

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

CRISTIANA TRUJILU GERONIMO

**Diversidade e estruturação genética em populações africanas e
brasileiras de garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*, Linnaeus, 1758)
determinadas por microssatélites**

SÃO CARLOS / SP

2018

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

CRISTIANA TRUJILU GERONIMO

**Diversidade e estruturação genética em populações africanas e
brasileiras de garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*, Linnaeus, 1758)
determinadas por microssatélites**

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

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Nassif Del Lama

SÃO CARLOS / SP
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Cristiana Trujilu Geronimo, realizada em 13/08/2018:

Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama
UFSCar

Profa. Dra. Alexandra Sanches
UFSCar

P/ Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki
USP

Dedico esse meu trabalho a toda
minha família, principalmente meus
pais Cleverson e Emiliana

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente à Prof. Dra. Silvia Nassif Del Lama por seus conhecimentos transmitidos, seus conselhos, sua ajuda, e por acreditar e investir em mim que permitiram eu desenvolver esse trabalho.

À minha família, que mesmo longe nunca pararam de acreditar em mim e me apoiaram nas horas mais difíceis, meu pai Cleverson e meu irmão Cleverson Jr. que sempre me incentivaram a buscar novos conhecimentos, minha irmã Carolina que se preocupou todos os dias enquanto eu estava longe e minha mãe Emiliana, que sempre soube o que dizer para mim nos momentos mais difíceis de estar longe de casa.

À Juliane, Mayla, Gillize e Jaqueline, amigas de graduação, mas que sempre me acompanharam nessa minha etapa.

Meu colega e amigo de laboratório Fagner, por toda a sua ajuda nesse trabalho, pelo companheirismo, pelas festas, que tudo isso virou horas incontáveis que passamos juntos.

Aos meus amigos do laboratório do lado, Camila, Mariana, Paulinha, Leandro, sempre estavam dispostos a ajudar, pelas reuniões e festas com muitas comidas.

Ao Prof. Marco, Kátia e Isabel, por cederem o equipamento e correram as placas de genotipagem.

À Regina, pela ajuda inicial que me deu no laboratório, pela sua amizade que me manteve com os pés no chão e cabeça erguida.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa de mestrado que permitiram eu realizar esse trabalho.

RESUMO

Bubulcus ibis (garça-vaqueira) é um ardeídeo cuja distribuição original incluía os países da África, o sul da Europa e a Ásia Ocidental. No final do século XIX, essa espécie foi registrada no norte da América do Sul e em 1970 já estava espalhada por todo o continente. Uma das hipóteses da entrada dessa ave no continente supõe travessias transoceânicas, partindo do centro-oeste do continente africano e chegada nas regiões do Suriname e Guiana, donde teriam se dispersado. O objetivo desse trabalho foi estudar o processo de colonização recente do Brasil por meio de marcadores microssatélites. Foram analisados quatorze locos de microssatélites no DNA extraído de 300 amostras de sangue (N= 134 africanos e N= 166 brasileiros) de vinte e duas populações. Níveis de diversidade genética semelhantes foram encontrados nas populações africanas e brasileiras, mas uma maior tendência de maior diversidade foi observada nas populações africanas. Pelos testes de Fst e AMOVA, foi encontrada uma diferenciação significativa entre todas as populações e pelo Fst par a par, verificamos que essa diferenciação se deve mais às diferenças entre as populações brasileiras e africanas. A análise bayesiana de agrupamentos genéticos revelou uma clara estruturação entre as populações da área nativa e colonizada. Os resultados da análise bayesiana não apontam de qual região do oeste africano partiram as aves colonizadoras, mas revelam que estariam chegando principalmente na região nordeste/norte brasileira (Pará, Pernambuco e Fernando de Noronha). Níveis de diversidade genética semelhantes entre populações africanas e brasileiras e a ausência de endogamia nas populações brasileiras são compatíveis com a suposição que a colonização ocorreu com diversas entradas (propágulos) e com um número razoável de indivíduos. O grau de estruturação baixa descarta a ocorrência de fluxo contínuo, suposto anteriormente com os dados de regiões mitocondriais.

Palavras chaves: ardeídeos, colonização, microssatélites, diferenciação genética, populações

ABSTRACT

Bubulcus ibis (cattle egret) is an ardeid whose original distribution included the countries of Africa, southern Europe and Western Asia. At the end of the 19th century, the species was first recorded in northern South America and by 1970 already spread across the continent. One of the hypotheses of the entry of this bird on the continent assumes transoceanic crossings from Center-West of the African continent to the regions of Suriname and Guyana, and from this area they had dispersed. The objective of this work was to study the process of colonization of Brazil by means of microsatellite markers. We analyzed 14 microsatellite DNA loci extracted from 300 blood samples (N = 134 Africans and N = 166 Brazilians) of twenty-two populations. Similar levels of genetic diversity were found in the African and Brazilian populations, but a greater diversity was observed in African populations. By Fst and AMOVA tests, significant differentiation was found between all individual and by the pairwise Fst analysis was evident that this differentiation is due more to differences between the Brazilian and African populations. Bayesian analysis of genetic groupings revealed a clear structuring between populations of the native and colonized area. The result of the Bayesian analysis indicates that the birds would leave the West African region, without indicating which region and they arrived mainly in the Brazilian Northeast / North regions (Pará, Pernambuco and Fernando de Noronha). Similar levels of genetic diversity among African and Brazilian populations and the absence of inbreeding in the Brazilian populations are consistent with the assumption that the colonization occurred with several inputs (propagules) and with a reasonable number of individuals. The low degree of structuring discards the occurrence of gene flow, previously assumed with mitochondrial data.

Keywords: *ardeids*, colonization, microsatellite, genetic differentiation, populations

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa com a distribuição da espécie <i>Bubulcus ibis</i>	1
Figura 2: Indivíduo adulto de <i>Bubulcus ibis</i> na colônia reprodutiva do Parque Lago Azul, na cidade de Rio Claro-SP.	2
Figura 3: Ninhegos de <i>Bubulcus ibis</i> dentro de um ninho construído com galhos. Colônia reprodutiva no Parque Lago Azul, na cidade de Rio Claro-SP.	3
Figura 4: Mapa do continente sul americano, mostrando a data do primeiro registro em cada região.	7
Figura 5: Mapa do Brasil mostrando a localização dos pontos de coleta das amostras.	18
Figura 6: Mapa da África mostrando os países onde as colônias reprodutivas foram coletadas.	19
Figura 7: Coleta de sangue de um ninhego de garça vaqueira.	21
Figura 8: Gráfico dos valores de ΔK plotados em função de k	32
Figura 9: Análise bayesiana de agrupamentos genéticos.	33
Figura 10: Gráfico dos valores ΔK em função dos valores de k quando fornecido as populações como prior.	34
Figura 11: Análise bayesiana de agrupamentos genéticos, fornecendo as populações como prior.	34
Figura 12: Análise de componentes principais 850hPA geopotencial.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nome e coordenadas geográficas dos sítios de coleta.	19
Tabela 2: Tabela com primers dos locos de microssatélites analisados..	23
Tabela 3: Tabela dos erros de genotipagem para cada loco.	29
Tabela 4: Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total, presente nas populações.	30
Tabela 5: Valores de Fst estimados para os pares de populações.	31
Tabela 6: Tabela com os resultados da análise bayesiana de agrupamento populacional com base no método de DK (Evanno et al, 2005).	32
Tabela 7: Frequências dos alelos nos 14 locos nas populações africanas e brasileiras.	35
Tabela 8: Estimativas de diversidade genética para as populações africanas de <i>B. ibis</i>	39
Tabela 9: Estimativas de diversidade genética para as populações brasileiras de <i>B. ibis</i>	40
Tabela 10: Estimativas de diversidade genética para as populações de <i>B. ibis</i> no continente africano e no Brasil.	41
Tabela 11: Tabela de alocação..	42
Tabela 12: Tabela de alocação dos indivíduos brasileiros atribuídos às populações do continente africano.	43
Tabela 13: Indivíduos identificados como migrantes da primeira geração..	44

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 A garça vaqueira – biologia da espécie	1
1.2 A garça vaqueira e a invasão do continente americano.....	4
1.3. Os marcadores genéticos tipo microssatélites	8
1.4 Estudos anteriores sobre a invasão do continente americano pela garça vaqueira	10
2. Proposta de trabalho	14
3. Objetivos.....	17
4. Material e Métodos.....	18
4.1. Amostra.....	18
4.2 Extração de DNA	21
4.3. Amplificação do DNA	22
4.4. Genotipagem.....	24
4.5. Erro de genotipagem.....	25
4.6. Análise populacional	26
5. Resultados	28
5.1 Avaliação dos locos de microssatélites	28
5.2. Análises populacionais.....	30
5.2.1 Análises de diferenciação genética entre as populações	30
5.2.2 Frequências alélicas e estimativas de diversidade genética.....	35
5.2.3 Análises de alocação dos indivíduos	41
5.2.4. Detecção dos migrantes	43
6. Discussão.....	45
6.1. Diversidade genética nas populações brasileiras e africanas	45
6.2. Diferenciação genética entre as populações brasileiras e africanas.....	46

6.3. Teste de alocação e migrantes	50
7. Conclusão.....	52
8. Referências.....	54
Apêndice 1	61
Apêndice 2.....	66

1. Introdução

1.1 A garça vaqueira – biologia da espécie

Comumente chamada de garça-vaqueira aqui no Brasil, a espécie de ave *Bubulcus ibis* pertence à família Ardeidae da ordem Ciconiiformes (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Essa espécie apresenta três subespécies que se distribuem em regiões geográficas diferentes e se diferenciam pela coloração da plumagem reprodutiva e pelo tamanho (TELFAIR, 2006): *B. ibis ibis* (Linnaeus, 1758), originalmente encontrada na África, sul da Europa e na Ásia Oriental e hoje encontrada também no continente americano; *B. ibis coromandus* (Boddaert, 1783), encontrada na Ásia, Austrália e Nova Zelândia e *B. ibis seychellarum* (Salomonsen, 1934), presente apenas nas ilhas Seychelles, no oceano Índico. A distribuição não diferenciada das três subespécies está apresentada na Figura 1. Nesse trabalho enfocaremos apenas a subespécie *B. ibis ibis*.

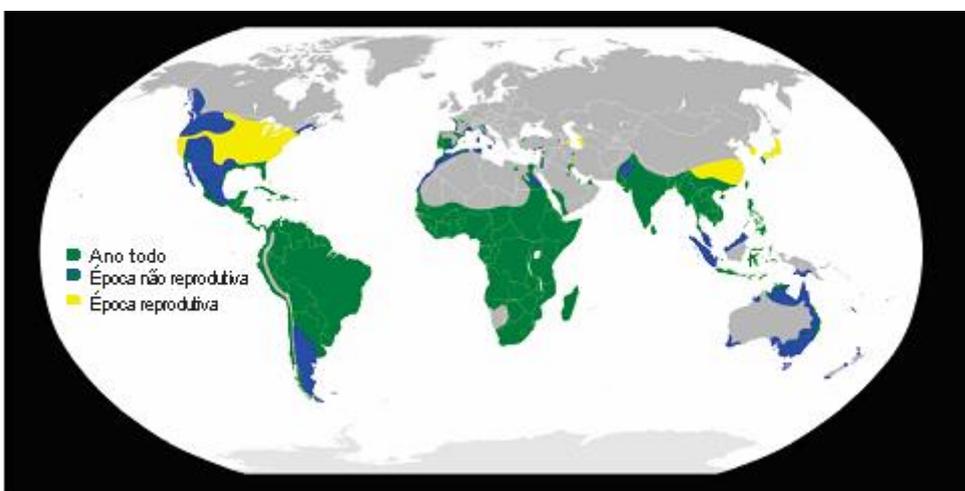


Figura 1: Mapa com a distribuição da espécie *Bubulcus ibis*.

FONTE: KUSHLAN; HANCOCK, 2005

A *B. ibis ibis* é uma ave de plumagem branca, com o bico, íris e tarsos amarelos (SICK, 1997) (Figura 2). Na época reprodutiva, essas aves apresentam

coloração alaranjada no alto da cabeça, no peito e dorso, chegando a apresentar plumagem em tons de ferrugem. (ANTAS, 2004). Os adultos medem de 46 a 56 cm de altura e possuem envergadura de 90 a 96 cm (KUSHLAN,1984). Os machos são maiores que as fêmeas e, na época reprodutiva, apresentam coloração mais intensa. Os indivíduos imaturos ou juvenis são semelhantes aos adultos, porém apresentam tarso, dedos e bicos negros e uma plumagem de cor cinza. (Figura 3) (KUSHLAN, 1984; SICK, 1997).



