj5	0.000027
Aaj1, Aaj3, Aaj2, Aaj5, WS03	0.000005
Aaj1, Aaj3, Aaj2, Aaj5, WS03, WS09	0.000002
Probabilidade de Identidade total	0.0000016

5.2 Estimativas de variabilidade genética

Dos 13 locos heterólogos testados somente dois mostraram-se polimórficos após identificação dos genótipos mediante eletroforese capilar em seqüenciador automático. Nos locos WS04 e WS20 foi observada amplificação de fragmentos de tamanho esperado, mas ambos se apresentaram monomórficos após genotipagem em eletroforese capilar (Fig.11). Os locos variáveis foram o WS03, que apresentou três alelos (170, 173 e 176 pb), e o loco WS09, que apresentou dois alelos (271 e 273 pb). A figura 12 mostra os eletroferogramas que confirmaram o polimorfismo nesses dois locos, WS03 e WS09. Quando a análise no loco WS09 foi expandida para um número maior de amostras verificou-se que o loco se comportava como monomórfico em quatro das cinco colônias analisadas, sendo polimórfico apenas na colônia São Bom Jesus e, por esse motivo, foi excluído das estimativas de variabilidade genética posteriores. Com os outros locos heterólogos, numerosas tentativas foram realizadas modificando-se as concentrações de co-fator da enzima (magnésio), *primers*, enzima polimerase e reagentes estabilizantes (BSA, DMSO, detergentes), mas não se obteve sucesso na amplificação nos locos WS06, WS08, WS13, WS14, WS17, WS18, WS19, WS23 e WS24.

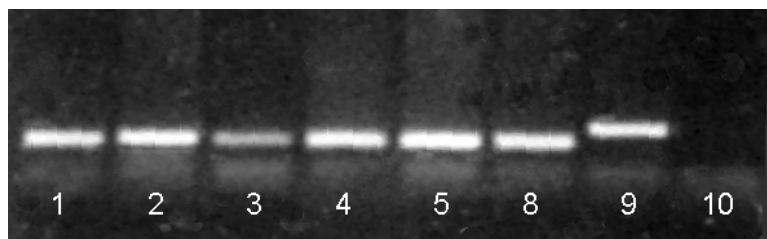


Figura 11. Fotografia de um gel de agarose 3% no qual se mostram os fragmentos obtidos na amplificação usando iniciadores heterólogos para o loco WS04 em colhereiro. Linhas 1 a 8: colhereiro, linha 9: cabeça-seca (controle de amplificação), linha 10: controle de contaminação (sem DNA).

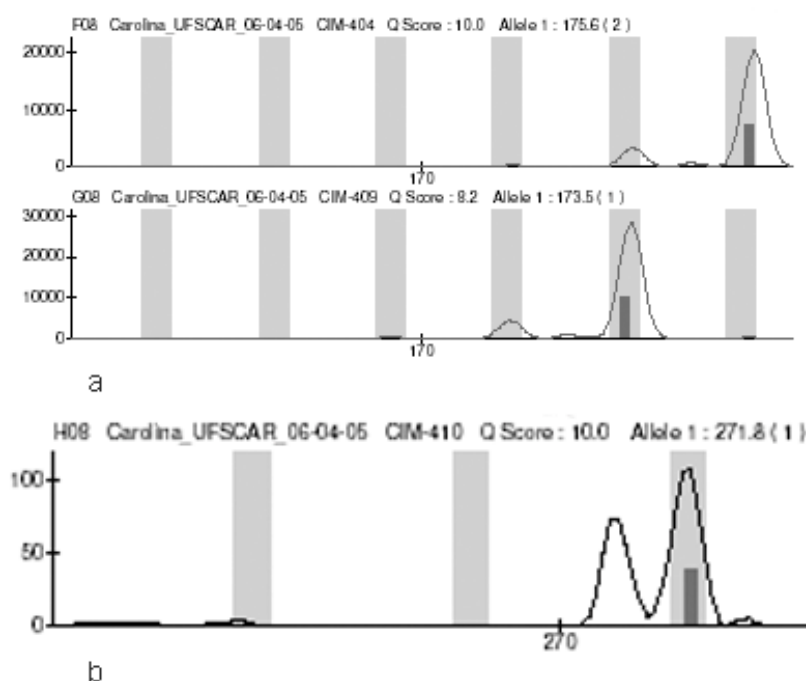


Figura 12. Eletroferogramas mostrando os padrões de amplificação nos locos heterólogos WS03 (a) e WS09 (b) em colhereiro.

Nos quatro locos de microssatélites previamente isolados no colhereiro por Sawyer (2002), as amostras testadas se mostraram polimórficas em todas as colônias analisadas. Como exemplo, a figura 13 mostra os padrões de amplificação do loco Aaj3 visualizados em eletroforese em gel de agarose 3%.

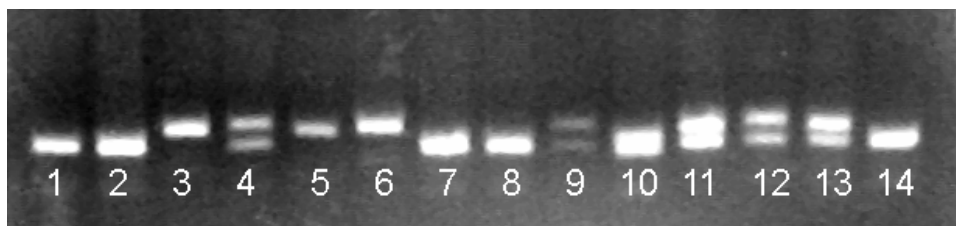


Figura 13. Fotografia de um gel de agarose 3% no qual se mostram os fragmentos de amplificação do loco Aaj3 em colhereiro. Linhas. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 14: indivíduos homozigotos. Linhas. 4, 9, 10, 11, 12 e 13: indivíduos heterozigotos.

Tabela V. Locos de microssatélites utilizados na análise de variabilidade genética das colônias reprodutivas de colhereiro. Na: número de alelos por loco, PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica.

Loco	Na	PIC	Tamanho dos fragmentos	Referência
WS03	3	0.369	170-176	Tomasulo-Seccomandi e cols, 2003
WS09	2	0.020	273-276	Tomasulo-Seccomandi e cols, 2003
Aajμ 1	10	0.785	157-184	Sawyer, 2002
Aajμ 2	9	0.682	165-245	Sawyer, 2002
Aajμ 3	7	0.611	137-203	Sawyer, 2002
Aajμ 5	5	0.380	164-215	Sawyer, 2002

Considerando todos os locos, o número de alelos por loco variou desde 2 (WS09) até 10 (Aaj1) (Tabela V). No total, 34 alelos foram detectados em todas as colônias. Um mínimo de 17 alelos foi detectado tanto na colônia Fazenda Ipiranga quanto em Porto da Fazenda, enquanto que, o maior número de alelos foi observado em Baía de Gaíva (26 alelos). Oito alelos foram privados, ou seja, ocorreram somente numa colônia: quatro em Baía de Gaíva e três em Fazenda Retirinho e um em Banhado do Taim (Tabela VI). A figura 14 mostra graficamente a distribuição dos alelos em cada colônia reprodutiva.

Os valores médios de diversidade alélica variaram desde 2.69 até 3.04 nas colônias estudadas (Tabela VII). A heterozigosidade média observada (H_o) para todas as colônias incluindo os cinco locos foi de 0.575. A heterozigosidade média para cada colônia variou desde 0.499 (Fazenda Ipiranga) até 0.712 (Porto da Fazenda) (Tabela VII). As heterozigosidades médias observadas por loco foram: 0.768 (Aajμ1), 0.622 (Aajμ2), 0.637 (Aajμ3), 0.491 (Aajμ5), e 0.360 (WS03). O número médio de alelos por loco está relacionado positivamente ao tamanho amostral ($F = 1071.02$, $P = 0.001$) segundo teste de regressão

linear simples. Excluindo o loco heterólogo (WS03), a heterozigosidade média observada foi de 0,630.

As estimativas de F_{IS} (Tabela VII) para cada colônia não diferiram significativamente de zero ($P > 0.05$), o qual revela que as freqüências genótípicas estão de acordo com o esperado para uma população com acasalamento ao acaso (Hartl e Clark, 1997).

Uma primeira análise de estatística F foi feita para verificar se havia estruturação genética nas populações estudadas, considerando-se o conjunto de todas as colônias. O F_{ST} global não foi significativo ($F_{ST}: -0.002, P: 0,59$) (Tabela VIII). Com o intuito evidenciar algum tipo de estruturação não detectado nessa análise geral, agrupou-se as colônias do Pantanal (Baia de Gaíva, Fazenda Ipiranga, Fazenda Retirinho e Porto da Fazenda) e compararam-se com a população da colônia geograficamente mais distante, Banhado do Taim (Rio Grande do Sul). O valor de F_{ST} também nesse caso não diferiu de zero ($F_{ST}: -0.00168; P: 0,60$). Numa análise comparativa entre os pares de colônias, os valores de F_{ST} variaram desde -0.020 (Fazenda Ipiranga vs. Porto da Fazenda) até 0.015 (Baia de Gaíva vs. Banhado de Taim), não sendo diferindo significativamente de zero ($P > 0.05$). Os valores de R_{ST} também foram baixos e não significativos. Em resumo, não foi encontrada nenhuma evidência de estruturação populacional significativa nas amostras estudadas.

O número de migrantes por geração (Nm), calculado corrigindo-se para o tamanho amostral, foi de 4,29.

Tabela VI. Frequências alélicas nos seis locos de microssatélites analisados nas amostras de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

População	Baia de Gaíva	Fazenda Ipiranga	Porto da Fazenda	Fazenda Retirinho	Banhado do Taim (RS)
Loco WS03					
Alelo 170	0.000	0.000	0.000	0.036*	0.000
Alelo 173	0.300	0.417	0.300	0.321	0.458
Alelo 176	0.700	0.583	0.700	0.643	0.542
Aaju1					
Alelo 160	0.200	0.167	0.100	0.231	0.167
Alelo 163	0.133	0.167	0.100	0.269	0.167
Alelo 169	0.167	0.082	0.100	0.077	0
Alelo 172	0	0	0	0	0.083*
Alelo 175	0	0	0	0.077*	0
Alelo 178	0.200	0	0	0	0.083
Alelo 181	0.033	0	0	0.038	0
Alelo 184	0.167	0.417	0.400	0.308	0.458
Alelo 187	0.033	0	0	0	0
Alelo 190	0.067	0.167	0.300	0	0.042
Aaju 2					
Alelo 225	0	0	0	0.033*	0
Alelo 227	0.036	0	0	0.067	0
Alelo 229	0.071*	0	0	0	0
Alelo 233	0.179	0.167	0.125	0.200	0.167
Alelo 237	0	0	0.125	0.033	0.042
Alelo 241	0.071	0	0	0.033	0.083
Alelo 245	0.500	0.667	0.250	0.367	0.458
Alelo 249	0.143	0.083	0.250	0.267	0.250
Alelo 253	0	0.083	0.250	0	0
Aaju 3					
Alelo 170	0.071*	0	0	0	0
Alelo 173	0	0.084	0.250	0.067	0.250
Alelo 176	0.536	0.583	0.500	0.667	0.417
Alelo 197	0.143	0.250	0.250	0.067	0.125
Alelo 203	0.143	0.083	0	0.167	0.208
Alelo 206	0.036*	0	0	0	0
Alelo 209	0.071	0	0	0.032	0
Aaju 5					
Alelo 194	0.036	0	0	0	0.125
Alelo 197	0.036*	0	0	0	0
Alelo 200	0.321	0.083	0.333	0.133	0.167
Alelo 203	0.607	0.917	0.667	0.800	0.708
Alelo 209	0	0	0	0.067	0

* Alelo presente apenas nessa população

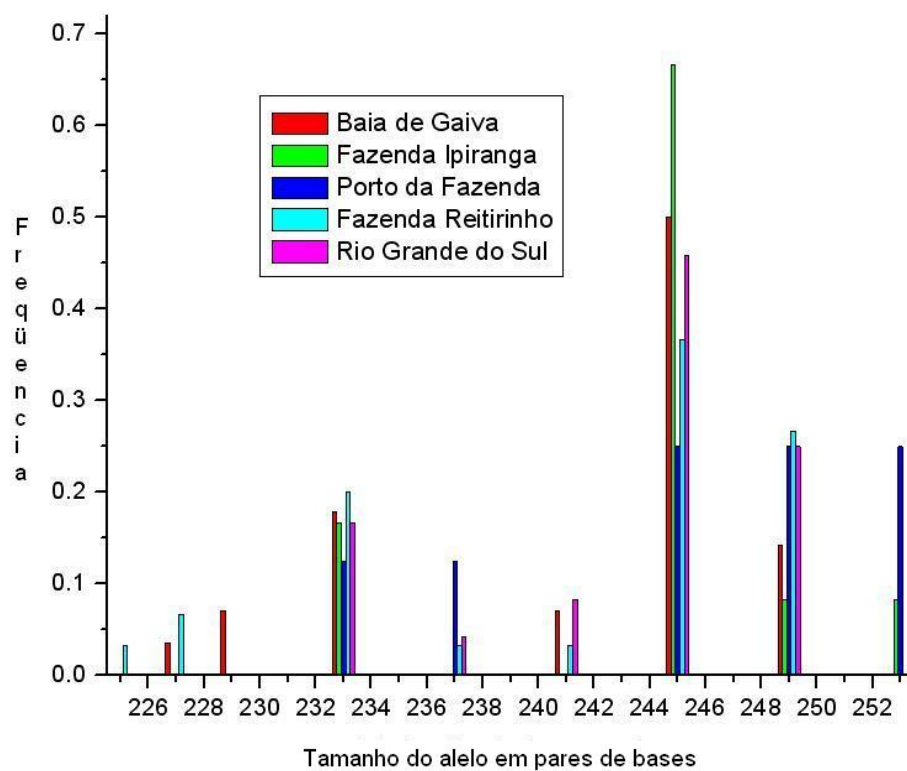
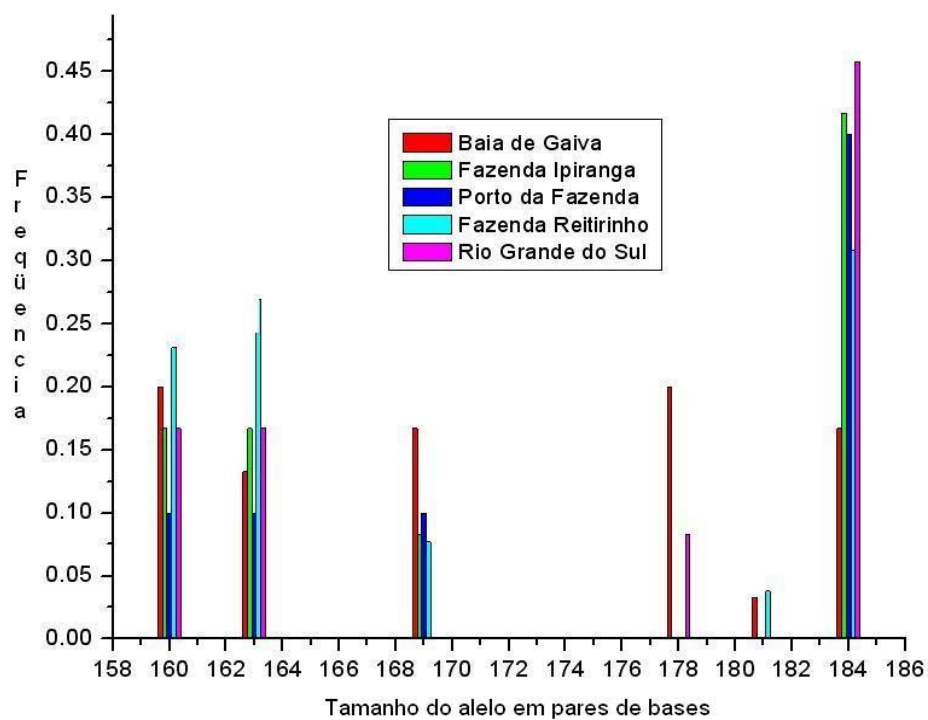


Figura 14. Distribuição das frequências alélicas dos locos de microsatélites Aaj1 e Aaj2 em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

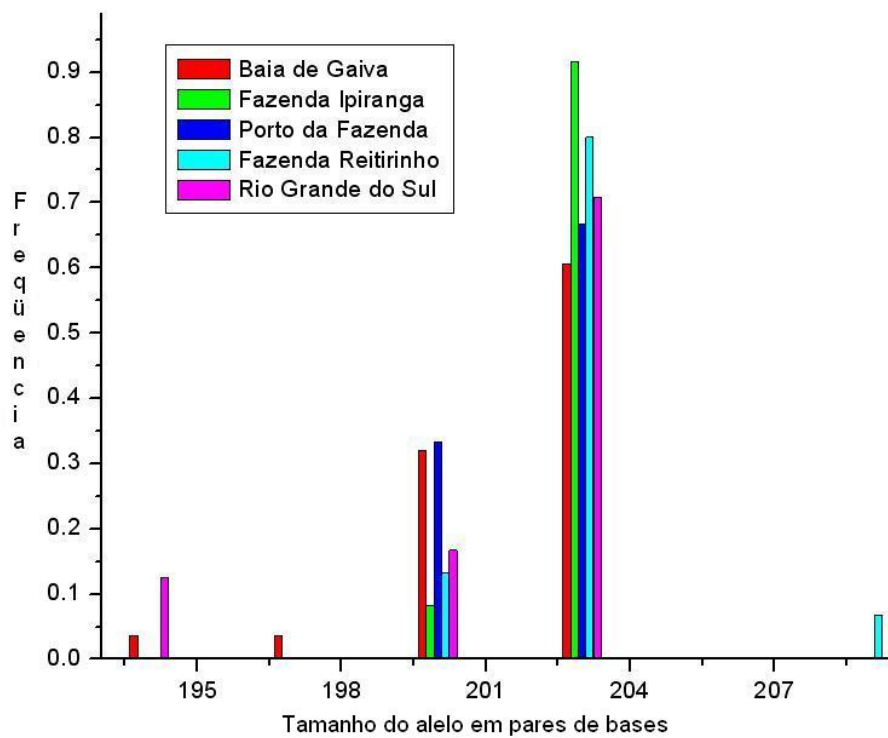
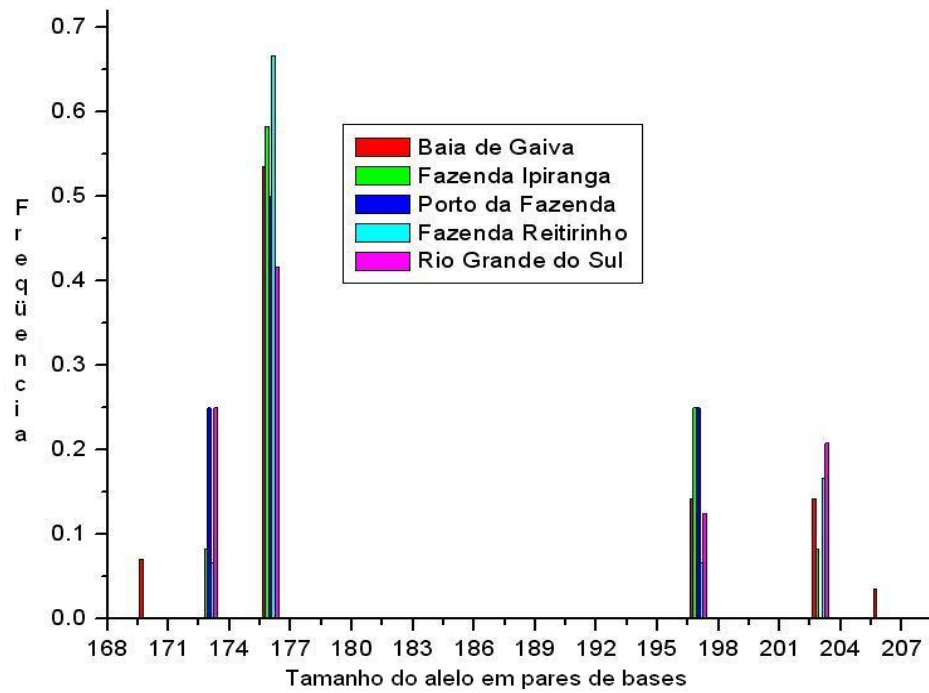


Figura 14 (cont.). Distribuição das frequências alélicas dos locos de microsatélites Aaj3 e Aaj5 em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

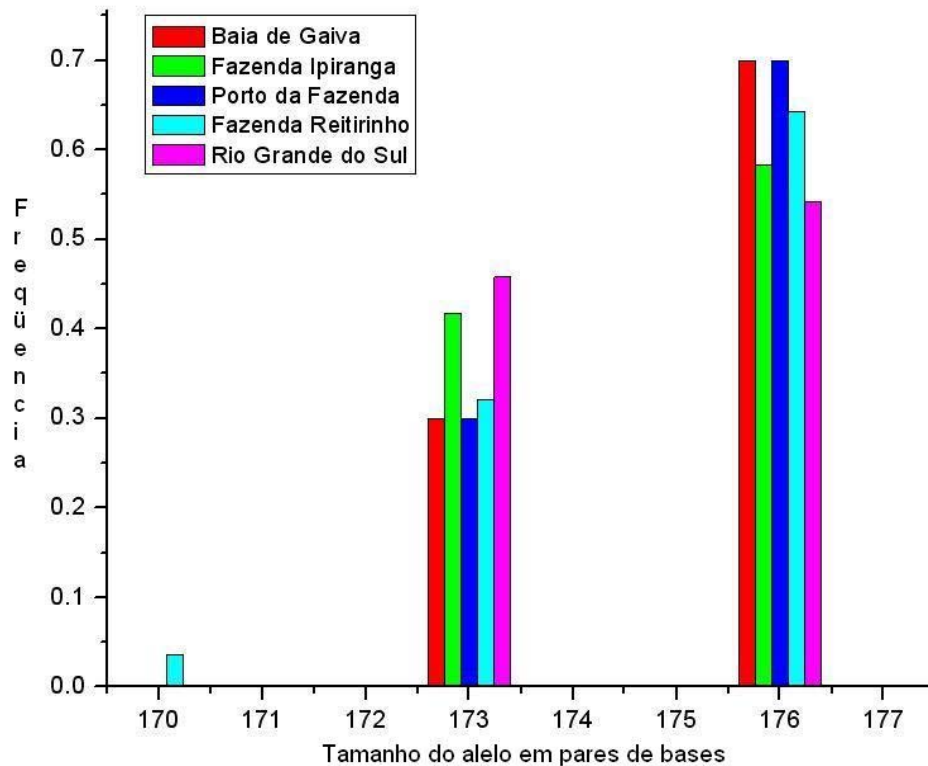


Figura 14 (cont.). Distribuição das frequências alélicas do loco de microssatélites WS03 em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

Tabela VIII. Valores de F_{ST} (Weir e Cokerham, 1984 abaixo a diagonal) e R_{ST} (Rousset, 1996; acima da diagonal) nas populações comparadas par-a-par, usando dados dos cinco locos polimórficos de microssatélites. Os maiores valores estão em negrito.

	<i>Baía de Gaíba</i>	<i>Fazenda Ipiranga</i>	<i>Porto da Fazenda</i>	<i>Fazenda Retirinho</i>	<i>Banhado do Taim</i>
Baía de Gaíba	*	-0.042	0.026	-0.017	-0.021
Fazenda Ipiranga	0.001	*	-0.048	0.005	-0.039
Porto da Fazenda	-0.011	-0.020	*	0.090	0.003
Fazenda Retirinho	0.005	-0.016	-0.007	*	0.012
Banhado do Taim	0.015	-0.016	-0.017	0.001	*

Em concordância com os resultados reportados acima, a AMOVA demonstrou que a maior parte da variação genética total presente nas colônias pode ser explicada pelas diferenças entre os indivíduos dentro de cada uma das populações (Tabela IX).