Figura 2: Indivíduo adulto de *Bubulcus ibis* na colônia reprodutiva do Parque Lago Azul, na cidade de Rio Claro-SP. Fica evidente a plumagem branca dos indivíduos com a cor alaranjada da plumagem reprodutiva

FONTE: Laboratório Genética de Aves, 2014.



Figura 3: Ninhedos de *Bubulcus ibis* dentro de um ninho construído com galhos. Colônia reprodutiva no Parque Lago Azul, na cidade de Rio Claro-SP.

FONTE: Laboratório Genética de Aves, 2014.

A garça-vaqueira consome na sua dieta preferencialmente insetos, mas pode ser considerada oportunista (HÖFLING; CAMARGO, 2002; SICK, 1997), suprimindo suas necessidades energéticas com invertebrados aquáticos, pequenos anfíbios, répteis e mamíferos (BELLA, 2003; HOCKEY; DEAN; RYAN, 2005). Durante o seu forrageamento, a garça-vaqueira apresenta mutualismo, uma relação ecológica interespecífica com animais de grande porte como elefantes, gnus, zebras, búfalos, na sua área nativa, sendo essa interação não obrigatória, mas benéfica. Após sua entrada no continente americano, foi observado que a espécie se associou com bovinos e outros ruminantes nativos como a lhama. Acredita-se que a provável expansão da garça-vaqueira nas Américas tenha sido favorecida pelo aumento da atividade agropecuária nesse continente desde o início da sua expansão (RICE, 1956).

A garça vaqueira é considerada uma ave aquática (Wetlands International, 2018), utiliza a beira de corpos d'água para seus poleiros fora da época reprodutiva

e constrói seus ninhos nas proximidades desses corpos, durante seu ciclo reprodutivo. Apesar de utilizar o ambiente aquático regularmente, ela não é dependente desse ambiente para obtenção de alimentos, diferentemente de outros ardeídeos. A espécie está bem adaptada a todos os tipos de ambientes, até os perturbados e antropizados (TELFAIR, 1994).

A garça vaqueira pode fazer mais de uma postura por ano, dependendo da disponibilidade de alimento no local. Moralez-Silva (2013) observou em seu trabalho de monitoramento 85 ninhos na colônia de Rio Claro que o tamanho da ninhada é em média de 2,3 ovos por ninho no ano de 2010. Nessa mesma colônia monitorada chegou a apresentar 1084 ninhos durante um ciclo reprodutivo (MORALEZ-SILVA, 2013).

1.2 A garça vaqueira e a invasão do continente americano

Segundo a International Union for Conservation of Nature's Invasive Species Specialist Group (ISSG), a garça vaqueira é considerada uma espécie exótica invasora, pois ela se encontra fora da sua área de distribuição natural e afeta negativamente a biota ocupada.

Para Davis (2009) a invasão biológica é caracterizada quando um organismo ocupa desordenadamente um espaço fora de sua área natural de dispersão geográfica e, frequentemente, está relacionada às influências antropogênicas, distúrbios naturais, superpopulação e disponibilidade de recursos. A invasão biológica é um dos principais componentes de mudanças, com efeitos potencialmente prejudiciais para a saúde pública, agricultura e biodiversidade da área invadida (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005). Segundo Blackburn; Lockwood

e Casey (2009), o processo de invasão é dividido em quatro etapas: o transporte, a introdução de indivíduos na área, o estabelecimento ou fixação deles e a dispersão para novas áreas. O sucesso na invasão depende de interações complexas entre a espécie invasora e as características físicas e biológicas do ambiente. Uma das interações é a pressão de propágulo, correlacionada com o sucesso do estabelecimento. A pressão de propágulos pode explicar não só por que alguns dos processos de invasão são bem sucedidos e outros falham, mas também porque o sucesso de estabelecimento é característico para cada espécie. A pressão de propágulo é dividida em dois componentes: o tamanho do propágulo (número de indivíduos que entram em cada evento de invasão) e o número de propágulos (número de eventos de entrada que ocorreram ao longo do processo de invasão) (LOCKWOOD; CASEY; BLACKBURN, 2005). Outros autores como Davis (2009), consideram esse processo menos complexo e supõe que a invasão ocorre de forma cíclica, com apenas duas etapas: a dispersão e o estabelecimento desses indivíduos na nova área.

Em uma revisão Estoup e Guillemaud (2010) definem o termo rota de invasão como o processo pelo qual os propágulos saem de suas fontes de origem para as populações invasoras. A reconstrução dessas rotas de invasão é necessária para se definir e testar diferentes hipóteses relativas ao ambiente e fatores evolutivos responsáveis pelas invasões biológicas. Em termos práticos, desvendar rotas facilita o desenho de estratégias para o controle e/ou prevenção de novas invasões.

A subespécie *Bubulcus ibis ibis* ocorreu originalmente nos países da África, sul da Europa e da Ásia Ocidental. Para explicar a entrada das aves no continente americano tem sido suposto a ocorrência de travessias oceânicas e migrações transatlânticas, com a expansão da espécie começando no início do século XX,

partindo do norte da América do Sul e expandindo-se para o oeste, sul e norte do continente (HAFNER, 2000). Não há registros de garças vaqueiras sendo transportadas ou escapando do cativeiro na América do Sul e Blaker (1971) considera que há evidências suficientes para sugerir que os indivíduos são capazes de fazer a travessia da África para as Américas. Espécies da família Ardeidae podem migrar milhares de quilômetros por ano (HANCOCK; ELLIOTT, 1978) e *B. ibis* são conhecidas como migrantes parciais, sendo comum a observação de juvenis errantes se dispersando por até mais de 5000 km distantes de sua área natal (BROWDER, 1973).

Os primeiros registros da espécie, no continente americano foram no final do século XIX (em 1877), no Suriname, chamada na época Guiana Holandesa, no norte da América do Sul (PALMER, 1962). Acredita-se que a região norte da América do Sul foi porta de entrada nas Américas, pois os primeiros registros estão nessa região. Desde essa época, a ave se dispersou para o oeste da América do Sul e região sul brasileira, conforme ordem cronológica dos registros (Figura 4). E atualmente essa espécie pode ser encontrada em todos os países da América do Sul.



Figura 4: Mapa do continente sul americano, mostrando a data do primeiro registro em cada região.

FONTE: TELFAIR, 1983

No Brasil, segundo Sick (1965) o primeiro registro foi feito em 1964, na ilha de Marajó (Pará). A primeira vez que a reprodução da espécie foi reportada no Brasil foi em 1973 (BELTON, 1974) no estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, a espécie é encontrada e se reproduz em todo o território brasileiro. A ampla expansão dessa espécie no nosso país está relacionada com o desmatamento para atividades agrícolas e principalmente com a expansão das atividades pecuárias. Outros fatores intrínsecos da própria espécie podem também ter contribuído como sua alta capacidade dispersora, com movimentos de longa escala e distância, muitas vezes sem direção (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) assim como pelo seu alto potencial reprodutivo (SICK, 1997).

Um exemplo do efeito negativo da garça vaqueira na área colonizada sobre espécies nativas é dado por Meese (2012) que monitorou e registrou, entre os anos de 2006 a 2011, a predação por *Bubulcus ibis* nos ninhos de Melro tricolor (*Agelaius tricolor*), ave endêmica na região do norte Califórnia (EUA) até a parte superior da Baja Califórnia, no México. Outro caso observado de predação de ninhos de aves nativas foi no arquipélago Fernando de Noronha, onde *Bubulcus ibis* invadiu colônias de nidificação da espécie *Sula Sula* (BARBOSA-FILHO et al., 2009) mostrando-se agressiva durante seu período de nidificação, e a predação da espécie endêmica do lagarto *Euprepis atlanticus* (SILVA-JR.; PERES-JR.; SAZIMA, 2005).

1.3. Os marcadores genéticos tipo microssatélites

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites são também denominados de repetições de sequências simples (simple sequence repeats; SSRs) e compreendem uma classe de marcadores que contém subunidades de DNA repetitivo, compostas de pequenas sequências de um a quatro nucleotídeos, justapostos e que se encontram dispersos no genoma, distribuídos aleatoriamente, estando geralmente localizados na região não-codificadora do genoma (KASHI; SOOLER, 1999). Estes marcadores apresentam herança codominante, são hipervariáveis e apresentam alelos que variam no número de subunidades, logo os alelos nesses locos são reconhecidos por tamanhos diferentes (JARNE; LAGODA, 1996).

Nos genomas dos eucariotos, essas pequenas sequências repetitivas de DNA são mais frequentes, estão mais bem distribuídas e formam locos genéticos muito polimórficos. Esses locos podem ser amplificados via reação de PCR (Polymerase

Chain Reaction), com o uso de um par de *primers* específicos (de vinte a trinta bases) que se anelam nas regiões flangeadoras que contém os microssatélites (a região com unidades repetitivas e que variam de tamanho de um alelo para o outro). Cada segmento amplificado pode diferir do alelo alternativo no tamanho e a diferença pode ser pequena como de 2 pb até várias dezenas de pb ou algumas centenas de pares de bases (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os fragmentos amplificados por PCR, nos locos mais polimórficos, apresentam tamanhos diferentes (dois tamanhos no máximo por indivíduo diplóide), caracterizando o polimorfismo resultante da presença de números diferentes de elementos simples repetidos (ESTOUP; JARNE; COURNET, 2002).

Atualmente os microssatélites são utilizados para estudos genéticos com diversos enfoques: para estudos do grau de estruturação de populações (CORRÊA et al., 2016), para a determinação do grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie (NIDIFFER; CORTES-ORTIZ, 2015), para a análise de paternidade (TAMBARUSSI, 2015), como ferramenta para avaliar os níveis de endogamia de uma população (BANHOS et al., 2016), para determinação do tamanho efetivo de uma população (NUSS et al., 2016), na avaliação da magnitude e direcionamento do fluxo gênico entre as populações (GARRIDO-GARDUNO et al., 2016), para mapas de ligação genética (YANG et al., 2016) e nos processos de colonização de uma população (JORDANA et al., 2016).

Prevê-se que o uso dos microssatélites continuará por muitos anos porque seu uso é comparativamente barato para genotipar e fornecer informação genética da população, em comparação com marcadores bialélicos como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (GARKE, 2012). Além disso, os microssatélites podem ser usados com sucesso para genotipagem de amostras com baixa concentração de

DNA ou de baixa qualidade, tais como amostras de museu e não invasivas (penas) (DAWSON et al, 2013).

Como a colonização do Brasil é recente (primeiro registro ocorreu em 1964), utilizaremos os marcadores microssatélites nesse trabalho, pois eles possuem uma alta taxa mutacional. Os microssatélites são marcadores adequados para os estudos de variabilidade genética, principalmente por seu alto grau de polimorfismo, padrão de herança codominante e alta taxa de mutação. A taxa de mutação geral para os microssatélites está entre 10^{-6} a 10^{-2} eventos por loco, por geração (LI et al., 2002), e são marcadores hipervariáveis com ampla abundância e alta distribuição pelo genoma, a sua neutralidade com relação à seleção natural e o seu polimorfismo alto (SCHLOTTERER, 2004); assim sendo considerados bastante informativos para estudos recentes de populações.

1.4 Estudos anteriores sobre a invasão do continente americano pela garça vaqueira

Estudos genéticos foram desenvolvidos no Laboratório Genética de Aves da UFSCar e iniciaram o processo para esclarecer como se deu a colonização do Brasil pela *B. ibis*. Campanini (2011) isolou locos de microssatélites e utilizou os dados nos locos Bi01, Bi08, Bi15, Bi18, Bi20, Bi22 e Bi26 para um estudo em cinco populações brasileiras (N=148) (Pará, Pernambuco, Fernando de Noronha, Amapá e Rio Grande do Sul). A autora concluiu que os maiores índices de variabilidade genética estavam nas populações do norte brasileiro, corroborando com a hipótese de que a entrada no país se deu por essa região. A autora discutiu ainda que por apresentar índices baixos de variabilidade genética e N_e baixo a população brasileira da espécie

deveria ter sido formada por um número pequeno de indivíduos, vindo do continente africano e entrado em um número pequeno de vezes no país. Como o trabalho incluía apenas amostras brasileiras e os locos apresentavam baixo polimorfismo, as conclusões foram preliminares e exigiam confirmação com um conjunto maior de dados.