Tabela VII. Estimativas de diversidade genética baseadas em dados de cinco locos de microssatélites, em cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro.

População	Estimativa	Loco WS03	Loco Aaju1	Loco Aaju 2	Loco Aaju 3	Loco Aaju5	Média
Baia de Gaíva	<i>DG</i>	0.438	0.867	0.712	0.692	0.541	0.456
	<i>A</i>	1.908	4.328	3.359	3.273	2.355	3.044
	<i>He</i>	0.434	0.869	0.712	0.685	0.545	0.649
	<i>Ho</i>	0.333	0.933	0.714	0.500	0.643	0.624
	<i>F_{IS}</i>	0.239	-0.077	-0.004	0.279	-0.188	0.038
Fazenda Ipiranga	<i>DG</i>	0.567	0.817	0.550	0.617	0.167	0.449
	<i>A</i>	1.992	3.811	2.773	2.909	1.992	2.695
	<i>He</i>	0.621	0.879	0.667	0.636	0.318	0.624
	<i>Ho</i>	0.166	0.667	0.667	0.833	0.167	0.499
	<i>F_{IS}</i>	0.706	0.184	-0.212	-0.351	-0.000	0.080
Porto da Fazenda	<i>DG</i>	0.450	0.800	0.875	0.750	0.500	0.422
	<i>A</i>	1.967	3.762	4.393	2.929	2.000	3.010
	<i>He</i>	0.467	0.844	0.893	0.821	0.533	0.711
	<i>Ho</i>	0.667	0.800	1.000	0.500	0.667	0.712
	<i>F_{IS}</i>	-0.333	-0.000	-0.143	0.333	-0.333	-0.052
Fazenda Retirinho	<i>DG</i>	0.511	0.801	0.771	0.533	0.348	0.995
	<i>A</i>	2.142	3.695	3.567	2.632	1.978	2.800
	<i>He</i>	0.521	0.797	0.772	0.579	0.349	0.603
	<i>Ho</i>	0.214	0.692	0.800	0.600	0.400	0.541
	<i>F_{IS}</i>	0.581	0.136	-0.037	-0.125	-0.151	0.087
Banhado do Taim (RS)	<i>DG</i>	0.523	0.750	0.716	0.735	0.470	0.993
	<i>A</i>	1.984	3.553	3.257	3.235	2.309	2.867
	<i>He</i>	0.554	0.750	0.721	0.735	0.532	0.658
	<i>Ho</i>	0.417	0.750	0.833	0.750	0.583	0.666
	<i>F_{IS}</i>	0.203	-0.000	-0.164	-0.021	-0.242	-0.043
Total por loco	<i>Ho</i>	0,360	0,768	0,622	0,637	0,491	0,630

GD: Diversidade Gênica; *A*: Diversidade alélica; *H_E*: Heterozigosidade esperada; *H_O*: Heterozigosidade observada; *F_{IS}*: Weir e Cockerham, 1984.

Tabela IX Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total presente nas colônias reprodutivas de colhereiro.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem de Variação
Entre Grupos	2	2.506	0.00794	0.64
Entre Populações dentro de Grupos	2	2.191	-0.01004	-0.81
Dentro das populações	101	125.850	1.248604	100.17
Total	105	130.547	1.24395	

Índices de Fixação
F_{ST}: -0.00168
F_{SC}: -0.00812
F_{CT}: 0.00638

Distâncias genéticas (Nei, 1978) estimadas entre as colônias variaram entre - 0,052 e 0,028, valores esperados para distâncias entre populações de uma mesma espécie (Tabela X). A menor distância genética foi observada entre as colônias de Fazenda Ipiranga e Porto da Fazenda, e entre as colônias de Baía de Gaíva e Banhado do Taim foi observado o maior valor. Na Figura 14 estão representadas graficamente as relações genéticas entre as colônias numa árvore construída pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, Sneath e Sokal, 1973), com base nos valores das distâncias de Nei (1978).

Tabela X. Distâncias genéticas (Nei, 1978) (erro padrão) entre todos os pares de populações de colheiteiro analisadas, calculadas a partir das frequências alélicas nos cinco locos de microssatélites. O maior e o menor valor estão assinalados em negrito.

	Baía de Gaíva	Fazenda Ipiranga	Porto da Fazenda	Fazenda Retirinho	Banhado do Taim
Baía de Gaíva	*				
Fazenda Ipiranga	0,004 (0,028)	*			
Porto da Fazenda	-0,018 (0,033)	-0,052 (0,042)	*		
Fazenda Retirinho	0,009 (0,016)	-0,012 (0,020)	-0,021 (0,023)	*	
Banhado do Taim	0,028 (0,029)	-0,026 (0,017)	-0,041 (0,014)	0,000 (0,016)	*

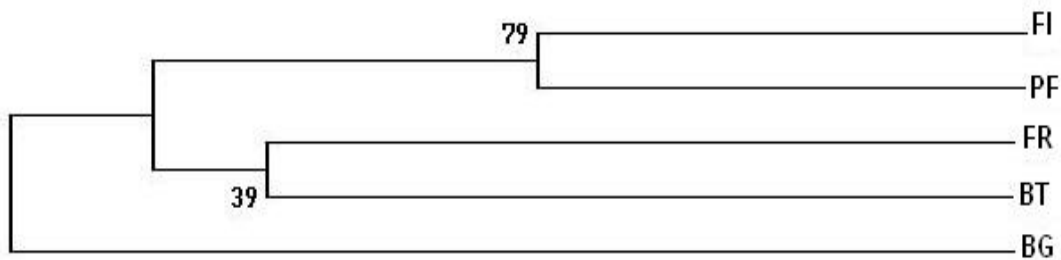


Figura 15. Árvore UPGMA (Sneath e Sokal, 1973) construída a partir das distâncias genéticas (Nei, 1978) estimadas usando frequências alélicas nos cinco locos de microssatélites, nas cinco populações das colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro. FI: Fazenda Ipiranga, PF: Porto da Fazenda, FR: Fazenda Retirinho, BT: Banhado do Taim, BG: Baía de Gaíva. Os números nos ramos indicam o nível de suporte de cada um deles (*bootstrap*).

Os testes de alocação dos indivíduos adultos aos locais nos quais as amostras de pena foram coletadas evidenciaram que 14,6% dos machos foram corretamente alocados nesses locais enquanto que 29,5% das fêmeas foram alocadas com sucesso.

5.3 Estimativas de parentesco genético entre ninhegos de colhereiro

Em uma primeira análise do parentesco genético (r) médio considerando todos os filhotes de colhereiro de cada colônia, excluindo os encontrados nos mesmos ninhos, não diferiu significativamente de zero ($r = -0.014 \pm 0.0003$, $n = 68$).

Com o intuito de inferir sobre o comportamento reprodutivo dos adultos na natureza foi estimado o parentesco genético (r) entre os pares de ninhegos amostrados no mesmo ninho, a partir dos genótipos identificados nos cinco locos polimórficos de microssatélites. A significância desses valores foi testada mediante valores de probabilidade (LOD) calculados com base das curvas de simulação dos valores de parentesco esperados para pares de indivíduos gerados ao acaso, levando-se em conta as frequências alélicas nas colônias amostradas. Nessa análise foram excluídos os filhotes encontrados no mesmo ninho, para evitar *bias* no resultado. As curvas teóricas apresentaram regiões de sobreposição entre

elas, mas a curva de simulação para indivíduos não relacionados e meio-irmãos diferenciaram-se mais da esperada para a dos irmãos completos (Fig. 15).

Os pares de indivíduos foram classificados em três classes, segundo a proposta do Blouin e cols. (1996). Foram utilizados os valores intermediários entre os valores teóricos esperados para cada categoria de parentesco (irmãos completos, meio-irmãos e não aparentados) para definição das faixas e classificação dos pares. Por exemplo, o ponto medio entre 0,25 (esperado para meio - irmãos) e 0,50 (esperado para irmãos completos) é de 0,375. Todo par que apresentou um valor de r acima deste valor foi classificado como "irmãos completos". Do total de 16 pares analisados, cinco foram classificados como irmãos completos (B007-B008; B054-B055; B069-B073; B081-B084 e R901-R902, três como meio irmãos (B007-B009; B409-B410 e RS12-RS13) e oito apresentaram valores esperados para indivíduos não relacionados (Table XI).

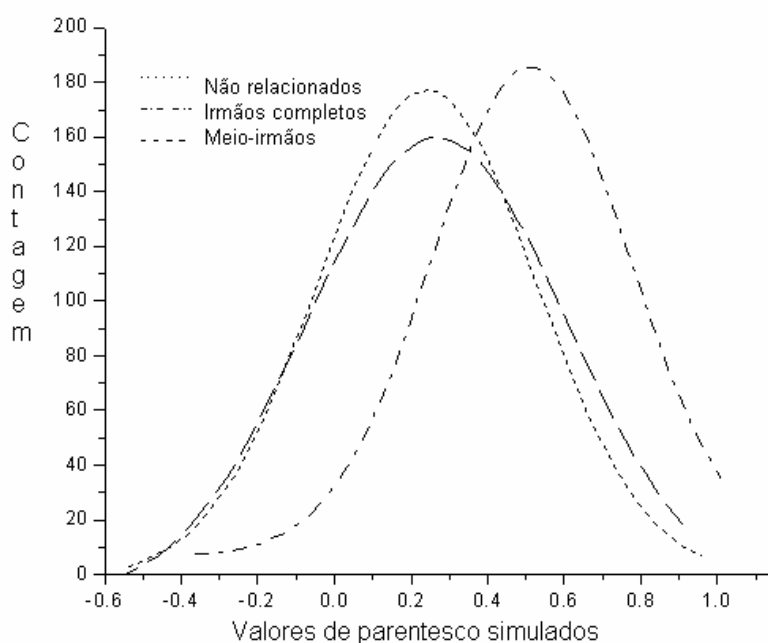


Figura 16. Curvas de simulação dos valores de parentesco entre pares de indivíduos, geradas ao acaso levando-se em conta as frequências alélicas nos cinco locos de microssatélites e as amostras das cinco colônias reprodutivas.

Alguns dos pares classificados como não relacionados são provenientes de ninhos onde foram encontrados três filhotes. Por exemplo, no ninho dois de Baía de Gaíva a comparação par-a-par entre os indivíduos B007-B009 resultou num valor de r de 0,229, que está dentro do esperado para meio – irmãos. O valor de esses indivíduos serem realmente meio – irmãos foi significativo (LOD : 0,671, $P < 0.05$) (Tabela XI). Por outro lado, a comparação par-a-par entre os indivíduos B008-B009 pertencentes ao mesmo ninho, apresentou um valor de r esperado para indivíduos não relacionados. Dado que os valores de desses indivíduos serem meio irmãos ou irmãos completos não foram significativos ($LOD MI = 0,225$, $LOD IC = 0,413$, $P > 0.05$) a hipótese de que seriam não relacionados não foi rejeitada. Uma situação diferente foi observada num outro ninho entre os indivíduos R901, R902 e R903 de Fazenda Retirinho. O parentesco genético entre o indivíduo R903 e qualquer dos outros dois ninhegos apresentou valores negativos. Quando testadas as hipóteses de todas as possíveis categorias de parentesco entre esses indivíduos, os valores de LOD não foram significativos.

5.4 Estimativas dos padrões de dispersão natal em colhereiro

A comparação entre estimativas de variabilidade genética nas amostras de DNA extraído de penas de muda de 34 machos e 38 fêmeas adultos, nas cinco colônias reprodutivas, foi realizada para inferir sobre os padrões de dispersão natal nos dois sexos. Nenhum dos parâmetros estimados diferiu significativamente entre machos e fêmeas (Tabela XII). O parentesco genético (r) foi calculado independente para machos e fêmeas como medida indireta da existência de padrões de dispersão sexo-diferenciais. Os valores de r médio foram de -0,037 para machos e de -0.038 para as fêmeas, não diferindo significativamente entre eles (Tabela XII, Fig. 16).