Moralez-Silva (2013) e Moralez-Silva e Del Lama (2014) foram os primeiros a incluir amostras africanas no estudo do processo de colonização do Brasil por *B. ibis*. A análise foi baseada nas sequências da região controladora do DNA mitocondrial e foram incluídas amostras de quatro populações brasileiras (Pernambuco, Rio Grande do Norte, São Paulo e Rio Grande do Sul (N=51) e amostras de quatro populações africanas (Nigéria, Quênia, e duas populações de Gana (N=61). A conclusão principal foi que a garça-vaqueira reteve a maior parte da diversidade genética do mtDNA durante o processo de colonização no Brasil. Todas as populações brasileiras se diferenciaram geneticamente das populações africanas, mas Rio Grande do Sul se diferenciava menos da África do que as outras populações brasileiras. A suposição levantada foi que a expansão da colonização no país tinha começado pela região sul do país onde havia sido registrada a primeira colônia reprodutiva e onde é mais intensa a atividade agropecuária. O processo teria se expandido depois para as regiões sudeste e nordeste. Os dados não descartavam a possibilidade de um fluxo gênico contínuo entre as regiões brasileiras e africanas.

Um estudo com uma amostra mais representativa das populações africanas posicionadas na costa oeste foi desenvolvido por Congrains (2013) que analisou as sequências da região controladora e das ATPases 6 e 8 (DNA mitocondrial) e do íntron 5 do gene nuclear *Transforming growth factor beta-2* (TGFB2). Esse estudo

incluiu dezessete populações africanas (três em Guiné- Bissau, três em Senegal, dois em Gana, quatro em Nigéria, três na África do Sul, um em Quênia, e um em Cabo Verde (N = 412) e seis populações brasileiras (Pará, Rio Grande do Norte, Fernando de Noronha, Pernambuco, São Paulo e Rio Grande do Sul (N = 177). O autor não encontrou diferenciação genética baseada nos dados do DNAmIt (RC) entre as populações brasileiras do Pará, Rio Grande do Sul e de Cabo Verde em relação às populações africanas de Guiné-Bissau, Senegal, Gana e Quênia. Encontrou alguns haplótipos compartilhados entre indivíduos amostrados nos dois continentes. Para explicar os padrões observados, o autor supôs ocorrência de várias introduções de indivíduos africanos no Brasil e uma provável rota de entrada foi proposta: saindo da região Guiné-Bissau e Senegal para as regiões do Pará e Rio Grande do Sul, usando ilhas como a de Cabo Verde como ponto de descanso entre os dois continentes.

Outro tipo de estudo sobre a colonização do continente americano pela garça vaqueira foi feito baseando-se as análises de dados meteorológicos (MASSA; DOYLE; FORTUNATO, 2014). Os autores verificaram quais seriam as prováveis trajetórias dessa espécie supondo que as garças viessem das terras africanas para a América do Sul entre os anos de 1871 a 1920, e considerando apenas as direções dos ventos. Nesse período, as probabilidades das trajetórias bem sucedidas foram maiores supondo a saída do centro-oeste africano e sua chegada nas ilhas do Caribe e nas Guianas e Suriname. A trajetória mais curta seria saindo do Senegal e chegando ao Suriname (132 h de voo) nos meses de março ou abril, essa rota coincide com os primeiros avistamentos de *B. ibis* em Suriname registrados entre 1877 e 1882 (PALMER, 1962). Valverde (2003) relatou um caso onde uma garça-vaqueira anilhada no sul da Espanha foi encontrada no Caribe, na América Central,

em 1956; o autor pressupõe que a ave seguiu a rota de vento do sul da Europa até essa porção da América Central um dado paralelo que reforça a hipótese de Massa; Doyle e Fortunato (2014).

2. Proposta de trabalho

A colonização do Brasil por *Bubulcus ibis ibis* foi recente (cerca de 40 gerações) porém a ocupação foi rápida e, atualmente, podem ser encontradas populações ao longo de todo o território brasileiro. A hipótese mais aceita para explicar a entrada de garças vaqueiras no continente americano supõe travessias transoceânicas: as garças teriam partido da região centro-oeste africana para a região norte da América do Sul (CONGRAINS, 2013; MASSA; DOYLE; FORTUNATO, 2015). No continente americano, os primeiros avistamentos da espécie foram no Suriname, em 1877 e novamente em 1882 (PALMER, 1962). Em 1911-1912 as garças vaqueiras foram avistadas na Guiana (WETMORE, 1963). Apesar desses primeiros registros, foi somente em 1937 que essa ave foi capturada, na Guiana Inglesa (BLAKE, 1939) e foi quando se assegurou que a espécie não tinha entrado no país em gaiola, tendo sido listada como visitante ocasional. A partir dessa data, vários outros avistamentos e relatos que elas já se reproduziam na Guiana Holandesa em 1947 foram feitos (HAVERSCHMIDT, 1950). O primeiro registro brasileiro ocorreu apenas em 1964 na ilha do Marajó, no Pará (SICK, 1965).

Verificaremos nesse trabalho, se as suposições do trabalho anterior de Congrains (2013), que analisou quatro sequências, três de genes do DNA mitocondrial (Região Controladora, ATPases 6 e 8) e uma do DNA nuclear (Íntron 5 do gene TGFB2), se confirmam ou não. Os marcadores microssatélites são mais variáveis e mais adequados para se caracterizar um processo de colonização recente.

Uma das questões que podemos investigar é se a constituição genética das populações brasileiras é compatível com uma população derivada das populações

da costa oeste africana. O esperado nesse caso é que o repertório de alelos nas populações africanas seja maior do que nas brasileiras e que haja similaridade nas frequências dos alelos presentes na África e Brasil.

A rota proposta por Congrains (2013) supõe a saída das garças vaqueiras da região de Guiné-Bissau e Senegal. Massa; Doyle; Fortunato (2013) propõem também a região do Senegal como ponto de saída da África. Procuraremos verificar qual região africana entre as amostradas apresenta maior similaridade genética com as populações brasileiras, usando dados de microssatélites e, a partir dessa similaridade, confirmar ou não o local de saída da África.

Alguns pontos de entrada da garça vaqueira no Brasil já foram supostos em trabalhos anteriores: Congrains (2013) supõe entrada pelo Pará e Rio Grande do Sul, Moralez-Silva e Del Lama (2014) supõem que o início da colonização ocorreu no sul do Brasil. O padrão dos microssatélites poderá confirmar ou não as hipóteses anteriores. O esperado é que a população que apresentar maior número de indivíduos com padrão africano é a que está na rota de entrada no país.

Um dos fatores determinantes para o sucesso do estabelecimento de uma espécie em novas áreas ocupadas é a sua pressão de propágulo (tamanho e número de propágulos) (LOCKWOOD; CASEY; BLACKBURN, 2005). Ambos os fatores são desconhecidos no caso de *B. ibis* na América do Sul. Esse será outro ponto a ser investigado pelos dados de microssatélites: se a colonização ocorreu com poucos propágulos ou diversos propágulos. No primeiro cenário espera-se encontrar níveis muito diferentes de diversidade genética entre as áreas nativas e colonizadas e diferenciação genética entre as populações africanas e brasileiras. Enquanto que no segundo cenário, o esperado é encontrar níveis semelhantes de

diversidade genética e ausência ou baixa diferenciação genética entre as populações dos dois continentes.

3. Objetivos

Esse estudo objetiva esclarecer como ocorreu o processo de colonização recente do Brasil por *Bubulcus ibis ibis*, baseando-se em dados de microssatélites. Uma análise da diversidade e da diferenciação genética será feita comparando as populações nas áreas nativas africanas e nas colonizadas brasileiras. Serão investigadas as supostas rotas de invasão, com as saídas da África e os pontos de entrada no Brasil e se o processo envolveu um número pequeno ou grande de propágulos.

4. Material e Métodos

4.1. Amostra

O DNA analisado nesse estudo foi extraído de amostras de sangue estocadas no Laboratório de Genética de Aves/UFSCar. Essas amostras foram coletadas em seis localidades brasileiras (Pará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Fernando de Noronha, São Paulo e Rio Grande do Sul) e em colônias localizadas em cinco países africanos (Guiné-Bissau, Senegal, Gana, Nigéria e África do Sul) (Tabela 1, Figuras 5 e 6). A maioria das amostras é de ninhegos (Figura 7), exceção são as amostras do arquipélago de Fernando de Noronha e de Pernambuco, ambas coletadas de indivíduos adultos, capturados em locais de forrageamento e que foram eutanasiados. Cada colônia foi considerada uma população, as amostras de Fernando de Noronha e Pernambuco foram também tratadas como população, mas podem apresentar composição genética diferente.

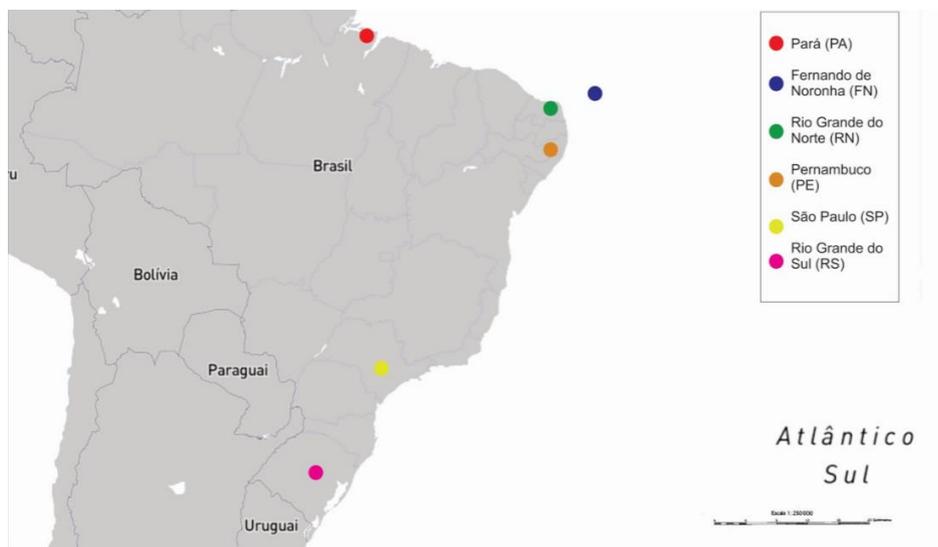


Figura 5: Mapa do Brasil mostrando a localização dos pontos de coleta das amostras. Cada ponto representa uma ou duas colônias reprodutivas e no caso de Fernando de Noronha e Pernambuco o local de forrageamento onde as aves adultas foram capturadas.

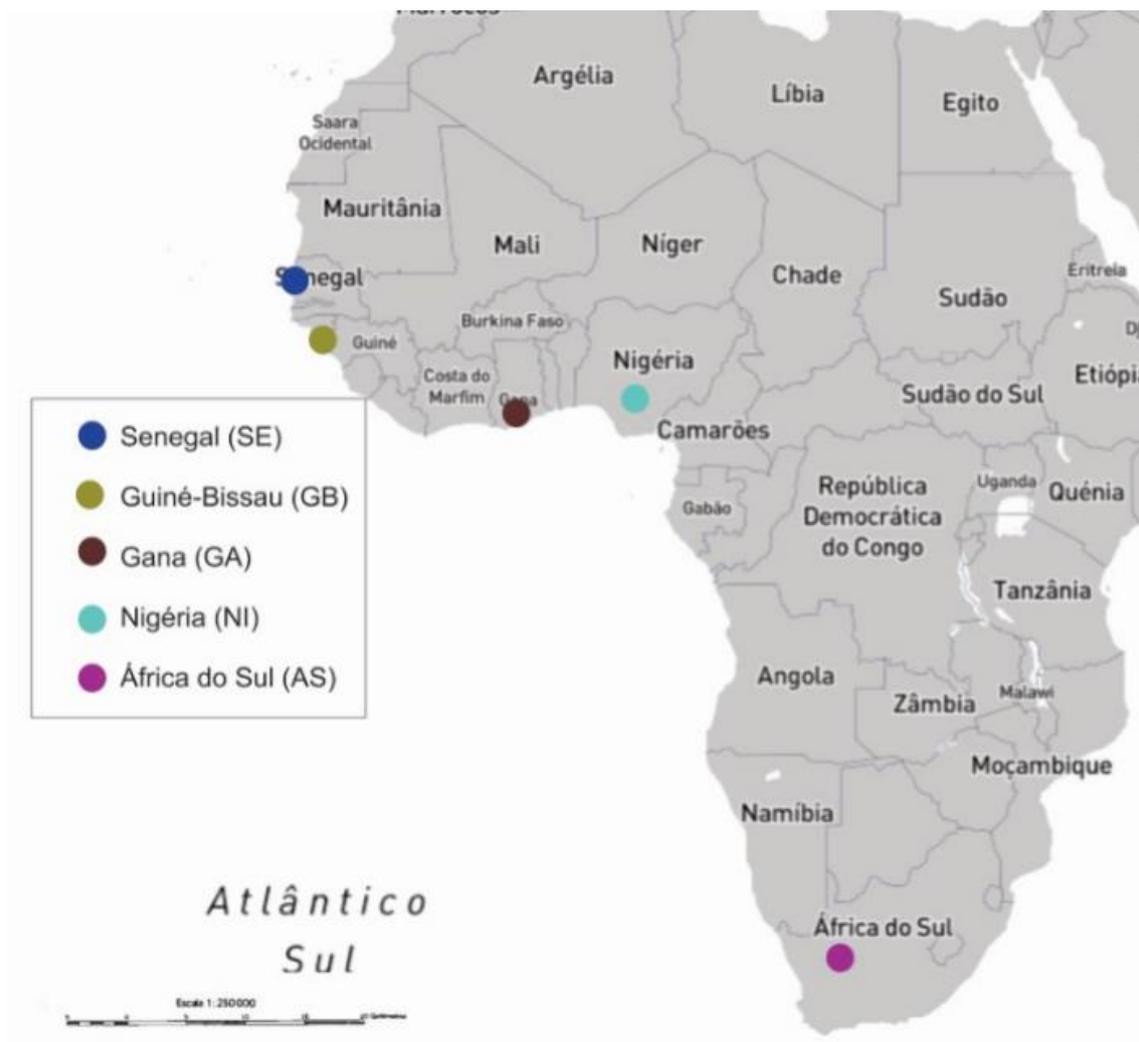


Figura 6: Mapa da África mostrando os países onde as colônias reprodutivas foram coletadas. Cada ponto representa o ponto médio entre duas - quatro colônias reprodutivas amostradas em cada país

Tabela 1: Nome e coordenadas geográficas dos sítios de coleta.

País	Colônia	Abrv.	N	Latitude	Longitude
Guiné-Bissau	Ilha de Bandim	IB GB	10	N 012°07'10.92"	O 015°40'12.84"
Guiné-Bissau	Atanque	AT GB	10	N 012°25'47.64"	O 016°05'25.98"
Guiné-Bissau	Ilha do Patrão	IP GB	4	N 011°15'49.62"	O 015°46'28.80"
Senegal	Zoo-Dakar	ZO SN	10	N 014°43'39.18"	O 017°25'53.70"
Senegal	Parc Somone	PS SN	10	N 014°29'51.66"	O 017°04'55.86"

Senegal	Thiés	TH SN	10	N 014°47'47.34"	O 016°55'52.98"
Gana	Korle Lagoon	KL GN	10	N 05°32'17.51"	O 000°13'12.14"
Gana	Bansom Colony	BC GN	10	N 05°06'28.50"	O 001°54'12.60"
Nigéria	Fobour Kasa	FK NG	10	N 09°51'51.62"	E 009°02'44.95"
Nigéria	Kurra Falls	KG NG	10	N 09°25'53.51"	E 009°00'02.27"
Nigéria	Fusa	FU NG	8	N 09°52'47.68"	E 008°58'15.49"
Nigéria	Toro	TO NG	2	N 010°02'04.99"	E 009°02'19.10"
África do Sul	Paarl	PA AS	10	S 033°41'03.06"	E 018°59'01.86"
África do Sul	Boshenmeer Golf State	BG AS	10	S 033°45'00.00"	E 018°59'00.00"
África do Sul	Rondevelei	RO AS	10	S 034°03'45.54"	E 018°29'43.5"
Brasil	Ilha de Marajó – Para	PA	30	S 00°30'19.50"	O 049°13'46.08"
Brasil	Mossoró - Rio Grande do Norte	RN	32	S 05°37'27.72"	O 036°52'33.6"
Brasil	Fernando de Noronha	FN	28	S 03°52'00.00"	O 032°26'00.00"
Brasil	Garanhuns- Pernambuco	PE	20	S 08°52'00.00"	O 036°28'00.00"
Brasil	Rio Claro- São Paulo	SP	27	S 022°30'00.00"	O 047°35'00.00"
Brasil	Barra da Ribeira - Rio Grande do Sul	BR RS	21	S 030°01'00.00"	O 051°31'00.00"
Brasil	Eldorado do Sul – Rio Grande do Sul	ES RS	8	S 030°01'00.00"	O 051°31'00.00"



Figura 7: Coleta de sangue de um ninhego de garça vaqueira. Foto da veia cava do ninhego, na colônia reprodutiva no município de Rio Claro-SP

FONTE: SILVA, 2015

4.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras de sangue, utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio modificado por Sambrook e Russel (2001). Adicionou-se a 30 μ l de papa de hemácias 220 μ l de tampão de lise (TRIS-HCl 10mM, pH 8,5, e KCl 50mM) com 0,5 U/ μ l proteínase K. A mistura foi incubada em banho-maria, durante à noite, à uma temperatura de 55°C. A extração teve início com a adição de 250 μ l de fenol e agitação por 10 minutos, seguida de centrifugação refrigerada por 10 min a 12000 rpm. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e adicionados 250 μ l de uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 25:24:1, respectivamente), agitados vagarosamente por 10 minutos e centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido novamente e adicionado 250 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) agitados e centrifugados por 10 minutos. O DNA foi precipitado depois de adicionado acetato de sódio 3M (10% do volume do sobrenadante), com adição de etanol absoluto (2,5 vezes o volume do

sobrenadante) e permanência a -18°C , pelo menos uma hora. Após a precipitação foram feitas duas lavagens com 750 μl de etanol 70% e centrifugados a 12000 rpm, a primeira por 30 minutos e a segunda por 10 minutos, descartando os sobrenadantes a cada lavagem. Após as lavagens com etanol, o DNA precipitado foi deixado para secar nos tubos e diluído com água milli-Q autoclavada. Cada solução de DNA foi quantificada no NanoVue Spectrophotometer (GE) e diluída em seguida para 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

4.3. Amplificação do DNA

O DNA das amostras foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), em quatorze locos de microssatélites (Bi32, Bi33, Bi34, Bi36, Bi38, Bi39, Bi40, Bi42, Bi43, Bi45, Bi46, Bi49, Bi50, Bi55) todos espécie-específicos e isolados no Laboratório Genética de Aves (Silva et al, em preparação). Seis desses locos (Bi32, Bi33, Bi34, Bi36, Bi38 e Bi43) já foram descritos por Miño et. al (2017).

Um protocolo padrão foi usado para os locos (Bi32, Bi33, Bi34, Bi36, Bi38, Bi39, Bi43, Bi46, Bi49, Bi50, Bi55), com *primers* específicos para cada loco e adição da fluorescência (FAM) separadamente na cauda M13 que foi incorporada nos fragmentos amplificados, conforme protocolo (SCHUELKE, 2000). O volume total da reação foi de 10 μl : 1,0 μl de tampão 10XS (Solis Biodyne), 1,5 μl dNTP 10 mM, 0,6 μl de MgCl_2 50 mM, 0,2 μl *primer forward* 10 mM e 0,8 μl do *primer reverse* 10mM, 0,8 μl do M13 10mM, 0,5 U de HOT FIREPol (HOT Start DNA Polymerase, Solis Biodyne). Em três locos (Bi40, Bi42, Bi45) foi usado o protocolo tradicional com os *primers* sintetizados com fluorescência: volume total 10 μl , 1,0 μl de tampão 10XS (Soli Biodyne), 1,5 μ dNTP 10 mM, 1,2 μl de MgCl_2 50 mM, 1 μl *primer forward* 10 mM e 1 μl *primer reverse* 10mM, 0,5 U de HOT FIREPol (HOT Start DNA Polymerase, Solis Biodyne).

O programa de amplificação usado com os *primers* com M13 foi: 95°C por 15" inicialmente, 30 ciclos com 95°C por 30", a temperatura de anelamento para cada *primer* por 45", e após a temperatura de extensão 72°C por 45", e mais 10 ciclos usando 95°C por 30", 53°C por 45" (temperatura para a cauda M13, se ligar à amplificação), mais 45" de 72°C para a extensão, finalizando com 10' de 72°C para a extensão final. O programa de amplificação usado com os *primers* marcados foi: temperatura inicial de 95°C por 15', mais 35 ciclos de 95°C por 30', a temperatura de anelamento respectivo para cada *primer*, e 72° por 45", finalizando com 72°C por 10'. As temperaturas de anelamento foram diferentes como mostra a Tabela 2. Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Os produtos foram visualizados em géis de agarose 1,5%, corados com Green Strain e fotografados pelo sistema Kodak Digital Science 1D. Quando a amplificação ocorria com rendimento bom, os produtos eram analisados em placa de genotipagem.

Tabela 2: Tabela com primers dos locos de microssatélites analisados. Os locos estão com os seus respectivos motivos, tamanhos esperados dos fragmentos e temperaturas de anelamento.

Loco	Motivo	Primers	Tamanho	Temperatura de anelamento
Bi32	(AG) ₁₂	F: GCTAAATTGCAGCTGTGGGA R: GGCTGTGGTCAGAGGAGTGA	164-172	58°C
Bi33	(AC) ₁₀	F: GGCAATGAAGACTGAAATGTGC R: GGACTCGATGATCTCAAAGGG	178-196	57°C
Bi34	(TG) ₁₁	F: AAACCTCTGCAACTCGCACAAA R: TGACACGATACCAACACCCA	104-110	55°C

Bi36	(AC) ₁₃	F: GTGTGGCCGCTCTTCTTTC R: AGCCTGTGGGTTTACTGCAC	82-94	56°C (-0,1°C x 10)
Bi38	(GA) ₁₀	F: TGCTGTTTAAATGCTGGTGC R: GTACGAGATCCGAACCCGA	182-192	55°C
Bi39	(TC) ₁₀	F: ACCACCTGATTCCACTTCCC R: GGCGCCCTGAACAGATTTAC	208-216	56°C
Bi40	(AG) ₁₀	F: GCTGAATCCTCGTGTGGT R: CCTCCTTCACCTTGCGATTT	92-98	56°C
Bi42	(TG) ₁₁	F: CCTGGAAGCCAAGGTGATTT R: TCCTTTGCACTAACAAGCCC	122-126	58°C
Bi43	(CA) ₁₀	F: AAATTGGTCAGCAGTGGGTG R: TCCACCACATGCCTCTGTTA	122-126	54°C
Bi45	(CA) ₁₂	F: GGTTTAATTTGCAGAGCAATGAG R: TTCGTATTTGCTGCCCAAAC	134-138	57°C
Bi46	(TG) ₁₀	F: GGAGACTCCGGAAGCCT R: CCGTCGGGTTGTGCAAT	152-162	60°C
Bi49	(GA) ₁₄	F: GACCAATAATCGCCTTTGGA R: GCACTGAGAGCGATTACAAA	152-172	58°C
Bi50	(CA) ₁₁	F: AGCGCTAACCCACGGATG R: CTGCAAGCGTTGGGTTCTC	112-148	60°C
Bi55	(AC) ₁₃	F: AGTCTGAATCTGGGTGTGGG R: ATCTTCTGGCTGAGCGTGTT	182-202	60°C

4.4. Genotipagem

Para montagem da placa que foi corrida no seqüenciado MegaBACE™1000 (Amersham Biosciences) Foi preparado um mixer e cada produto de PCR foi diluído em 7x com água. O mix para 96 amostras continha Tween 0,1% e o marcador de padrão interno de peso molécula. Para cada amostra de PCR foi usado 7,75 µl de tween 0,1% e 0,25 µl de marcador ET550 (para o marcador ROX500, esses valores são 7,50 µl e 0,50 µl, respectivamente). Foi pipetado 8 µl desse mix em cada poço da placa e o produto de PCR diluído (2 µl) adicionado. Foram usados como marcadores de padrão interno de peso molecular: o ET550 (GE Healthcare) e o ROX500 (GEL Company). Foram feitos controles para se obter equivalência dos alelos quando dois marcadores foram usados para o mesmo loco. Em alguns casos em que os picos nas leituras das placas ficavam muito altos ou muito baixos, a diluição dos produtos de PCR era modificada. Testes com quatro amostras com

genótipos diferentes, foram feitos para dez locos de microssatélites usando-se os dois padrões de peso molecular. O único deslocamento observado foi de 2 pb nos locos Bi39 e Bi45, na leitura com o marcador ROX500.