Tabela XI. Valores de parentesco genético, r , (Queller e Goodnight, 1989) entre pares de ninhegos de colhereiro, amostrados no mesmo ninho, usando dados nos cinco locos de microssatélites. *LOD: Likelihood of Data, score.*

Colônia	Ninho	Indivíduo	Valor de r par-a-par	<i>LOD</i>
Baia de Gaíva	1	B003-B004	0,043	0.159
Baia de Gaíva	2	B007-B008	0,637	1.797**
Baia de Gaíva	2	B007-B009	0,229	0.671*
Baia de Gaíva	2	B008-B009	0,100	0.225
Baia de Gaíva	3	B030-B031	0,095	0.033
Baia de Gaíva	4	B036-B037	0,080	-0.226
Baia de Gaíva	4	B037-B038	-0,090	-0.441
Baia de Gaíva	4	B036-B038	-0,085	-0.507
Quilú	1	B054-B055	0,392	52.087***
Fazenda Ipiranga	1	B069-B073	0,530	0.149
Fazenda Ipiranga	2	B081-B084	0,690	12.960***
Fazenda Ipiranga	3	B409-B410	0,143	5.671***
Fazenda Retirinho	1	R901-R902	0,473	0.516
Fazenda Retirinho	1	R901-R903	-0,546	-0.480
Fazenda Retirinho	1	R902-R903	-0,143	-0.078
Banhado do Taim	1	RS12-RS13	0.342	10.321***

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$

Tabela XII. Valores de estimativas de F_{IS} , F_{ST} , diversidade génica (H_s), média e variância de alocação ($mAlc$ e $vAlc$, respectivamente) e parentesco genético (r) para machos e fêmeas adultos de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro (Número de amostras analisadas).

Estimativa	Macho-Macho	Fêmea-Fêmea	Valor P
F_{IS}	-0.079	-0.086	0.515
F_{ST}	-0.006	-0.012	0.470
H_s	0.595	0.611	0.272
$mAlc$	0.003	-0.003	0.515
$vAlc$	3.526	3.559	0.380
r	-0.038 (43)	-0.037 (44)	0.580 (72)

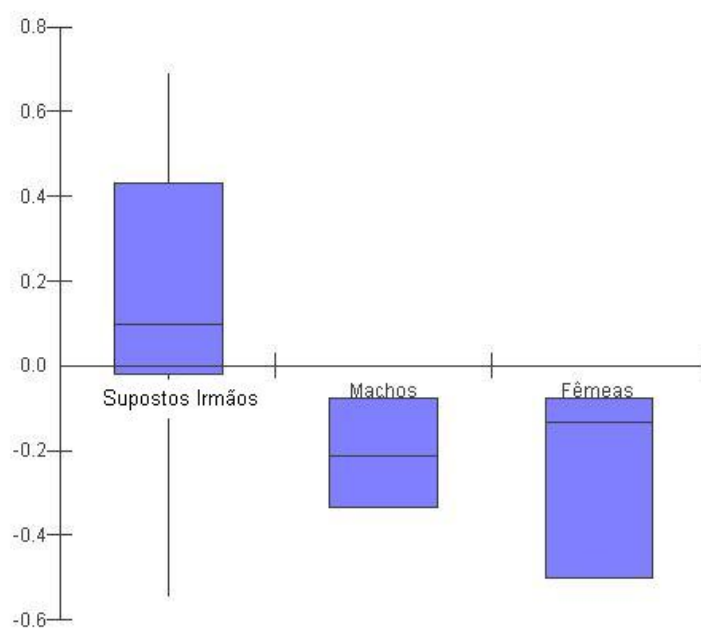


Figura 17. Gráfico de *box plot* dos valores de parentesco observados entre indivíduos encontrados nos mesmos ninhos, entre machos e entre fêmeas de cinco colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro. Note-se que a dispersão dos valores de parentesco entre fêmeas em torno à média populacional, é maior.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Amostragem não-invasiva

A amostragem não-invasiva e subsequente utilização do DNA extraído dessas amostras na amplificação de marcadores moleculares têm revolucionado a biologia da conservação. Essa estratégia metodológica tem sido utilizada no monitoramento de populações de várias espécies de organismos de difícil coleta e/ou ameaçados de extinção (Parsons, 2005; Roon e cols., 2005). Trabalhos têm sido realizados, por exemplo, em ursos (Woods e cols., 1999; Bellemain e cols., 2005), baleias corcundas (Paslbøll e cols., 1997), leões de montanha (Ernest e cols., 2000), elefantes (Eggert e cols., 2003), texugos (Frantz e cols., 2004) e coiotes (Prugh e cols., 2005). Em aves, a estratégia de amostragem não-invasiva restringe-se à coleta de penas. Apenas dois estudos de genética de populações com essa estratégia de amostragem foram reportados previamente e ambos se referem a espécies de ambientes secos. Segelbacher e cols. (2003) documentaram diferenciação genética entre populações do tetraz-europeu (*Tetrao urogallus*), ao longo de um gradiente espacial, usando cinco locos de microssatélites espécie-específicos e cinco locos heterólogos. Os autores encontraram níveis crescentes de estruturação nas populações dos ambientes contínuos até os fragmentados. Rudnick e cols. (2005) utilizaram penas de muda para confirmar a monogamia genética das águias imperiais (*Aquila heliaca*), num estudo de longo prazo numa reserva natural da Rússia.

A amostragem não-invasiva foi testada nesse trabalho, pela primeira vez, no monitoramento das espécies de aves de áreas úmidas, como os colhereiros. A coleta de penas da muda pré-reprodutiva dos adultos, no solo das colônias reprodutivas de colhereiro provou ser uma abordagem apropriada para estudos de genética de populações na espécie. Foi possível coletar um bom número de penas provenientes da muda dos adultos embaixo das

árvores nas colônias onde se encontravam os ninhos e o DNA obtido dessas penas apresentou alta concentração e boa qualidade. Em alguns casos, a amostragem de penas da muda permitiu a obtenção de amostras representativas de colônias nas quais não foi possível a coleta de sangue dos ninhegos. Por exemplo, a colônia de São Bom Jesus foi visitada somente no final do ciclo reprodutivo, quando os filhotes já estavam voando e as amostras nesse caso se restringiram às penas de muda. Os colhereiros apresentam uma muda pré-reprodutiva e outra pós-reprodutiva, como reportado para algumas espécies de aves tropicais (Foster, 1974, Farnsworth e Simons, 2001). O fato dessas mudas se sobreporem parcialmente ao ciclo reprodutivo minimiza o esforço-coleta, pois permite a obtenção numa mesma expedição ao campo de amostras de filhotes e adultos.

O protocolo da extração do DNA padronizado a partir das penas de muda possibilitou a obtenção de material de boa qualidade e em quantidade suficiente para a amplificação de um bom número de marcadores moleculares. Foi utilizada uma região da pena descrita como fonte de células sangüíneas, descrita por Horváth e cols. (2005) num estudo na espécie *Aquila adalberti* (Águia Imperial Espanhola). O protocolo original descrito por esse autor, entretanto, foi modificado de maneira de se obter uma extração mais econômica e eficiente. O uso desse protocolo resultou num DNA quase completamente íntegro extraído das penas, um resultado bem diferente do obtido por Segelbacher (2002) na espécie *Tetrao urogallo*, na extração de DNA de penas de muda. Considerando a boa qualidade do DNA obtido das penas dos colhereiros, podemos concluir que as condições climáticas dos habitats úmidos não influenciam negativamente na conservação do material coletado. As penas amostradas podem ter permanecido no chão de uma semana a 2 meses (desde a muda pré-reprodutiva até o começo da coleta no período reprodutivo), podem ter sofrido a ação da água das chuvas e foram estocadas em freezer por até sete meses até seu processamento. Os resultados apresentados demonstraram que o tempo e as condições de

armazenamento das penas não comprometeram o isolamento do DNA genômico de boa qualidade.

Entre as condições do protocolo que mais influenciaram o sucesso da extração do DNA podemos citar a quantidade de enzima Proteinase K empregada, a incubação no banho-maria numa temperatura adequada para a enzima (37°C) e a agitação vagarosa da mistura após adição de Proteinase K. Esses fatores possibilitaram a correta dissolução dos tecidos da pena e a conseqüente liberação do DNA. As penas de colhereiro medem entre 15 e 25 cm. (Fig. 7) e o coágulo de sangue está bem visível na região indicada por Horváth (2005) num intervalo que compreende 3 cm, facilitando a obtenção de uma boa quantidade de DNA.

O DNA isolado das penas foi utilizado como DNA molde na amplificação de um bom número de marcadores moleculares (ver seção seguinte), entre eles, os ligados ao sexo. Outros autores reportaram baixa eficiência na amplificação de alguns locos, incluindo o gene CHD, quando DNA era extraído com kits comerciais a partir de penas coletadas no solo (Segelbacher, 2002, Bush e cols., 2005). Contrariamente ao citado na literatura, a sexagem das penas de colhereiros adultos foi bem sucedida e permitiu o estudo posterior de aspectos relacionados à dispersão, os quais não poderiam ter sido investigados sem uma amostra sexada dos adultos formadores das colônias (ver seção *Padrões de Dispersão Natal*).

A amostragem não-invasiva, acoplada ao uso de um painel de marcadores polimórficos permitiu a individualização das penas de colhereiro, pois a Probabilidade de Identidade calculada foi muito baixa. Com apenas dois locos espécie-específicos mais variáveis na espécie, a probabilidade de se encontrar dois genótipos iguais numa amostra foi de uma em mil indivíduos. Esses valores garantem que penas de muda provenientes de um mesmo indivíduo sejam identificadas e excluídas da amostra, um resultado importante na validação do uso de penas coletadas no solo em estudos populacionais. Na amostra analisada não encontramos duas penas com o mesmo genótipo, exemplo na amostra de 30 penas

coletadas no solo de uma colônia. No caso de duas penas apresentarem o mesmo genótipo, uma poderá ser descartada da análise por completa coincidência dos perfis genéticos, uma condição difícil de ser explicada pelo acaso.

As populações de aves possuem alta sensibilidade às mudanças ambientais e, por esse motivo, têm sido utilizadas como bioindicadoras dos habitats ocupados durante seus ciclos reprodutivos (Kushlan, 1993). Uma das principais dificuldades para o uso das populações de aves aquáticas como bioindicadoras é a dificuldade relativa à captura e amostragem desses organismos (Kushlan 1993). Os resultados do presente trabalho validam a metodologia não-invasiva de coleta de penas de muda como uma ferramenta para o monitoramento genético dessas populações de aves que vivem ou se reproduzem em áreas alagadas.

6.2 Estimativas de variabilidade genética e estruturação populacional

O genoma das aves contém dez vezes menos microssatélites do que o genoma dos outros organismos (Primmer e cols., 1997). Linn (1993) sugeriu que a espécie *Platalea ajaja* apresenta baixa variabilidade em relação à ocorrência de marcadores de microssatélites, aproximadamente um a cada 1.6-4.0 Mb. Sawyer (2002) também encontrou baixo nível de frequência dos microssatélites, numa amostra de 51 colhereiros provenientes de três zoológicos dos EUA isolou 32 locos de microssatélites na espécie, sendo apenas cinco deles polimórficos. Levando-se em conta essas referências, estudaram-se neste trabalho locos espécie-específicos e locos heterólogos. Na abordagem heteróloga, iniciadores de replicação caracterizados para uma espécie filogeneticamente relacionada foram usados na amplificação de regiões genômicas de colhereiro. No nosso caso, testamos em colhereiro os oligonucleotídeos iniciadores isolados para cabeça-seca (Van den Bussche e cols., 1999; Tomasulo-Seccomandi e cols., 2003), uma espécie da mesma ordem que *Platalea ajaja*.

Entre os parâmetros que mais contribuíram para o sucesso da amplificação dos locos heterólogos em colhereiro, podemos citar a diminuição na temperatura de hibridação utilizada, segundo esquema de amplificação do tipo “touchdown” (Don e cols., 1991). Nesse esquema, a temperatura diminui a cada ciclo de uma forma estabelecida pelo pesquisador (no nosso caso, meio grau por ciclo), com o objetivo de maximizar a especificidade da hibridação entre o iniciador e o DNA molde nos primeiros ciclos de PCR. Na amplificação heteróloga, é esperada certa proporção de não-homologia entre a região de anelamento dos iniciadores e o DNA da espécie estudada.

De um total de 13 locos heterólogos testados, nove não amplificaram, dois amplificaram, mas se mostraram monomórficos nos indivíduos analisados e os dois restantes foram polimórficos. Lopes (comm. pess.) testou em tuiuiú (*Jabiru mycteria*) os mesmos oligonucleotídeos iniciadores descritos para cabeça-seca, usados no presente trabalho, encontrando de um total de 16 locos 10 polimórficos. Essas três espécies pertencem à ordem Ciconiiformes, mas dentro dessa ordem o cabeça-seca e o tuiuiú estão classificados na mesma família (Ciconiidae), enquanto que, o colhereiro encontra-se na família Threskiornithidae. Nossos resultados estão de acordo com o reportado na literatura (Galbusera e cols., 2000, Primmer e cols., 2005) que pressupõe que a percentagem de locos heterólogos polimórficos nas espécies de ave diminui quando se aumenta a distância filogenética entre espécie analisada e a espécie na qual foram isolados os marcadores. Embora só um loco heterólogo tenha se mostrado útil nas nossas análises, a amplificação heteróloga foi validada como uma estratégia para análise de variabilidade nas espécies nas quais os marcadores específicos não foram ainda descritos ou quando o repertório dos locos é limitado (Primmer, 1996).

Quando os microsatélites específicos de colhereiro (Sawyer, 2002) foram testados no presente trabalho, esses apresentaram um melhor desempenho quanto ao tempo empregado na padronização das reações de PCR, na eficiência da amplificação e no nível de

polimorfismo. Todos os quatro locos analisados mostraram níveis variáveis de polimorfismo na espécie com números de alelos por loco que variaram desde 5 (Aaj5) até 10 (Aaj1). Nossos resultados concordam com o reportado por Sawyer (2002) no estudo de 51 indivíduos selvagens mantidos em cativeiro nos EUA. Nesse trabalho, o autor encontrou que o loco Aaj1 foi o que apresentou maior número de alelos, enquanto que, o loco Aaj5 apresentou o menor, da mesma forma que neste trabalho. Alguns alelos das populações norte-americanas apresentaram tamanhos diferentes dos alelos nos mesmos locos das populações brasileiras. Por exemplo, os alelos 187 e 190 do loco Aaj1 e os alelos 197 e maiores do loco Aaj3.

De um total de seis locos de microssatélites utilizados na análise, cinco se mostraram polimórficos nas colônias analisadas, enquanto que, um dos heterólogos (WS09) foi monomórfico em quatro das cinco colônias. As heterozigosidades nas populações brasileiras de colhereiro (71 indivíduos) não diferiram significativamente da observada na única população dos EUA (15 indivíduos) avaliada por Sawyer (2002), apesar das diferenças no tamanho amostral entre esse estudo e o do autor norte americano (2002). Esses achados indicam que houve pouca perda de variabilidade genética nas populações da Florida ou que ocorreu rápida recuperação das populações durante as 16 gerações passadas desde a redução do tamanho populacional observado no período de 1890 a 1920 (considerando 7 anos/geração). Uma outra explicação para a semelhança encontrada entre a heterozigosidade reportada no presente trabalho e a da população dos EUA estaria baseada na suposição de que as populações do Pantanal brasileiro estariam passando por um declínio (del Hoyo, 1992), com a conseqüente perda de variabilidade. Um estudo com uma amostra mais representativa de diversas regiões de América do Norte e do Brasil esclarecerá quais hipóteses são verdadeiras.

As taxas de heterozigotos observadas em todas as colônias brasileiras de colhereiro foram maiores do que as reportadas para outras espécies de Ciconiiformes.

Colônias pantaneiras de cabeça-seca apresentaram, por exemplo, um nível de heterozigosidade média de 0,30, considerando-se os dados de 16 locos de microssatélites espécie-específicos (Tomasulo-Secomandi, 2004), enquanto que, populações pantaneiras de tuiuiú (Lopes e cols., 2005) apresentaram um valor de 0,41, baseando-se nos dados de 10 locos de microssatélites heterólogos. Os níveis de variabilidade genética detectados nos colhereiros foram também maiores do que os reportados para populações norte-americanas de cabeça-seca (0,39, Van Den Bussche et al., 1999).

No presente estudo, não foram encontradas evidências de diferenciação genética e estruturação populacional nas colônias reprodutivas brasileiras de colhereiro. Os valores de F_{ST} observados foram baixos (de -0,0204 a 0,0153) e não diferiram significativamente de zero. Os testes de alocação também não conseguiram alocar adequadamente uma grande parte dos indivíduos, apoiando a não existência de diferenciação genética entre as colônias. Para explicar a distribuição homogênea da variabilidade genética, podemos sugerir que existe fluxo gênico atual entre as colônias, ou que as colônias trocaram migrantes no passado e o tempo transcorrido desde então não foi suficiente para tornar essas populações geneticamente diferenciadas. O Nm calculado por geração baseado no estimador θ do F_{ST} , foi relativamente alto, revelando que houve homogeneização genética das colônias. As estimativas de número de migrantes baseadas no F_{ST} , contrariamente às baseadas no R_{ST} , desempenham-se bem quando o número de locos analisados e o tamanho amostral são pequenos, (Gaggiotti e cols., 1999). Nossos achados concordam com o sugerido nos estudos prévios com DNA mitocondrial (2005). Estudos baseados com DNAmít e microssatélites desenvolvidos em outras espécies de aves aquáticas da família Ciconiidae, como o tuiuiú e o cabeça-seca, reportaram também baixos níveis de estruturação nas populações pantaneiras. Lopes (2002) e Del Lama e cols (2002) avaliaram níveis de estruturação populacional em cinco colônias do cabeça-seca, *Mycteria americana*, do Pantanal brasileiro mediante a análise

de locos alozimicos. Dos 22 *locos* analisados só sete resultaram polimórficos e os dados evidenciaram baixa estruturação genética nas colônias estudadas. Os autores sugeriram a existência de um alto nível de fluxo gênico entre as colônias, e essa hipótese foi apoiada pelo número alto de migrantes estimado usando esses marcadores. Nos trabalhos de Rocha e cols. (2004) foram comparados níveis de variabilidade genética e estruturação populacional em nove colônias brasileiras de cabeça seca mediante dados de oito locos alozimicos e quatro locos de microssatélites. Esses autores reportaram que os níveis de estruturação populacional encontrados entre as colônias brasileiras foram baixos e não significativos entre as populações brasileiras. Ainda em *Mycteria americana*, Tomasulo-Seccomandi (2004) avaliou e comparou os níveis de variabilidade genética e estruturação populacional de 9 colônias norte-americanas e 11 colônias do Pantanal brasileiro usando dados de nove locos de microssatélites. Foram encontrados baixos níveis de estruturação genética entre as populações dos EUA e ausência de diferenciação entre as populações do Pantanal. Sugere-se que o fluxo gênico entre as colônias brasileiras seria maior do que o fluxo entre as norte-americanas. O trabalho de Lopes e cols. (2006 *no prelo*) com DNA mitocondrial (DNAMit) apoiou esses achados, já que os autores encontraram baixos níveis de diferenciação genética entre as populações Pantaneiras.

Como não foi evidenciada diferenciação genética entre as colônias de colhereiro estudadas no presente trabalho, estas poderiam ser tratadas como uma única unidade de manejo desde o ponto de vista da conservação dessas populações. Por outro lado, é importante levar em conta que o desempenho relativo das estimativas de diferenciação genética e estruturação dependem da aplicabilidade dos modelos usados nos programas que auxiliam nos cálculos de ditas estimativas e de um número de pressupostos que nem sempre são cumpridos nas populações naturais (Balloux e Lugon-Moulin, 2002). Entre esses pressupostos, encontra-se o modelo mutacional dos marcadores utilizados, no caso, os microssatélites. O modelo mais simples de mutação que pode se aplicar aos microssatélites,

conhecido como Modelo Passo a Passo (SMM, do Inglês, *Stepwise Mutation Model*; Ohta e Kimura, 1973), assume que o comprimento dos STRs aumenta em uma unidade por mutação e que as expansões e contrações são igualmente frequentes. Esse modelo tem sido apoiado por evidências experimentais recentes (Whittaker e cols, 2003) apesar de se ter demonstrado que a taxa de mutação aumenta com o maior tamanho dos alelos (Ellegren, 2000; Kruglyak e cols, 2000), uma evidência de que o surgimento de alelos não seria totalmente aleatório.

Além disso, as decisões de manejo baseadas somente em informação genética que é parcial são, algumas vezes, inadequadas. Por exemplo, adaptações ecologicamente importantes aos diferentes habitats locais podem simplesmente passar despercebidas nesse tipo de análise. Uma das colônias estudadas neste trabalho (Banhado do Taim, RS) está localizada em um ambiente litorâneo, diferente do ambiente pantaneiro. Até o momento, não se sabe se existe alguma adaptação local dos colhereiros a esse tipo de ambiente. Por isso, se desconhece até que ponto o fato de considerar às colônias brasileiras como uma única unidade de manejo seria prejudicial para os indivíduos que se reproduzem em ditas colônias.

6.3 Estimativas de parentesco entre ninhegos de colhereiro

As análises de parentesco genético baseados em marcadores de microssatélites são úteis na melhor compreensão dos padrões de estruturação em escala fina das populações naturais de uma variedade de taxa, incluindo o das aves (Piertney, 1998; Webster, Chuang-Dobbs e Holmes, 2000, Alderson e cols., 2001; Bentzen e cols., 2001; Webster e Reichart, 2005). Estudos envolvendo diversas espécies de aves têm estimado parentesco genético com o objetivo de inferir sobre comportamento reprodutivo, na sua maioria em espécies com comportamentos particulares, como por exemplo, as que fazem *leks* (Hoglund e Shorey, 2003; Bouzat e Johnson, 2004; Gibson e cols., 2005).

Nas espécies neotropicais os estudos são menos frequentes, mas podemos citar o trabalho de Höglund e Shorey (2003), no qual foram utilizados oito locos polimórficos de microssatélites para avaliar a estrutura genética de populações da rendeira formadora de leks (*Manacus manacus*). Esses autores reportaram que alguns dos machos dos leks eram aparentados, com valores de parentesco (r) esperados para irmãos completos e meio irmãos, e sugeriram que os machos têm mais chances de se estabelecerem num lek, se indivíduos relacionados geneticamente já estão presentes no grupo.

Um dos principais achados do presente trabalho foi o de que as populações de colhereiro estudadas não se encontram estruturadas em escala fina. Os baixos valores de parentesco genético identificados entre os indivíduos dentro das colônias são indicativos de que a maioria dos indivíduos de uma dada colônia não são geneticamente relacionados. O parentesco médio entre os indivíduos não foi alto em nenhum grupo particular, como seria esperado caso essas colônias apresentassem algum nível de estruturação genética. Por exemplo, Friesen e cols. (1996) estudaram a diferenciação microgeográfica dentro de uma colônia de *Uria lomvia* da Noruega e encontraram, usando proteínas e DNAmít, que dentro das colônias ocorriam grupos mais relacionados, a pesar da diferenciação genética não ter sido observada em escalas maiores, como na comparação entre colônias.

No presente estudo, procurou-se inferir sobre o sistema de acasalamento dos adultos na natureza mediante uma abordagem genética indireta, estimando-se o nível de parentesco genético entre filhotes encontrados nos mesmos ninhos. Essa abordagem já foi empregada para estudar comportamento reprodutivo em várias espécies de aves, por exemplo, arara-canindé (*Ara arana*) (Caparroz, 2003). No presente trabalho, utilizando a classificação proposta por Blouin (1996), do total de 16 pares de ninhegos de colhereiro analisados, cinco foram classificados como irmãos completos, três como meio-irmãos e oito como não aparentados. Em três casos, foram coletados três indivíduos por ninho e as análises de

parentesco demonstraram que alguns dos pares do mesmo ninho se encontravam pobremente relacionados ou não eram aparentados (Tabela XI).