A análise dos genótipos para cada indivíduo foi realizada após eletroforese capilar no sistema MegaBACE™1000 (Amersham Biosciences). Os eletroferogramas foram analisados pelo software Genetic Profiler usando MegaBACE Fragment Profiler versão 1.2 (Amersham Biosciencesm).

Foi feita a leitura de todas as placas por duas pessoas, a fim de não possuir erros de leitura, também algumas das amostras foi refeito desde um novo PCR, para confirmar os genótipos das amostras.

4.5. Erro de genotipagem

Foi calculado o erro de genotipagem utilizando-se o método de Pompanon et al. (2005). Foram feitos quatro PCRs diferentes para as mesmas amostras e foram regeotipadas para 5% da amostra total.

O cálculo inicialmente foi feito para cada loco com a fórmula (1):

$$el = ml/nt \quad (1)$$

Onde, el (taxa média de erro por loco), ml (o número de genótipos que contêm padrões discordantes de alelo), e nt (o número de genótipos replicados para o loco). Após o cálculo para cada loco, foi calculada a taxa média de erro de genotipagem multilocos (e_{obs}) com a fórmula (2):

$$e_{obs} = mg/nt \quad (2)$$

Onde, mg (o número de genótipos multilocus que contêm padrões discordantes de alelo), e nt (o número de genótipos multilocus replicados).

4.6. Análise populacional

A análise foi iniciada calculando-se se ocorria desequilíbrio de ligação pelo pacote Genepop versão 4.7.0 (ROUSSET, 2017), corrigidas pelo método de Bonferroni (HOLM, 1979), com o programa R versão 3.4.4. No programa BayeScan 2.1 (FOLL, 2012) foi verificado se havia algum loco sob seleção. A hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada mediante o teste exato (HALDANE, 1954; WEIR et al, 1990; GUO; THOMPSON, 1992), com correção de Bonferroni (HOLM, 1979) calculado pelo pacote Genepop versão 4.7.0 do programa R.

No programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi averiguado se havia ocorrência de alelos nulos, de amplificação alelo-diferencial (“allele dropout”) e de picos não específicos nos eletroferogramas, as frequências dos alelos nulos, foi feito pelo método de Brookfield (1996) no programa Micro-Chercker. Pelo programa CERVUS 3.0.3 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) foi calculado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC – “Polymorphic Information Content”) (BOTSTEIN et al., 1980).

Pelo programa GenAIEx 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foram estimadas as frequências alélicas por loco e por população, as heterozigosidades esperadas (H_e) e observadas (H_o), heterozigosidades esperadas não enviesadas (uH_e) e foi verificada a presença de alelos privados para cada população.

A riqueza alélica (RA) e coeficiente de endogamia (Fis) foi calculada pelo programa FSTAT (GOUDET, 2002). A estimativa de diferenciação populacional F_{st} (com o seu respectivo p) (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983), a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; LAVAL; SCHEINEIDER, 2005) foram

calculados pelo programa Arlequin v.3.5.2.2 (SCHENEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000) partindo-se da hipótese nula de união aleatória dos gametas.

O teste de alocação foi feito utilizando-se o programa GeneClass 2.0 (PIRY et al, 2004), pelo método Baesiano de Rannala e Mountain (1997), com probabilidade alpha de 0,05 e números de simulações individuais de 1000. O teste de detecção da primeira geração de migrantes foi feito utilizando-se o mesmo programa.

A existência de estruturação populacional baseada no genótipo dos indivíduos foi examinada usando-se o procedimento Bayesiano baseado no modelo implementado no programa STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), a corrida foi feita com *burnin* de 20.000, mais 500.000 repetições para k de 1 a 10, vinte vezes cada e não foram dadas informações prévias sobre os locais de origem de cada indivíduo. A leitura da análise foi feita utilizando-se o Structure Harvest (DENT; BRIDGETT, 2012) seguindo a metodologia DK de Evanno; Regnaut; Goudet (2005) e os gráficos bar-plot foram obtidos pelo STRUCTURE PLOT V.2.0 (RAMASAMY et al., 2014).

5. Resultados

O conjunto de amostras analisadas nesse estudo compreende sete populações brasileiras (N = 166), agrupadas em algumas análises populacionais por regiões (norte-nordeste, sudeste e sul) e quinze colônias africanas (N = 134), agrupadas segundo seus países de origem (Senegal, Guiné Bissau, Gana, Nigéria e África do Sul). As amostras brasileiras foram genotipadas nos 14 locos de microssatélites: Bi32, Bi33, Bi34, Bi36, Bi38, Bi39, Bi40, Bi42, Bi43, Bi45, Bi46, Bi49, Bi50, Bi55 nesse estudo. As amostras africanas foram genotipadas nos locos Bi32, Bi33, Bi34, Bi36, Bi38 e Bi43 por Laroca (2015) e nos demais oito locos genotipadas nesse estudo.

5.1 Avaliação dos locos de microssatélites

Cada loco mostrou um padrão de picos diferentes, os padrões característicos dos alelos em cada loco estão apresentados com os eletroferogramas no Apêndice 1; Figura S1.1-14.

A taxa média dos erros de genotipagem foi calculada para cada loco segundo Pompanon et al (2005) (Tabela 3) e variou de 2,5% até 32,5%. Os locos Bi34 e Bi 36 apresentaram os maiores índices de erros de genotipagem. A taxa média de erro de genotipagem multilocos foi estimada com e sem esses dois locos, obtendo-se um valor de 13 e 11%, respectivamente. Como a taxa de erro de genotipagem multilocos não variou significativamente com a exclusão dos dois locos, optou-se pela manutenção desses dois locos nas análises populacionais.

Tabela 3: Tabela dos erros de genotipagem para cada loco. El = erro médio do loco, ml = o número de repetições que contêm padrões discordantes de alelo e nt = o número total de replicações feitas para o loco. (POMPANON, 2005)

Locos	Erro de Genotipagem ((EL=ml/nt). 100%)
Bi32	5,0
Bi33	17,5
Bi34	32,5
Bi36	22,5
Bi38	5,0
Bi39	15,0
Bi40	5,0
Bi42	2,5
Bi43	15,0
Bi45	5,0
Bi46	12,5
Bi49	12,5
Bi50	2,5
Bi55	17,5

Nenhum par de locos apresentou desequilíbrio de ligação após a correção de Bonferroni, considerando-se todos os pares de locos em todas as populações. Apenas uma exceção foi observada na população de Fernando de Noronha (FN), com valor significativo para desequilíbrio de ligação entre os locos Bi33 e Bi50. No entanto, como esse desequilíbrio foi detectado em uma única população, optou-se por não se excluir um dos dois locos da análise populacional. Esse desequilíbrio pode ser explicado pela amostra dessa localidade que, nesse caso, era formada por adultos capturados para serem eutanasiados e que podem pertencer à mais de uma população.

Nenhum dos locos demonstrou estar sob seleção pelo teste do programa BayScan. Na análise pelo programa Microchecker foram encontradas ocorrências de

alelos nulos nos locos Bi32, Bi33, Bi34, Bi38, Bi39, Bi43 e Bi50, as frequências dos alelos nulos variou de 0,0935 na população de Fernando de Noronha para o loco Bi33 a 0,2711 no loco Bi39 na população do Rio Grande do Sul. Optamos por não fazer a correção para os alelos nulos, pois os alelos nulos não ocorriam em todas as populações e como a correção supõe EHW, poderia ser introduzido um viés nas análises populacionais.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,793 no loco Bi50 a 0,207 no loco Bi40, que continha o menor número de alelos (três alelos, sendo um deles extremamente raro, encontrado em apenas uma população). O loco Bi32 apresentou uma maior quantidade de número de alelos dentre os locos trabalhados com um total de 19 alelos em todas as populações (PIC de 0,782).

5.2. Análises populacionais

5.2.1 Análises de diferenciação genética entre as populações

O F_{st} global foi baixo, porém significativo 0,0231 ($p = 0,00683$, $\alpha < 0,05$). A análise de variância molecular global (AMOVA) (Tabela 4) foi desenvolvida com 1000 permutações e mostrou que a maior parte da distribuição da variação genética pode ser explicada pela variação entre os indivíduos (95,8%) e apenas 2,3 % é explicada pelas diferenças entre populações. A diferenciação global detectada se deve principalmente às diferenças encontradas entre populações brasileiras e africanas, detalhadas na análise do F_{st} par-a-par (Tabela 9).

Tabela 4: Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total, presente nas populações. SS= soma dos quadrados.

Fonte	SS	Estimativa da Variância	% da Variância Total.
Entre populações	101,550	0,10496	2,3
Entre indivíduos dentro das	1286,185	0,08518	1,9

populações			
Dentre os indivíduos	1285,550	4,35367	95,8
Total	2673,235	4,54382	100,0

Na diferenciação entre as populações par-a-par (Tabela 5), observa-se valores baixos de Fst, mesmo após a correção de Bonferroni, apresentam valores de p significativos para a maioria dos pares de populações. Todos os países africanos se diferenciam de todas populações brasileiras. A única exceção é Senegal (SN) que não se diferencia de todos os países amostrados do continente africano e nem da população de Pernambuco (PE).

Tabela 5: Valores de Fst estimados para os pares de populações. * estão em negritos os pares cujo valor de p foi significativo ($p < 0,05$), após correção de Bonferroni.

	SN	GN	NG	AS	FN	PA	PE	RN	SP	RS
GB	0,00582	0,0136	0,01465*	0,01042	0,05148*	0,05013*	0,04281*	0,06322*	0,0508*	0,05161*
SN	0	0,00363	0,0074	0,00183	0,02886*	0,02481*	0,01861	0,03312*	0,02685*	0,02887*
GN		0	0,00142	0,00615	0,02413*	0,0285*	0,01716*	0,0307*	0,03869*	0,03534*
NG			0	0,00567	0,02173*	0,02622*	0,02221*	0,03066*	0,0372*	0,02944*
AS				0	0,0374*	0,03161*	0,02544*	0,03886*	0,0385*	0,03729*
FN					0	0,01815*	0,01839*	0,02312*	0,00713	0,0154*
PA						0	0,00381	0,00246	0,00933	0,01002
PE							0	0,00062	0,01044	0,01501*
RN								0	0,01444	0,01388
SP										0,0036

A análise bayesiana de agrupamentos genéticos foi desenvolvida, utilizando-se o programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Inicialmente se determinou qual o número mais provável de clusters (k), supondo valores de k entre um a dez (número mínimo e máximo de clusters possíveis) e não usando nenhuma informação como prior. Os resultados obtidos (Tabela 6 e Figura 8) demonstraram que o valor de k=2 é o mais provável (apontado pelo maior valor de delta K: 21,289). Observando-se o diagrama bar-plot (Figura 9), fica evidenciada

a separação em dois grupos pelo $k=2$, sendo um deles formado pelos indivíduos africanos (representados pelo grupo primeiro da esquerda) e o outro pelos indivíduos brasileiros.

Tabela 6: Tabela com os resultados da análise bayesiana de agrupamento populacional com base no método de DK (Evanno et al, 2005). * em negrito o k com o maior valor de delta K.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	20	-114.202.900	0.1294			
2*	20	-113.086.750	98.402	111.615.000	209.490.000	21.289.107
3	20	-114.065.500	329.419	-97.875.000	216.470.000	6.571.263
4	20	-117.208.950	777.581	-314.345.000	173.525.000	2.231.601
5	20	-118.617.150	1.449.564	-140.820.000	282.910.000	1.951.691
6	20	-122.854.450	3.170.618	-423.730.000	17.825.000	0.056219
7	20	-127.270.000	2.513.305	-441.555.000	263.790.000	1.049.574
8	20	-129.047.650	2.534.839	-177.765.000	27.910.000	0.110106
9	20	-130.546.200	2.520.749	-149.855.000	116.105.000	0.460597
10	20	-133.205.800	3.633.964	-265.960.000		

FONTE: Structure Harvest

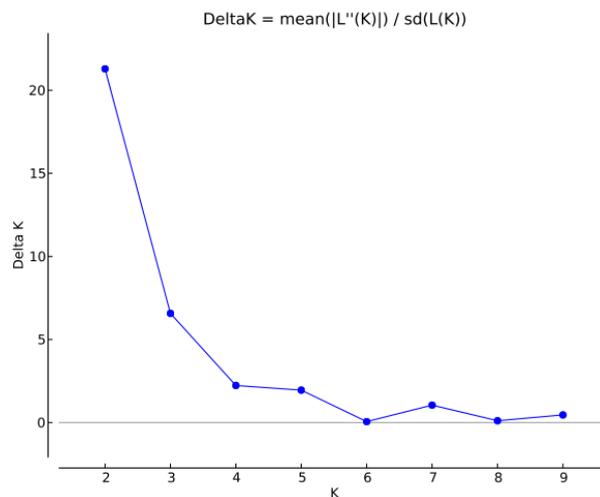


Figura 8: Gráfico dos valores de ΔK plotados em função de k.