Segundo observações de campo restritas a um único casal, o colhereiro seria socialmente monogâmico, com ambos os membros do par contribuindo para a construção do ninho (Dumas, 2000). Para explicar os nossos achados nas populações naturais, podemos sugerir a existência de cópula extra-par e/ou parasitismo de ninho, como observado (Brown, C. comm. pess. ao Sawyer, 2002, pp.289) e confirmado geneticamente (Sawyer, 2002) para aves mantidas em cativeiro. Sawyer (2002) em um estudo de famílias de colhereiro mantidas em cativeiro em um zoológico dos EUA, evidenciou paternidade extra-par baseando-se em dados levantados em quatro locos de microssatélites. Em dez de 25 famílias estudadas, ambos os pais ou um deles foram excluídos do vínculo através da análise qualitativa e comparação dos genótipos dos casais e supostos filhotes.

É interessante notar que a ocorrência de fertilização extra-par já foi observada em ninhos com três ninhegos em outras espécies de aves, nas quais as fêmeas podem se envolver em cópulas extra-par para aumentar o seu sucesso reprodutivo chocando uma maior proporção de ovos (Gray, 1997). A cópula extra-par poderia ser uma estratégia reprodutiva dos Threskiornihídeos, já que esse comportamento tem sido observado para outras espécies da família. Baseados em observações ecológicas, Elbin e Burger (2005) reportaram a ocorrência deste fenômeno em 32 % do total das cópulas do guará-vermelho (*Eudocimus ruber*) em cativeiro.

Em termos de comportamento reprodutivo, o campo da ornitologia vem sendo revolucionado pelo desenvolvimento das técnicas moleculares, as quais têm contribuído sobremaneira para evidenciar que a maioria das aves, antes consideradas como socialmente monogâmicas (Greenwood, 1980), na verdade apresentam níveis altos de acasalamento extra-par. Griffith e cols. (2002) revisaram a frequência da ocorrência de cópula extra-par nos

passeriformes e evidenciaram que somente 14% das espécies levantadas são geneticamente monogâmicas, enquanto que 86% restante apresentam níveis variáveis de poliandria.

Por outro lado, as curvas de simulação dos valores de parentesco entre pares gerados ao acaso, levando-se em conta as frequências alélicas observadas em ninhos de colhereiro diferentes dos analisados, apresentaram uma área grande de sobreposição, especialmente com relação às curvas de meio-irmãos e não relacionados, dificultando assim as conclusões em relação ao comportamento reprodutivo do colhereiro. Uma estratégia para aumentar o poder das análises de parentesco é utilizar um maior número de locos. Blouin (1996), por exemplo, a partir de dados em 20 locos de microssatélites em uma população natural de ratos discriminou irmãos completos dos não relacionados, e meio-irmãos de irmãos completos ou não relacionados, em 80% das análises. No presente trabalho foram utilizados todos os locos polimórficos espécie-específicos que se reportaram até então na literatura, mais um loco heterólogo. Para aumentar o número de locos de microssatélites nas análises de parentesco, poder-se-ia testar a amplificação dos marcadores mais polimórficos descritos na espécie *Nipponia nippon* (Ji e cols., 2004) e na espécie *Eudocimus ruber* (Santos e cols., 2006), pois ambas pertencem também à família Threskiornithidae.

6.4 Padrões de dispersão natal em colhereiro

A estrutura genética das populações é influenciada, entre outros fatores, pelo grau de filopatria natal da espécie, definida como o movimento do indivíduo de seu local de nascimento até o local onde se dá o início de sua reprodução. Quando os adultos são altamente filopátricos é esperado um alto grau de diferenciação genética entre as diferentes áreas de reprodução da espécie e, portanto, um alto grau de estruturação populacional. Em populações naturais de aves a dispersão é geralmente maior entre as fêmeas, enquanto que os machos são mais sedentários, e retornam em maior proporção ao local de nascimento para sua

reprodução (Greenwood, 1980). Na maioria das famílias de aves, esse é o padrão observado, sendo poucas as exceções observadas, restritas a família dos anatídeos, na qual os machos são mais dispersivos. No único registro anterior a esse estudo sobre os movimentos de dispersão em colhereiro, Silva e Bello Fallavena (1995) sugeriram uma tendência à filopatria natal baseando-se em dados ecológicos de anilhamento de filhotes no Rio Grande do Sul.

No presente trabalho foi empregada uma abordagem genética, não utilizada até então nessa espécie, para se estimar os padrões de dispersão natal. Vários parâmetros genéticos foram estimados separadamente para amostras de machos e fêmeas adultos e depois comparados entre si com o intuito de evidenciar diferenças entre os sexos quanto à distribuição da variabilidade genética. As análises comparativas desses parâmetros entre fêmeas e machos, não evidenciaram diferenças significativas, o qual aponta para uma aparente semelhança nos padrões de dispersão para ambos os sexos. Porém, como outros fatores influenciam na estruturação populacional, a alta filopatria natal nem sempre resulta em altos níveis de estruturação populacional. Por exemplo, em um estudo com seis locos de microsatélites em albatrozes da espécie *Thalassarche bulleri bulleri* em três ilhas da Nova Zelândia, Van Bekkum e cols. (2006) encontraram ausência de estruturação genética populacional apesar dos altos níveis de filopatria natal registrados para essa espécie (por experimentos de marcação e recaptura). Os autores supõem que os atuais níveis de fluxo gênico são suficientes para manter a homogeneidade das populações. Portanto, não se poderia descartar que em colhereiro existam padrões de dispersão sexo-diferenciados, não adequadamente detectados pela metodologia empregada no presente trabalho.

Neste ponto, é importante notar que o poder dos testes usados para se estimar a dispersão diferencial com base nas ferramentas genéticas depende de vários fatores. Goudet e cols. (2002) discutiram os métodos para se estimar dispersão sexo-diferencial com a utilização de marcadores de herança bi-parental e co-dominantes. Após a análise do desempenho de

vários testes, em diferentes situações de amostragem e com vários números de alelos por loco, os autores concluíram que esses testes dependem, na maioria das vezes, da proporção amostrada da população. Outro ponto importante que influencia a sensibilidade desses testes é a magnitude do desvio na dispersão. Os testes apresentam-se mais poderosos na detecção do desvio quando a magnitude do mesmo é grande (da ordem de 80 dispersores para 20 filopátricos). Dessa maneira, se os marcadores utilizados e a amostra analisada no presente trabalho, não permitiram a detecção da existência de um possível desvio sexo-diferencial na dispersão, esse achado não pode excluir a possibilidade da sua existência. Uma boa estratégia para se aumentar o poder de detecção no caso de colhereiro, seria ampliar o esforço amostral por coleta (Goudet e cols., 2002). Nesse sentido, a metodologia de amostragem não invasiva de penas da muda dos adultos no solo das colônias reprodutivas, testada e padronizada neste trabalho, facilitará tal procedimento.

7. CONCLUSÕES

- ❖ A aplicação da estratégia de amostragem não-invasiva somada ao uso de marcadores moleculares, contribuiu para o levantamento de uma maior quantidade de informação biológica relevante na espécie *Platalea ajaja*. Essa metodologia se constitui numa ferramenta muito útil para o monitoramento de populações de aves aquáticas com biologia semelhante a da do colhereiro e, em conseqüência, contribuirá para subsidiar políticas de conservação dos ambientes nos quais elas habitam.
- ❖ Os dados de marcadores nucleares neutros (microsatélites) não evidenciaram estruturação populacional nem diferenciação genética entre as populações brasileiras de colhereiro estudadas no presente trabalho. Dita ausência de estruturação populacional pode ser explicada pela ocorrência atual de troca de indivíduos entre as colônias reprodutivas ou pela existência de fluxo gênico passado, os quais contribuíram para a homogeneização genética das populações, não tendo decorrido, desde então, suficiente tempo para torná-las geneticamente diferentes.
- ❖ Evidência genética demonstra que a monogamia social proposta para a espécie não explica as relações de parentesco genético determinadas para ninhegos encontrados no mesmo ninho. A ocorrência de cópula extra-par e/ou parasitismo de ninho merecem ser mais bem investigados em populações naturais de colhereiro.
- ❖ Estimativas de parâmetros genéticos calculadas independentemente para adultos de ambos os sexos e comparadas entre si, indicaram que a magnitude da dispersão pareceria ser semelhante para machos e fêmeas da espécie.

Referências

8. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C. L.; DOUBLÉ, M. C. Genetic structure, conservation genetics and evidence of speciation by range expansion in shy and white-capped albatrosses. *Molecular Ecology*, 2: 2953–2962, 2003.
- ALDERSON, G. W., GIBBS, H. L.; SEALY, S. G. Parentage and kinship studies in an obligate parasitic bird, the Brown-Headed Cow Bird (*Molotrus ater*) using microsatellite DNA markers. *The Journal of Heredity*, 90: 182-190, 2001
- ALLEN, R. P. The Roseate Spoonbill. Dover Publ. Natl. Audubon Soc New York. 1942. 142 p.
- ARAYA, B.; CHESTER, S. The birds of Chile. Latour, Santiago, Chile. 1993.
- ARGUEDAS, N.; PARKER, P.G. Season migration and genetic population structure in House Wrens. *The Condor*, 102:517-528, 2000.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York. 1994. 511p.
- AYRES, K. L.; OVERALL, A. D. J. API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. *Molecular Ecology Notes*, 4: 315 –318, 2004.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; LIMA AYRES, D.; SANTOS DOS SANTOS, A. 2003. *BIOSTAT 3.0. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq/Conservation International. Brazil.
- BAUMGARTEN, M. Estudo genético-populacional em atobás (Pelecaniiformes, Aves) da costa brasileira. Tese (Doutor em Ciências) Universidade de São Paulo, Brasil. 2003.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155–165, 2002.
- BARTON, N. H.; SLATKIN, M. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56:409-415, 1986.
- BELLEMAIN, E.; SWENSON, J. E.; TALLMON, D.; BRUNBERG, S.; TABERLET, P. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter collected feces: Four Methods for Brown Bears. *Conservation Biology*, 19: 150-161, 2005.
- BELTON, W. *Aves do Rio Grande do Sul: Distribuição e Biologia*. Editora da Unisinos. São Leopoldo. 1994. 584p.
- BENT, A. C. Life histories in North American marsh birds. *U.S Natural Museum Bulletin*, 135:13-23, 1926.
- BENTZEN, P., OLSEN, J. B., MCLEAN, J. E., SEAMONS, T. R.; QUINN, T. P. Kinship analysis of Pacific Salmon: insides into Mating, Homing and Timing of Reproduction. *The Journal of Heredity*, 92: 137-136, 2001.
- BJORK, R.; POWELL, G. V. N. Roseate Spoonbill. In: RODGERS, J. A.; KALE, H. W. E SMITH, H. T. *Rare and endangered biota of Florida*. Univ. Press of Florida, Gainesville, 5: 295–308, 1996.
- BLAKE, E. R. *Manual of neotropical birds*. Univ. of Chicago, Chicago, 1977.