FONTE: Structure Harvest

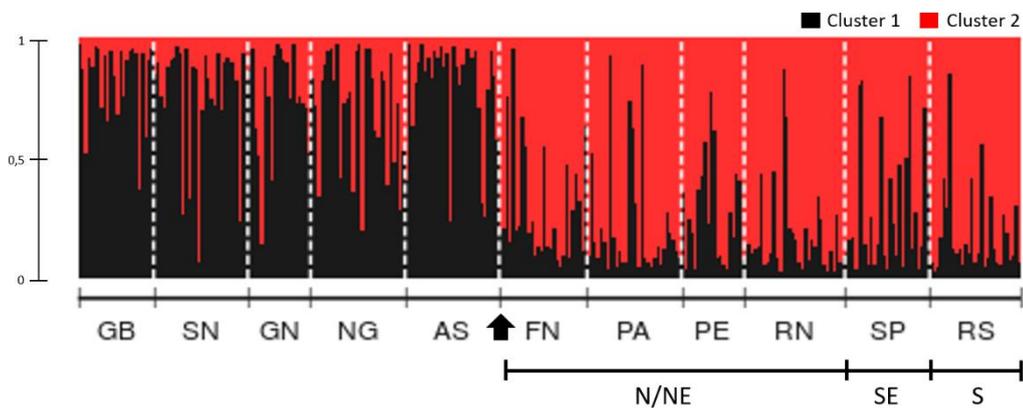


Figura 9: Análise bayesiana de agrupamentos genéticos. A seta separa as amostras da África e do Brasil evidenciando uma leve a diferenciação genética em dois grupos populacionais. GB, SN, GN, NG e AS são populações africanas; FN, PA, PE, RN, SP, RS são populações brasileiras.

FONTE: Structure Plot v.2.0

Uma análise posterior foi desenvolvida em condições semelhantes, variando-se os valores de k entre 1 e 5 e fornecendo a identidade da amostra (por país africano ou por população brasileira) como prior. Obtivemos o mesmo valor de $k=2$ com o maior valor de ΔK (Figura 10). No diagrama bar-plot (Figura 11), observamos que a estruturação nos dois grupos ficou mais evidente, mostrando uma divisão clara entre as populações africanas e brasileiras quanto à sua composição genética. As populações de FN, PA e PE (Figura 11) apresentaram alguns indivíduos com uma maior fração do componente do cluster 1 (preto), o mais expressivo nas regiões africanas.

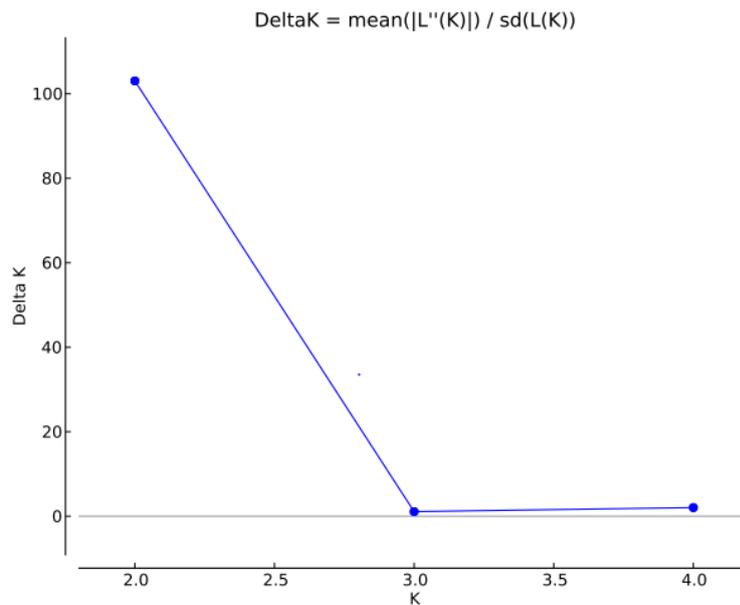


Figura 10: Gráfico dos valores ΔK em função dos valores de k quando fornecido as populações como prior.

FONTE: Structure Harvest

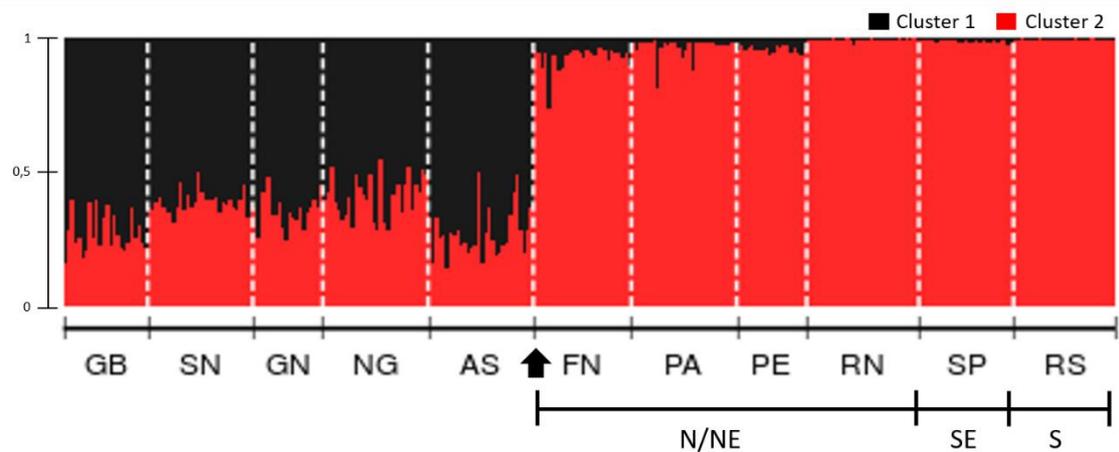


Figura 11: Análise bayesiana de agrupamentos genéticos, fornecendo as populações como prior. A separação nos dois grupos ($k=2$), foi obtida utilizando as informações de populações como *prior*. GB, SN, GN, NG, AS são populações africanas; FN, PA, PE, RN, SP, RS são populações brasileiras, a seta indica a separação entre as amostras da África e Brasil.

FONTE: Structure Plot v.2.0

5.2.2 Frequências alélicas e estimativas de diversidade genética

As frequências dos alelos nos catorze locos estudados nas populações estão apresentados na Tabela 7. Os alelos mais comuns em cada loco ocorrem nas populações africanas e brasileiras, enquanto que aqueles que estão em menor proporção, ocorrem em padrões diferentes de distribuição nos dois continentes. Um padrão esperado se as populações brasileiras são derivadas das africanas. As populações apresentaram seus locos com distribuição de frequências genotípicas de acordo com o esperado pelo EHW. As exceções são as populações da Nigéria, Fernando de Noronha, Pará, São Paulo e Rio Grande do Sul que apresentaram um/dois locos fora do EHW, entre eles estão: Bi32, Bi33, Bi34, Bi39, Bi50, Bi55, (Apêndice 2; TS2.1)

Tabela 7: Frequências dos alelos nos 14 locos nas populações africanas e brasileiras. Populações africanas são: Guiné-Bissau (GB); Senegal (SN); Gana (GN); Nigéria (NG); África do Sul (AS), e as populações brasileiras são: Fernando de Noronha (FN); Pará (PA); Pernambuco (PE); Rio Grande do Norte (RN); São Paulo (SP); Rio Grande do Sul (RS)

Locos	Alelo	GB	SN	GN	NG	AS	FN	PA	PE	RN	SP	RS
Bi32	158	0,021	-	0,075	-	-	-	-	-	-	-	-
	160	-	0,017	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-
	162	0,042	0,067	0,100	-	0,100	-	-	-	-	-	-
	164	0,042	0,217	0,200	0,117	0,200	0,074	0,100	0,050	0,109	0,111	0,155
	166	0,188	0,117	0,150	0,133	0,133	0,259	0,233	0,200	0,172	0,185	0,190
	168	0,354	0,367	0,250	0,117	0,183	0,074	0,117	0,125	0,094	0,111	0,069
	170	0,229	0,183	0,125	0,350	0,183	0,444	0,483	0,375	0,438	0,333	0,362
	172	0,083	0,017	0,050	0,150	0,050	0,130	0,067	0,150	0,156	0,185	0,190
	174	0,042	-	-	0,033	0,033	-	-	0,050	-	-	-
	176	-	-	0,025	0,017	0,017	0,019	-	-	-	-	-
	178	-	-	-	-	0,017	-	-	-	0,016	-	-
	180	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-
	182	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-	0,034
	184	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-

	186	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-
	188	-	-	0,025	-	0,017	-	-	-	-	-	-
	192	-	-	-	0,017	-	-	-	0,025	-	0,019	-
	194	-	-	-	-	0,017	-	-	0,025	-	0,019	-
	198	-	-	-	-	-	-	-	-	0,016	0,037	-
Bi33	178	0,250	0,400	0,200	0,367	0,333	0,411	0,317	0,300	0,328	0,365	0,446
	180	0,396	0,383	0,325	0,317	0,467	0,250	0,367	0,300	0,297	0,365	0,250
	182	0,063	-	-	0,050	0,017	-	-	-	-	0,019	0,036
	184	0,125	0,133	0,175	0,183	0,083	0,107	0,067	0,175	0,156	0,038	0,089
	186	0,063	0,017	0,100	0,050	0,017	0,125	0,067	0,075	0,063	0,135	0,089
	188	0,021	-	0,025	0,017	-	-	0,033	0,125	0,078	-	0,018
	190	0,021	0,033	0,150	-	0,033	0,089	0,117	-	-	0,077	0,071
	192	-	-	0,025	0,017	-	-	-	-	-	-	-
	196	0,042	-	-	-	0,050	-	0,017	-	-	-	-
	198	0,021	0,017	-	-	-	0,018	0,017	0,025	0,078	-	-
	200	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bi34	94	-	-	-	-	0,033	-	0,017	-	-	0,019	-
	102	0,130	0,083	0,026	0,067	0,083	-	0,033	-	-	-	-
	104	0,065	0,050	0,053	0,067	0,067	0,161	0,167	0,150	0,172	0,111	0,069
	106	0,565	0,367	0,263	0,217	0,283	-	-	-	-	-	-
	108	0,130	0,383	0,368	0,300	0,267	0,661	0,617	0,500	0,703	0,759	0,724
	110	0,043	0,067	0,184	0,217	0,117	0,143	0,083	0,200	0,078	0,093	0,172
	112	0,065	0,017	0,105	0,117	0,117	0,036	0,083	0,150	0,047	0,019	0,034
	114	-	0,033	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-
116	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-	
Bi36	80	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-
	82	0,396	0,448	0,325	0,417	0,533	0,260	0,375	0,450	0,375	0,288	0,224
	84	0,167	0,069	0,050	0,067	0,117	0,240	0,089	0,100	0,156	0,308	0,138
	86	-	-	-	-	-	-	-	0,025	0,016	0,077	0,052
	88	0,063	0,052	0,050	0,100	0,017	-	0,107	0,050	0,063	0,077	0,155
	90	0,063	0,069	0,250	0,117	0,133	0,180	0,071	0,050	0,031	0,019	0,172
	92	0,271	0,310	0,300	0,267	0,200	0,240	0,286	0,225	0,250	0,192	0,259
	94	0,042	0,034	-	-	-	0,080	0,071	0,050	0,109	0,038	-
	98	-	-	-	-	-	-	-	0,025	-	-	-
	100	-	0,017	0,025	0,017	-	-	-	0,025	-	-	-
Bi38	182	0,146	0,067	0,100	0,100	0,083	0,018	0,086	0,075	0,078	-	0,036
	186	0,250	0,267	0,400	0,367	0,283	0,232	0,241	0,250	0,281	0,222	0,196
	188	0,083	0,150	0,225	0,217	0,217	0,179	0,207	0,200	0,250	0,130	0,143
	190	0,521	0,500	0,225	0,317	0,417	0,536	0,431	0,425	0,391	0,648	0,625

	192	-	0,017	0,05	-	-	0,036	-	0,050	-	-	-
	194	-	-	-	-	-	-	0,034	-	-	-	-
Bi39	202	0,022	0,033	0,050	-	-	0,054	0,017	0,025	-	0,038	0,037
	208	0,304	0,367	0,325	0,217	0,200	0,250	0,500	0,700	0,569	0,442	0,426
	210	0,043	-	-	0,017	0,050	-	-	-	-	-	0,037
	212	0,109	0,300	0,200	0,317	0,200	0,393	0,283	0,175	0,310	0,269	0,204
	214	0,413	0,250	0,275	0,400	0,317	0,196	0,200	0,050	0,103	0,192	0,296
	216	0,109	0,050	0,100	0,050	0,200	0,107	-	0,050	0,017	0,019	-
	220	-	-	0,050	-	0,033	-	-	-	-	-	-
	222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,038	-
Bi40	92	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96	0,891	0,883	0,947	0,883	0,900	0,870	0,717	0,900	0,938	0,808	0,828
	98	0,109	0,083	0,053	0,117	0,100	0,130	0,283	0,100	0,063	0,192	0,172
Bi42	114	-	0,017	0,025	0,017	0,017	-	-	-	-	-	-
	120	-	0,017	0,025	0,033	0,033	-	0,111	0,025	0,016	-	-
	122	0,771	0,750	0,800	0,700	0,767	0,759	0,759	0,825	0,813	0,852	0,810
	124	0,125	0,167	0,100	0,200	0,167	0,093	0,074	0,125	0,125	0,093	0,086
	126	0,104	0,050	0,050	0,050	0,017	0,148	0,056	0,025	0,047	0,056	0,103
Bi43	122	0,313	0,233	0,225	0,283	0,283	0,259	0,117	0,225	0,203	0,222	0,397
	124	0,396	0,567	0,550	0,433	0,517	0,556	0,650	0,625	0,656	0,556	0,517
	126	0,229	0,200	0,175	0,250	0,200	0,167	0,200	0,150	0,125	0,167	0,052
	128	0,021	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-
	130	0,042	-	0,050	0,017	-	0,019	0,033	-	0,016	0,056	0,034
Bi45	134	0,104	0,083	0,184	0,138	0,167	0,241	0,150	0,125	0,156	0,019	0,103
	136	0,750	0,767	0,684	0,69	0,733	0,574	0,750	0,700	0,734	0,778	0,828
	138	0,146	0,150	0,132	0,172	0,100	0,185	0,100	0,175	0,109	0,204	0,069
Bi46	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,019	-
	148	0,130	0,107	0,100	0,067	0,018	0,093	0,183	0,200	0,121	0,111	0,121
	150	0,370	0,304	0,425	0,433	0,214	0,50	0,217	0,300	0,362	0,296	0,224
	152	0,065	0,089	0,075	0,117	0,304	0,074	0,150	0,150	0,103	0,074	0,086
	154	0,326	0,268	0,350	0,300	0,339	0,222	0,233	0,250	0,259	0,370	0,207
	156	0,065	0,125	0,050	0,050	0,036	0,093	0,150	0,100	0,086	0,093	0,172
	158	0,043	0,071	-	0,017	0,071	0,019	0,017	-	0,017	0,019	0,086
	160	-	-	-	-	-	-	-	-	0,034	-	-
	166	-	0,018	-	0,017	0,018	-	0,033	-	0,017	0,019	0,069
	168	-	0,018	-	-	-	-	-	-	-	-	0,034
	170	-	-	-	-	-	-	0,017	-	-	-	-
Bi49	158	-	0,033	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-
	160	0,063	0,033	0,050	0,017	0,017	0,036	-	-	-	-	0,017

	162	0,042	0,033	0,050	0,05	-	0,018	-	0,025	-	0,037	0,052
	164	0,063	0,133	0,200	0,167	0,15	0,196	0,259	0,175	0,259	0,148	0,172
	166	0,188	0,283	0,150	0,300	0,333	0,179	0,155	0,225	0,207	0,241	0,241
	168	0,646	0,467	0,475	0,417	0,483	0,518	0,552	0,575	0,517	0,574	0,517
	170	-	0,017	0,075	0,017	0,017	0,054	0,034	-	0,017	-	-
Bi50	118	0,250	0,300	0,200	0,333	0,267	0,185	0,259	0,250	0,172	0,115	0,232
	120	0,167	0,267	0,225	0,133	0,250	0,278	0,190	0,300	0,125	0,288	0,143
	122	0,208	0,150	0,275	0,217	0,250	0,093	0,207	0,275	0,422	0,135	0,286
	124	0,083	0,050	0,075	0,133	0,117	0,185	0,172	0,175	0,156	0,231	0,196
	126	0,188	0,083	0,150	0,117	0,033	0,148	0,052	-	-	0,058	0,071
	128	0,104	0,033	0,025	-	0,017	0,037	0,052	-	0,047	0,077	0,018
	130	-	0,033	-	-	-	0,019	-	-	-	-	-
	132	-	-	0,025	-	-	-	-	-	0,016	-	-
	136	-	-	-	-	-	-	0,017	-	-	-	-
	138	-	0,017	0,025	0,050	0,017	0,019	0,052	-	0,031	0,038	-
	142	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	0,019	-	-	-	-	-
	146	-	0,033	-	-	0,017	-	-	-	0,031	0,058	0,054
148	-	0,017	-	-	0,033	0,019	-	-	-	-	-	
154	-	-	-	0,017	-	-	-	-	-	-	-	
Bi55	180	-	0,017	-	0,050	-	-	-	-	-	-	-
	182	0,136	0,138	0,225	0,133	0,100	0,077	0,071	0,147	0,067	0,058	0,121
	184	0,045	0,103	0,125	0,183	0,050	0,038	0,036	-	0,050	0,019	-
	186	0,091	0,069	0,050	0,083	0,050	0,077	0,107	0,088	0,017	0,096	0,103
	188	0,045	0,017	-	0,050	0,017	0,019	-	0,029	0,017	0,038	0,034
	190	0,432	0,466	0,475	0,367	0,450	0,615	0,321	0,500	0,250	0,442	0,362
	192	0,091	0,086	0,075	0,100	0,133	0,058	0,250	-	0,217	0,135	0,293
	194	0,045	0,034	0,025	-	0,117	0,019	0,161	-	0,233	0,077	-
	196	0,114	0,017	-	-	0,067	0,019	-	0,029	0,017	-	-
	198	-	-	-	-	-	-	0,018	-	-	-	-
	200	-	0,017	0,025	0,033	0,017	-	0,018	0,029	0,05	0,019	0,034
206	-	0,034	-	-	-	0,077	0,018	0,088	0,083	0,115	0,052	

Índices de diversidade genética foram estimados para cada população e as médias para cada país africano ou região brasileira foram comparados entre si assim como os índices médios do continente africano com os do território brasileiro. Dentro do continente africano (Tabela 8), a Nigéria (NG) foi o país que apresentou

maior índice de heterozigidade esperada (uHe) com 0,672 e o menor foi nos países de Guiné-Bissau (GB) e Senegal (SN) com 0,639. A riqueza alélica variou de 5,789 a 5,298 em Senegal e Guiné-Bissau, respectivamente. O coeficiente de endogamia foi maior no país da África do Sul (AS) (0,065) e o menor valor foi determinado em Senegal (SN) (0,002), mas esses coeficientes não foram significativos.

Tabela 8: Estimativas de diversidade genética para as populações africanas de *B. ibis*. N= número amostrado; Na= número de alelos; Ne = número efetivos de alelos; Ho = heterozigidade observada; heterozigidade esperada; uHe = Heterozigidade esperada não enviesada; RA = riqueza alélica; AL = alelos privados; Fis = coeficiente de endogamia

Pop	N	Na	Ne	Ho	He	UHe	RA	AL	Fis
IG GB	10	4,500	2,990	0,589	0,580	0,611	2,412	0	0,038
AT GB	10	4,571	3,054	0,65	0,619	0,652	2,501	0	0,003
IP GB	4	3,643	2,674	0,685	0,567	0,653	2,548	0	-0,055
GB	24	5,500	3,168	0,631	0,625	0,639	5,298	0	0,013
ZOO SN	10	4,500	2,717	0,600	0,569	0,599	2,384	1	-0,002
PS SN	10	4,643	3,005	0,665	0,619	0,653	2,489	0	-0,020
TH SN	10	4,500	3,02	0,648	0,603	0,635	2,467	1	-0,020
SN	30	6,429	3,151	0,638	0,628	0,639	5,579	2	0,002
KL GN	10	4,357	3,211	0,639	0,615	0,648	2,514	0	0,015
BC GN	10	5,143	3,320	0,64	0,639	0,673	2,594	0	0,052
GN	20	5,643	3,476	0,64	0,645	0,661	5,488	0	0,033
FK NG	10	4,786	3,24	0,668	0,647	0,681	2,571	2	0,020
KF NG	10	4,786	3,377	0,629	0,638	0,671	2,577	0	0,067
FU NG	8	4,143	2,937	0,652	0,605	0,646	2,477	2	-0,010
TO NG	2	2,429	2,171	0,679	0,464	0,619	2,429	0	-0,152
NG	30	6,071	3,451	0,651	0,661	0,672	5,388	4	0,032
PA AS	10	4,429	2,983	0,58	0,594	0,626	2,426	0	0,077

BG AS	10	4,786	3,255	0,586	0,613	0,645	2,504	1	0,097
RO AS	10	5,071	3,184	0,657	0,633	0,666	2,553	0	0,014
AS	30	6,143	3,437	0,608	0,639	0,65	5,394	1	0,065

No território brasileiro (Tabela 9) foi encontrada uma maior heteroziguidade esperada (uHe) nas regiões norte e nordeste (N/NE; 0,629) e um valor menor na região Sudeste (SE; 0,606). A maior riqueza alélica também foi vista na região N/NE (5,152) e a menor na região sul (S) (4,837). O coeficiente de endogamia variou de 0,010 a 0,038, nas regiões sudeste e sul, respectivamente, mas nenhum valor foi significativo. O número de alelos privados encontrados foi superior na região norte e nordeste, sendo a maioria deles pertencente à população do estado do Pará (PA), com quatro alelos, enquanto que no estado do Rio Grande do Sul (RS) não foi encontrado nenhum alelo privado.

Tabela 9: Estimativas de diversidade genética para as populações brasileiras de *B. ibis*. N= número amostrado; Na= número de alelos; Ne = número efetivos de alelos; Ho = heteroziguidade observada; He = heteroziguidade esperada; uHe = Heteroziguidade esperada não enviesada; RA = riqueza alélica; AL = alelos privados; Fis = coeficiente de endogamia

Pop	N	Na	Ne	Ho	He	uHe	RA	AL	Fis
FN	28	5,286	3,000	0,600	0,617	0,629	4,873	1	0,046
PA	30	5,429	3,200	0,642	0,632	0,643	5,008	4	0,002
PE	20	5,000	2,964	0,637	0,6	0,616	4,882	1	-0,036
RN	32	5,357	3,031	0,609	0,594	0,604	4,835	1	-0,008
N/NE	110	6,929	3,164	0,621	0,626	0,629	5,152	7	0,013
SP	27	5,429	3,033	0,600	0,595	0,606	5,003	2	0,010
SE	27	5,429	3,033	0,600	0,595	0,606	5,003	2	0,010
BR RS	21	4,929	3,073	0,566	0,593	0,608	2,314	0	0,002
ES RS	8	4,214	3,019	0,670	0,588	0,63	2,194	0	0,042

S	29	5,071	3,209	0,593	0,606	0,617	4,837	0	0,038
----------	----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	---	-------

Na comparação da diversidade genética encontrada no continente africano e no território brasileiro (Tabela 10), observa-se, como esperado para área nativa, que no continente africano foram encontrados maiores valores para a riqueza alélica e heterozigosidade esperada uHE . Observa-se ainda que o número de alelos privados encontrados no continente africano foi maior do que o encontrado no território brasileiro, sendo 21 e 11, respectivamente. Esses alelos privados encontradas nas populações brasileiras, pode ser explicado que vieram de outras populações da área nativa não amostrado nesse trabalho.