- BLOUIN, M. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18: 503-511, 2003
- BLOUIN, M.; PARSONS, M.; LACAILLE, V.; LOTZ, S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 5: 393-401, 1996.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. ; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331, 1980.
- BOUZAT, J.; JONHSON, K. Genetic structure among closely spaced leks in a peripheral population of lesser prairie-chickens. *Molecular Ecology*, 13: 499-505, 2004.
- BROWN, L. M., RAMEY, R. R., TAMBURINI, B.; GAVIN, T. A. Population structure and mitochondrial DNA variation in sedentary Neotropical birds isolated by forest fragmentation. *Conservation Genetics*, 5: 743-757, 2004.
- BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* , 3: 939-943, 1993.
- BRUNNER, P. C., DOUGLAS, M. R.; BERNATCHEZ, L. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (*Teleostei: Salmonidae*) from central alpine lakes. *Molecular Ecology*, 7: 209-223, 1998.
- BUSH, K. L.; VINSKY, M. D.; ALDRIDGE, C. L.; PASZKOWSKI, C. A. A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conservation Genetics*, 6:867-870, 2005.
- BYERS, O. Storks, Ibis and Spoonbill. Conservation Assessment and Management Plan. Chonburi, Thailand. Working Document. IVCN/SSC. 1995.
- CANEVARI, P. Unpublished Information from Neotropical Wetlands Programs. 1993.
- CAPARROZ, R. Filogeografia, estrutura e variabilidade genética da Arara-canindé (*Ararauna*, Psitaciformes: Aves) no Brasil baseadas na análise de DNA mitocondrial e de DNA nuclear. 105p. Tese (Doutor em Ciências) Universidade de São Paulo, 2003.
- DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. (eds.). Handbook of the Birds of the World. Vol. 1 Ostrich to Ducks. Lynx, Barcelona. 1992. 696 p.
- DEL LAMA, S. N.; LOPES, I. F.; DEL LAMA, M. Genetic variability and level of differentiation among Brazilian pantanal wood stork populations. *Biochemical Genetics*, 40: 87-99, 2002.
- DON, R. H.; COX, P. T.; WINWRIHT, B. J.; BAKER, K.; MATTICL, J. S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19: 4008, 1991.
- DUBS, B. Birds of southwestern Brazil. Betrona-Verlag, Switzerland, 1992.
- DUMAS, J. V. Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*). In: Poole, A.; Gill, F. The Birds of North America, The Birds of North America, Inc., Philadelphia, PA. n. 490, 2000.
- EGGERT, L. S.; EGGERT, J. A.; WOODRUFF, D. S. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology*, 12:1389-1402, 2003.

- EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92:832-839, 1996.
- ELBIN, S. B.; BURGER, J. 2005. Is extra-pair copulation a mating strategy or a by-product of sexual activity in Scarlet Ibis? In: Thirty-Second Annual Meeting of the Pacific Seabird Group, Twenty-Seventh Annual Meeting of the Waterbird Society. Portland, Oregon, USA. *Anais*. p. 55.
- ELLEGREN, H. Heterogeneous Mutation Processes in Human Microsatellite DNA Sequences. *Nature Genetics*, 24: 400-402, 2000.
- EMSLIE, S. D. An early Irvingtonian avifauna from Leisey Shell Pit, Florida. *Bulletin of the Florida Museum of Natural History*, 37: 299-344, 1995.
- ERNEST, H. B.; PENEDO, M. C. T.; MAY, B. P.; SYVANEN, M.; BOYCE, W. M. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, 9: 433-441, 2000.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotype: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491, 1992.
- FARÍA, P. Estudo genético populacional em trinta-réis (Sterniidae: Charadriiformes) que se reproduzem na costa Brasileira. Tese (Doutor em Ciências) Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 2005.
- FARNSWORTH, G. L.; SIMONS, T. How Many Baskets? Clutch Sizes that Maximize Annual Fecundity of Multiple-Brooded Birds. *The Auk*, 118: 973-982, 2001
- FOSTER, M. A model to explain molt-breeding overlap and clutch size in some tropical birds. *Evolution*, 28:182-190, 1974.
- FRANCISCO, M. R. Estruturação genética em populações do tangará-dançarino (*Chiroxiphia caudata*, Aves: Pipridae) e sua importância para a conservação. 103 pp. Tese (Doutor em Ciências) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2005.
- FRANTZ, A.C., SCHAUL, M., POPE, L. C., FACK, F., SCHLEY, L., MULLER, C. P. and TIMOTHY J. ROPER. Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. *Journal of Applied Ecology*, 41: 985-995, 2004.
- FREDERICK, P. C.; OGDEN, J. C. Philopatry and Nomadism: Contrasting Long-term Movement Behavior and Population Dynamics of White Ibises and Wood Storks. *Colonial Waterbirds*, 20: 316-323, 1997.
- FREDERICK, P. C.; SANDOVAL, J. C.; LUTHIN, C.; SPALDING, M. The importance of the Caribbean coastal wetlands of Nicaragua and Honduras to Central American populations of waterbirds and Jabiru Storks (*Jabiru mycteria*). *Journal of Field Ornithology*, 8:287-295, 1997.
- FRIESEN, V. L. Population genetics and the spatial scale of conservation of colonial waterbirds. *Colonial Waterbirds*, 20: 353-368, 1997.
- FRIESEN, V. L.; MONTEVECCHI, W. A.; GASTON, A. J.; BARRET, R. T.; DAVIDSON, W.S. Molecular Evidence of kin groups in the absence of large genetic differentiation in a migratory bird. *Evolution*, 50: 924-930, 1996.

- GAGGIOTTI, O.E.; LANCE, O.; RASSMANN, K.; GLIDDON, C. A comparison of two indirect methods to estimate average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513-1520, 1999.
- GALBUSERA P.; TVAN DONGEN, S.T; MATTHYSEN, E. Cross-amplification of microsatellite primers in birds. *Conservation genetics*, 1: 163-168, 2000.
- GIBSON, R. M.; PIRES, D.; DELANEY, K. S.; WAYNE, R. K. Microsatellite DNA analysis shows that greater sage grouse leks are not kin groups. *Molecular Ecology*, 14: 4453-4459, 2005.
- GOODNIGHT, K. F.; QUELLER, D. C. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, 8: 1231-1234, 1999.
- GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2001. Acesso em: 15 dez. 2005.
- GOUDET, J.; PERRIN, N.; WASER, P. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology*, 11: 1103-1114, 2002.
- GRAY, E. M. Do fêmeas red-winged blackbirds benefit genetically from seeking extra-pair copulations? *Animal Behavior*, 53: 605-623, 1997.
- GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behavior*, 28: 1140-1162, 1980.
- GREENWOOD, P. J.; P H HARVEY. The Natal and Breeding Dispersal of Birds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 1-21, 1982.
- GRIFFITH, S., OWENS, I. P. F.; THUMAN, K. A. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, 11: 2195-2212, 2002.
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M. C.; ORR, K.; DAWSON, R. L. G. A DNA test to Sex most birds. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075, 1998.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48:361-372, 1992.
- HALDANE J B S. An exact test for randomness of mating. *J Genet* 52: 631-635, 1954.
- HANCOCK, J. A.; KUSHLANN, J. A.; KAHL, M. P. *Storks, ibises and spoonbills of the world*. Academic Press, London, 1992.
- HAVERSCHMIDT, F.; MEES, G. F. *Birds of Surinam*. Vaco Press, Paramaribo, Surinam, 1994.
- HILTY, S. L.; BROWN, W. B. *A guide to the birds of Colombia*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ. 1986.
- HOGLUND, J.; SHOREY, L. Local genetic structure in a white-bearded manakin population. *Molecular Ecology*, 12: 2457-2463, 2003.
- HORVÁTH, M. B.; MARTÍNEZ-CRUZ, B.; NEGRO, J. J.; KALMÁR, L.; GODOY, J. A. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36: 84-88, 2005.
- INFONATURA: Birds, mammals, and amphibians of Latin America. 2004. Version 4.1. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Available: <http://www.natureserve.org/infonatura>. (Acessado em: 10 de Abril de 2006).

- ISHIBASHI, Y.; SAITOH, T.; ABE, S.; YOSHIDA, M. C. Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. *Molecular ecology*, 5: 589-590, 1996.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology and evolution*, 11: 424-429, 1996.
- JI, Y.-J.; LIU, Y.-D.; DING, C.-Q.; ZHANG, D.-X. Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 615-617, 2004.
- JOHNSEN, A.; LIFJELD, J. T.; ROHDE, P. A.; PRIMMER, C. R.; ELLEGREN, H. Sexual conflict over fertilizations: female bluethroats escape macho paternity guards. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 43: 401-408, 1998.
- KALINOWSKI, S. T. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular Ecology* 11: 1263-1273, 2002.
- KRUGLYAK, S.; DURRETT R.; SCHUNG M. D.; AQUADRO C. F. Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1210-1219, 2000.
- KUSHLAN, J. A. Population biology and conservation of colonial wading birds. *Colonial Waterbirds*, 15: 1-7, 1992.
- KUSHLAN, J. A. Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colonial Waterbirds*, 16: 223-251, 1993.
- LEWIS, J. C. Habitat suitability index models: Roseate Spoonbill. U.S. Dept. Int. Fish. Wildl. Serv., FWS/OBS-82/10.50. Washington, D.C., 1983.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465, 2002.
- LILLANDT, B.; BENSCH, S.; VON SCHANTZ, T. Parentage determination in kin-structured populations: microsatellite analyses in the Siberian jay *Perisoreus infaustus* during a 25-year population study. *Avian Science*, 1: 3-14, 2001.
- LILLANDT, B.; BENSCH, S.; VON SCHANTZ, T. Family Structure in the Siberian Jay as Revealed by Microsatellite Analyses. *The Condor*, 105: 505-514, 2003.
- LINN, R.A. The identification of genetic markers in the Roseate Spoonbill, *Ajaia ajaja*, and the family Bovidae and their application in captive population management. Dissertação (Mestrado em Ciências). Texas A & M University, EUA. 1993.
- LOPES, I. F. Diferenciação genética entre populações de cabeça-seca (*Mycteria americana*). Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2002.
- LOPES, I. F.; HAIG, S.; DEL LAMA, S. N. Genetic status and structure of the Jabiru Storks from the Brazilian Pantanal. Meeting presentation. Thirty-Second Annual Meeting of the Pacific Seabird Group, Twenty-Seventh Annual Meeting of the Waterbird Society. Portland, Oregon, USA. p. 82. 2005.
- LOPES, I. F.; ALVARENGA, R. A. A. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; DEL LAMA, S. N. Demographic history of the Wood Stork (*Mycteria americana*) Brazilian Pantanal colonies revealed by mitochondrial DNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, no prelo.

- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistic confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655, 1998.
- MC DONALD, D. B. Microsatellite DNA Evidence for Gene Flow in Neotropical Lek-Mating Long-Tailed Manakins. *The Condor*, 105: 580-586, 2003.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R.; PHELPS JR., W. H. A guide to the birds of Venezuela. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 1978.
- MIYAKI, C. Y.; MATIOLI, S. R.; BURKE, T.; WANJAL, A. Parrot Evolution and Paleogeographical Events: Mitochondrial DNA Evidence. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 544-551, 1998.
- NAROSKY, T.; YZURIETA, D. Birds of Argentina and Uruguay. A Field Guide 15th edn. Editora Vazquez Mazzini Editores, Buenos Aires, 2003.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590, 1978.
- OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a infinite population. *Genetic Research*, 22:201-204, 1973.
- OREN, D. C. Aves do Estado do Maranhão, Brasil. *Goeldiana Zool.*, 9: 1-55. 1991.
- OTA, T. Dispan: Genetic Distance and Phylogenetic Analisis. Pennsylvania State University, PA, USA. 1993.
- PAETKAU, D.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3: 489-495, 1994.
- PAILLISSON, J. M., REEBER, S.; MARION, L. Bird assemblages as bio-indicators of water regime management hunting disturbance in natural wet grasslands. *Biological Conservation*, 106, 115-127, 2002.
- PALMER, R. S. Handbook of North American birds. Yale Univ. Press, New Haven, CT., Vol. 1, 1962.
- PALO, J. U.; MÄKINEN, H. S.; HELLE, E.; STENMAN, O.; VÄINÖLÄ, R. Microsatellite variation in ringed seals (*Phoca hispida*): genetic structure and history of the Baltic Sea population. *Heredity*, 86: 609- 617, 2001.
- PLASBØLL, P. J.; ALLEN, J.; BERUBE, M.; CLAPHAM, P. J.; FEDDERSEN, T. P.; HAMMOND, P. S.; HUDSON, R.; JØRGENSEN, H.; KATONA, S.; LARSEN, A. H.; LARSEN, F.; LIEN, J.; MATTILA, D. K.; SIGURJONSSON, J.; SEARS, R.; SMITH, T.; SPONER, R.; STEVICK, P.; ØIEN N. Genetic tagging of Humpback whales. *Nature*, 388: 767-769, 1997.
- PARSONS, K. M.; PIERTNEY, S. B.; MIDDLEMAS, S. J.; HAMMOND, P. S.; Armstrong, J. D. DNA-based identification of salmonid prey species in seal faeces. *Journal of Zoology London*, 266: 275-281, 2005.
- PEARCE, J. M.; FIELDS, R.; SCRIBNER, K. T. Nest material as a source of genetic data for avian ecological studies. *Journal of Field Ornithology*, 68: 471-481, 1997.
- PIERTNEY, S. B.; MacCOLL, A. D.C.; LAMBIN, X.; MOSS, R.; DALLAS, J. F. Spatial distribution of genetic relatedness in a moorland population of red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 317-331, 1999.

- PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.-M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539, 2004.
- POWELL, G. V. N.; BJORK, R. D. Relationships between hydrologic conditions and quality and quantity of foraging habitat for Roseate Spoonbills and other wading birds in the C-111 Basin. South Florida Res. Center, Everglades Natl. Park, Natl. Park Serv., Second Annual Rep., Homestead, FL., 1990.
- PRIMMER, C. R.; MØLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A widerange survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365- 378, 1996.
- PRIMMER, C. R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B. P.; MØLLER, A. P.; ELLEGREN, H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, 7: 471- 482, 1997.
- PRIMMER, C.; PAINTER, J. N.; KOSKINEN, M. T.; PALO, J. U.; MERILA, J. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36: 348-360, 2005.
- PRUGH, L. R.; RITLAND, C. E.; ARTHUR, S. M.; KREBS, C. J. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, 14: 1585-1596, 2005.
- QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 49: 1280-1283, 1989.
- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecoogy and Evoution*, 8: 285–288, 1993.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP Version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86:248-249, 1995.
- RIBAS, C. C.; MIYAKI, C. Y. Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: species limits and historical biogeography in the solstitialis group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 663–675, 2004.
- RIBAS, C. C.; GABAN-LIMA, R.; MIYAKI, C. Y.; CRACRAFT, J. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography*, 32, 1409–1427, 2005.
- ROBERTSON, A.; HILL W. G. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, 107: 713-718, 1984.
- ROCHA, C. D. Variabilidade genética nas populações de Cabeça-seca do Pantanal pelo estudo de microssatélites. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2002.
- ROCHA, C. D.; DEL LAMA, S. N.; REGITANO, L. C. A. Lack of Genetic Structuring among Tropical Brazilian Wood Stork Populations and Low Genetic Differentiation from North American Populations. *Biotropica*, 36: 248-258, 2004.
- ROON, D. A.; THOMAS, M. E.; KENDALL K. C.; WAITS, L. P. Evaluating mixed samples as a source of error in non-invasive genetic studies using microsatellites. *Molecular Ecology*, 14: 195-201, 2005.
- ROUSSET F. Equilibrium values of measure of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, 142: 1357-1362, 1996.

- RUDNICK, J. A. TODD E. KATZNER, EVGENY A. BRAGIN, O. EUGENE RHODES JR.; J. ANDREW DEWOODY. Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular Ecology*, 14: 2959-2967, 2005.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- SANTOS, M H. Estudo de Haplótipos de DNA mitocondrial de colhereiros (Aves, Ordem Ciconiiformes, *Platalea ajaja*). 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução)- Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2005.
- SANTOS, M. H. Variabilidade genética na população pantaneira de Colhereiros (*Platalea ajaja*). 2003. 30p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Programa de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- SANTOS, M. S.; GONÇALVES E. C.; BARBOSA, M. S. R.; SILVA, A.; SCHNEIDER, M. P. C. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber*: Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes*, doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01211.x. Acessado em: 02 Abril de 2006.
- SAWYER, G. M. DNA profiling of captive Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*) populations as a mechanism of determining lineage in colonial nesting birds. 2002. 356p. Tese (Doutor em Ciências)- University of North Texas, Texas, USA.
- SCHNEIDER, S; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. ARLEQUIN ver. 2000: A software for population genetics analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- SEGELBACHER, G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes*, 2: 367-369.
- SEGELBACHER, G., HÖGLUND, J.; STORCH, I. From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular Ecology*, 12: 1773–1780, 2003.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco. Segunda impressão, Rio de Janeiro. 1997.
- SILVA, F.; BELLO FALLAVENA, M. A. Movimentos de dispersão de *Platalea ajaja* (Aves: Threskiornithidae) detectados a través de anilhamento. *Revista Ecológica Latinoamericana*, 2: 19-21, 1995.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39:53-65, 1985.
- SNEATH P. H. A.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy - The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman, San Francisco, 1973.
- STEINER, U. K; GASTON, A. J. Reproductive consequences of natal dispersal in a highly philopatric seabird. *Behavioral Ecology*, 16: 634-639, 2005.
- STOW, A. J., SUNNUCKS P., BRISCOE D. A.; GARDNER, M. G. The impact of habitat fragmentation on dispersal of Cunningham's skink (*Egernia cunninghami*): evidence from allelic and genotypic analyses of microsatellites. *Molecular Ecology*, 10: 867–878, 2001.

- SURRIDGE, A. K., IBRAHIM K. M, BELL, D. J., WEBB, N. J., RICO, C.; HEWITT, G. M. Fine-scale genetic structuring in a natural population of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Molecular Ecology*, 8:299-307, 1999.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, 17:6463-6471, 1989.
- TAYLOR, A.C.; HORSUP, A ; JONHSON, C.N.; SUNNUCKS, P.; SHERWIN, B. Relatedness structure detected by microsatellite analysis and attempted pedigree reconstruction in an endangered marsupial, the northern hairy-nose wombat *Lasiorhinus krefftii*. *Molecular Ecology*, 6: 9-19, 1997.
- TEMPLETON, A. *Population Genetics and Evolutionary Theory*. Wiley-Liss, U.S.A. 2006.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A M.; SCHABLE, N.; BRYAN, A; BRISBIN, I.; DEL LAMA., S.; GLENN, T.C. Development of Microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3:563-566, 2003.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A. M. Populações de *Mycteria americana* L. (Aves; Ciconiiformes) da América do Norte e do Pantanal Brasileiro: Estruturação genética, razão sexual e assimetria flutuante. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2004
- TOSTAIN, O.; DUJARDIN, J. L.; ERARD, C.; THIOLLAY, J. M. Oiseaux de Guyane. *Societe d'Etudes Ornithol.* Brunoy, France. 1992.
- VAN BEKKUM, M.; SAGAR, P. M.; STAHL, J-C.; CHAMBERS, G. K. Natal philopatry does not lead to population genetic differentiation in Buller's albatross (*Thalassarche bulleri bulleri*). *Molecular Ecology* 15: 73-79, 2006.
- VAN DEN BUSSCHE, R. A., HARMON, S. A . BAKER, R. J ., LAWRENCE BRYAN JR., A., RODGERS J. A., HARRIS, M. J . & BRISBIN JR., I. L. Low Levels of Genetic Variability in North American Populations of The Wood Stork (*Mycteria americana*). *The Auk* 116:1083-1092, 1999.
- WEBSTER, M.; CHUANG-DOBBS, H. C.; HOLMES, R. T. Microsatellite identification of extrapair sires in a socially monogamous warbler. *Behavioral Ecology* 12: 439-446, 2001.
- WEBSTER, M. S.; REICHART, L. Use of Microsatellites for Parentage and Kinship studies in animals. *Methods in Enzymology*, 395: 222-238, 2005.
- WEBSTER, M. S.; WESTNEAT, D. F. The use of molecular markers to study kinship in birds: techniques and questions. In: DE SALLE, R; SCHIEWATER, B. (eds.). *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhäuser Verlag Basel. Berlim, 1998.
- WEIR B. S. *Genetic data analysis*. Sinauer Publ., Sunderland, MA. 1990.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-Statistics for the analisis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370, 1984.
- WILLBERG, M. J.; DREHER, B. P. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes*, 4: 783-785, 2004.
- WHITE, D. H.; MITCHELL, C. A.; CROMARTIE, E. Nesting ecology of Roseate Spoonbills at Neuces Bay, Texas. *Auk*, n. 99, p. 275-284, 1982.

- WHITTAKER J. C.; HARBORD R. M., BOXALL N., MACKAY I., DAWSON G.; SIBLY R. M. Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics*, 164: 781–787, 2003.
- WOODS, J.G., PAETKAU, D., LEWIS, D., MCLELLAN, B.N., PROCTOR, M.; STROBECK, C. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27: 616-627, 1999.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics*, 15:323-354, 1951.
- WRIGHT, T. F.; RODRIGUEZ, A. M.; FLEISCHER, R. C. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. *Molecular Ecology*, 14: 1197–1205, 2005.
- YAMASHITA, C.; VALLE, M. P. Sobre ninhais de aves do Pantanal do município de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Vida Silvestre Neotropical*, n. 2, p.59-63, 1990.
- YEUNG, C. K.-L.; YAO, C.-T.; HSU, Y.-C, WANG, J.-P.; LI, S.-H. Assessment of the historical population size of an endangered bird, the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) by analysis of mitochondrial DNA diversity. *Animal Conservation*, 1: 1-10, 2006.
- ZHANG, B.; FANG S. G.; XI, Y. M. Low genetic diversity in the Endangered Crested Ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. *Bird Conservation International*, 14:183–190, 2004.
- ZAR, J. 1996. *Biostatistical Analysis*. 4th Edition. Prentice Hall. UK

Apêndice

9. APÊNDICE

Genótipos em seis locos de microssatélites e sexo de 30 amostras de penas de adultos de colhereiro coletadas na colônia reprodutiva de São Bom Jesus. S/D: Sem dado.

Amostra	Sexo	WS03	WS09	Aaju 1	Aaju 2	Aaju3	Aaju5
RC01	Fêmea	174/176	273/273	160/160	245/249	173/176	203/203
RC02	Macho	174/174	273/273	169/178	229/233	173/176	203/203
RC03	Fêmea	174/176	273/273	178/184	233/245	176/203	200/203
RC04	Macho	176/176	273/276	160/169	241/249	176/197	203/203
RC05	Fêmea	174/176	273/273	160/163	229/249	197/203	200/203
RC06	Macho	174/176	273/273	163/184	245/249	173/206	200/203
RC09	Fêmea	174/176	273/276	166/178	S/D	176/209	197/200
RC10	Fêmea	174/176	273/273	184/190	233/245	173/176	200/206
RC11	Macho	174/174	273/273	160/160	233/241	173/176	200/209
RC12	Macho	174/176	273/273	178/184	241/249	176/176	194/200
RC13	Fêmea	174/176	273/276	160/169	233/245	176/197	197/203
RC14	Fêmea	176/176	273/273	166/169	229/233	197/203	200/203
RC16	Fêmea	176/176	273/276	178/184	245/249	176/176	203/209
RC17	Macho	174/176	273/273	178/190	233/245	173/176	203/203
RC18	Fêmea	174/176	273/276	184/190	229/233	173/176	203/203
RC20	Macho	174/174	273/276	163/184	245/249	176/206	203/203
RC21	Fêmea	174/176	276/276	160/166	229/233	203/209	197/203
RC22	Fêmea	176/176	273/273	169/184	241/245	197/203	200/203
RC24	Macho	174/176	273/273	184/184	245/249	173/176	200/209
RC25	Fêmea	174/176	273/276	178/184	245/249	S/D	197/200
RC26	Macho	174/176	273/273	169/178	229/245	176/197	200/203
RC27	Macho	174/176	273/273	160/163	233/233	197/206	203/203
RC28	Macho	176/176	273/276	163/178	229/233	203/209	203/203
RC29	Fêmea	174/174	273/273	160/184	233/249	173/176	197/203
RC30	Macho	174/176	273/276	184/184	245/245	176/197	200/206
RC31	Macho	176/176	273/273	178/184	245/249	176/176	203/203
RC32	Fêmea	174/174	273/273	163/169	233/245	173/176	203/203
RC33	Macho	174/176	273/276	160/166	229/241	173/176	200/203
RC34	Macho	174/176	273/273	169/184	245/249	176/203	194/203
RC35	Fêmea	174/174	273/276	160/169	241/245	173/197	203/203