Tabela 10: Estimativas de diversidade genética para as populações de *B. ibis* no continente africano e no Brasil. N= número amostrado; Na= número de alelos; Ne = número efetivos de alelos; Ho = heterozigosidade observada; heterozigosidade esperada; uHe = Heterozigosidade esperada não enviesada; RA = riqueza alélica; AL = alelos privados; Fis = coeficiente de endogamia

Pop	N	Na	Ne	Ho	He	uHe	RA	AL	Fis
AF	134	8,071	3,487	0,633	0,653	0,656	8,046	21	0,034
BR	166	7,357	3,204	0,613	0,623	0,625	7,132	11	0,020

Apesar dos maiores valores de diversidade genética e riqueza alélica ocorrerem no continente africano, o teste U de Mann-Whitney demonstrou não haver diferenças significativas entre as estimativas de diversidade genética das amostras dos dois continentes.

5.2.3 Análises de alocação dos indivíduos

Nos testes de alocação dos 300 indivíduos, 91 deles foram alocados na população onde foram amostrados, correspondendo a 30,3% do total (Tabela 11). A população de Fernando de Noronha foi onde foi alocado o maior número de

indivíduos pertencentes à sua população de origem (61%), seguida de Pará (40%). A maioria dos indivíduos africanos foi alocada na África (80-96%) e a maioria dos indivíduos brasileiros foram alocados no Brasil (60-86%), um resultado compatível com os diagramas de diferenciação genética. Entre as amostras brasileiras, Pará e Pernambuco foram populações com um maior número de indivíduos alocados ao continente africano. Esse resultado aponta essas populações como prováveis portas de entrada no país.

Tabela 11: Tabela de alocação. Número de indivíduos alocado à população de origem, ou ainda alocados ao continente africano ou às regiões brasileiras.

Pop	N	Pop. de origem (%)	África (%)	Brasil (%)
GB	24	9 (37)	23 (96)	1 (4)
SE	30	4 (13)	27 (90)	3 (10)
GN	20	8 (40)	16 (80)	4 (20)
AS	30	9 (30)	28 (93)	2 (7)
NG	30	10 (33)	27 (90)	3 (10)
FN	28	17 (61)	4 (14)	24 (86)
PA	30	12 (40)	8 (27)	22 (73)
PE	20	2 (10)	8 (40)	12 (60)
RN	32	7 (22)	5 (16)	27 (84)
RS	29	8 (28)	5 (17)	24 (83)
SP	27	5 (19)	4 (15)	23 (85)
Total	300	91	155	145
Percentual		30,3%	51,66%	48,33%

Olhando apenas as populações brasileiras (Tabela 12), com relação ao continente africano, verifica-se que trinta e quatro indivíduos brasileiros foram alocados na África, sendo onze deles em Gana, oito na Nigéria, sete no Senegal e África do Sul e um em Guiné-Bissau. Não fica claro por esse resultado a porta de saída africana.

Tabela 12: Tabela de alocação dos indivíduos brasileiros atribuídos às populações do continente africano. FN, PA, PE, RN, RS e SP são populações brasileiras; GB, SN, GN, AS e NG são populações africanas

Pop.	GB	SN	GN	AS	NG	Total
FN	1	0	2	1	0	4
PA	0	3	1	2	2	8
PE	0	1	3	2	2	8
RN	0	0	2	1	2	5
RS	0	2	0	1	2	5
SP	0	1	3	0	0	4
Total	1	7	11	7	8	34

5.2.4. Detecção dos migrantes

Como a maioria da nossa amostra é de ninhegos, foram identificados nessa análise indivíduos prováveis de pertencerem à primeira geração dos migrantes. Apenas os indivíduos das populações de Fernando de Noronha (FN) e de Pernambuco (PE) foram diagnosticados como possíveis migrantes porque nesse caso foram amostrados adultos. Foram detectados ao todo quarenta e dois prováveis migrantes ou seus descendentes (Tabelas 13 A e B para os migrantes africanos e brasileiros). Na tabela 13A, a África do Sul (7) e Nigéria (6) parecem ser os países que mais receberam migrantes, e Senegal (5) e Gana (4) foram os países com maior saída de indivíduos com destino à outra região africana. Seis indivíduos africanos dentre os vinte e um migrantes parecem ser migrantes do território brasileiro, um resultado que aponta um fluxo no sentido inverso (Brasil – África). Indivíduos brasileiros identificados como migrantes estão apresentados na tabela 13B. Dentre os 21 migrantes apenas quatro desses indivíduos foram identificados como tendo origem no continente africano: dois de Gana, um da África do Sul e

outro de Senegal. Os prováveis migrantes parecem ter chegado em regiões diferentes do território brasileiro. Os resultados dessa análise não deixam claro qual seria a região mais provável (ou regiões) de saída de migrantes da África e nem de entrada dos imigrantes aqui no Brasil. Os prováveis migrantes ou seus descendentes foram detectados supondo fluxo nos dois sentidos África–Brasil e Brasil–África, mas não temos outras evidências paralelas que reforçam a existência de um fluxo nos dois sentidos.

Tabela 13: Indivíduos identificados como migrantes da primeira geração. A tabela mostra a região onde foram amostrados e a provável região de origem dos imigrantes. A. Indivíduos amostrados no continente africano; B. Indivíduos amostrados no território brasileiro.

A			B		
Indivíduo	Região amostrada	Provável Origem	Indivíduo	Região amostrada	Provável origem
1	GB	SN	1	FN	GN*
2	GB	GN	2	FN	RN
3	SN	GN	3	FN	RS
4	SN	GB	4	FN	PA
5	SN	GN	5	PA	RN
6	GN	SN	6	PA	AS*
7	GN	SN	7	PA	FN
8	GN	PA*	8	PE	FN
9	AS	RS*	9	PE	SP
10	AS	NG	10	PE	RN
11	AS	PE*	11	RN	SP
12	AS	GB	12	RN	PE
13	AS	SN	13	RN	RS
14	AS	RS*	14	RN	RS
15	AS	SN	15	RS	PA
16	NG	GB	16	RS	SN*
17	NG	SP*	17	RS	SP
18	NG	GN	18	RS	SP
19	NG	GB	19	SP	PA
20	NG	PE*	20	SP	GN*
21	NG	GN	21	SP	RN

6. Discussão

6.1. Diversidade genética nas populações brasileiras e africanas

Não foi detectada diferença significativa entre os valores dos índices de diversidade genética entre as populações africanas e brasileiras. No entanto, ao comparar os índices determinados para cada população, verificamos uma tendência para maiores índices de diversidade genética nas populações africanas. Esse padrão está concordante com o fato de que as populações africanas são mais antigas e prováveis fontes das populações brasileiras. O esperado de um grau de diversidade mais alto na população nativa do que na população da área colonizada foi observado.

Os presentes resultados apontam noutra direção e podem ser explicados por várias introduções (propágulos) ou pelo fluxo gênico constante entres essas populações. Song (2013) estudaram populações da ave *Pycnonotus sinensis*, no leste da China, com dados de mitocondriais e de microssatélites e verificaram que a diferença na diversidade genética entre a região colonizada e a de origem não foi significativa, concluindo que as trocas de fluxo gênico devem ter mantido constante esses níveis.

O primeiro registro histórico da garça-vaqueira no Brasil foi na ilha de Marajó, no Pará no norte do país (SICK, 1965). Após o estabelecimento inicial, os registros mostram uma dispersão no sentido oeste (Figura 4), na linha do Equador e, mais tardiamente, região sul brasileira foi ocupada (1973). Uma perda de diversidade genética durante eventos de colonização sequencial é esperada quando os indivíduos de uma população recentemente estabelecida dispersa e estabelece novas populações (efeito cumulativo do fundador) (CLEGG et al, 2002, PRUET;

WINKER, 2005). Os dados de microssatélites não mostram essa perda de diversidade genética gradual entre as populações no sentido norte-sul, podendo-se assumir que a população do Rio Grande do Sul (região sul brasileira) troca indivíduos com outras populações do país, explicando o seu índice de diversidade alto.

Nas comparações dos dados de diversidade no continente africano e território brasileiro (Tabela 10), observamos um maior número de alelos privados exclusivos para o continente africano. Esse padrão era esperado, pois as populações africanas são mais antigas e maiores, e nessas condições, os novos alelos vão surgindo por mutações e se acumulando. Os alelos privados encontrados nas amostras brasileiras provavelmente tiveram origem numa população nativa não amostrada ou não foram detectados nas amostras das populações africanas estudadas. É improvável que eles tenham surgido nas populações brasileiras por mutações, pois se passaram cerca de 40 gerações desde a vinda desses indivíduos que deram origem à população brasileira, um tempo curto para o acúmulo de mutações.

É esperado encontrar uma maior taxa de endogamia nas populações colonizadas quando é formada por um pequeno número de indivíduos que colonizaram o local (DLUGOSCH; PARKER, 2008; HOFFMANN; BLOWS, 1994). Observando nossos resultados para o coeficiente de endogamia não são valores significativos, confirmando a hipótese de que essas populações tenham sido formadas por diversos propágulos.

6.2. Diferenciação genética entre as populações brasileiras e africanas

Nos estudos de colonização, a similaridade genética entre as populações nativas com as populações colonizadas é examinada para ajudar a esclarecer as

rotas de invasão, de onde saíram as populações colonizadoras e onde seriam as portas de entrada na área colonizada. Com base na similaridade genética, Barrientos et al. (2009) estudando populações de *Bucanetes githagineus* por meio de marcadores microssatélites, verificou que na região noroeste da África estaria a população-fonte para as populações das Ilhas Canário e das populações da Península Ibérica. Em um estudo baseado num conjunto de dados de microssatélites e mitocondriais Jackson et al. (2015) caracterizou o processo de invasão e fizeram suposições das rotas de migração do periquito de colar (*Psittacula krameri*), por meio de análises de similaridade de haplótipos entre áreas invasora e nativa, estruturação genética e modelagem por DYCABC. Esses autores por meio da estruturação genética, puderam demonstrar uma maior probabilidade que as populações invasoras terem sido atribuídas ao cluster asiático, do que ao cluster africano, sugerindo a faixa nativa asiática como fonte ancestral predominante para as populações invasoras estabelecidas na Europa e nas ilhas do Oceano Índico.

Não foram amostradas populações de outras áreas da África além da costa oeste, nem do sul da Europa e Oriente Médio, regiões nativas para a subespécie *Bubulcus ibis ibis*. No entanto, o padrão de distribuição alélica observado mostra que é possível que a população brasileira seja derivada das populações africanas da costa oeste, pois apresentam um repertório menor do que as supostas fontes.

Os valores de F_{st} par a par se mostraram significativos após a correção de Bonferroni para a maioria dos pares testados entre as populações. Dentro dos continentes o F_{st} par a par não foi significativo apenas entre as populações Nigéria e Guiné-Bissau e entre as populações brasileiras, a população de Fernando de

Noronha se diferenciou das demais populações, com exceção da população de São Paulo, e a população do Rio Grande do Sul se diferenciou de Fernando de Noronha e Pernambuco. A população de São Paulo não se diferenciou das demais populações brasileiras o que explicaria a taxa alta de riqueza alélica encontrada, resultante dessa troca gênica com outras populações brasileiras.

Entre o continente africano e o território brasileiro, não foi observada diferenciação genética significativa apenas entre as populações de Senegal com a de Pernambuco, podendo se levantar a hipótese de que o fluxo gênico entre as duas populações é maior do que entre os outros pares. Esses dados de diferenciação estão concordantes parcialmente com a suposição de Congrains (2013) que supôs entrada pelo nordeste e pelo sul do país. No teste de Felicísimo, Muñoz e Gonzáles-Solis (2008) mostraram que uma ave marinha (*Calonectris diomedea*) com padrão de migração entre África e América utiliza corredores de ventos com menor custo de energia para realizar tal travessia, saindo da região ocidental da África e chegando nas costas nordeste, sudeste e sul do Brasil. Da mesma maneira, Massa; Doyle; Fortunato (2014) defenderam que há grande probabilidade da garça-vaqueira ter feito a trajetória que parte do centro-oeste africano e chega no norte da América do Sul, evitando áreas anticiclônicas (Figura 12) de alta pressão, onde dispersam ventos.

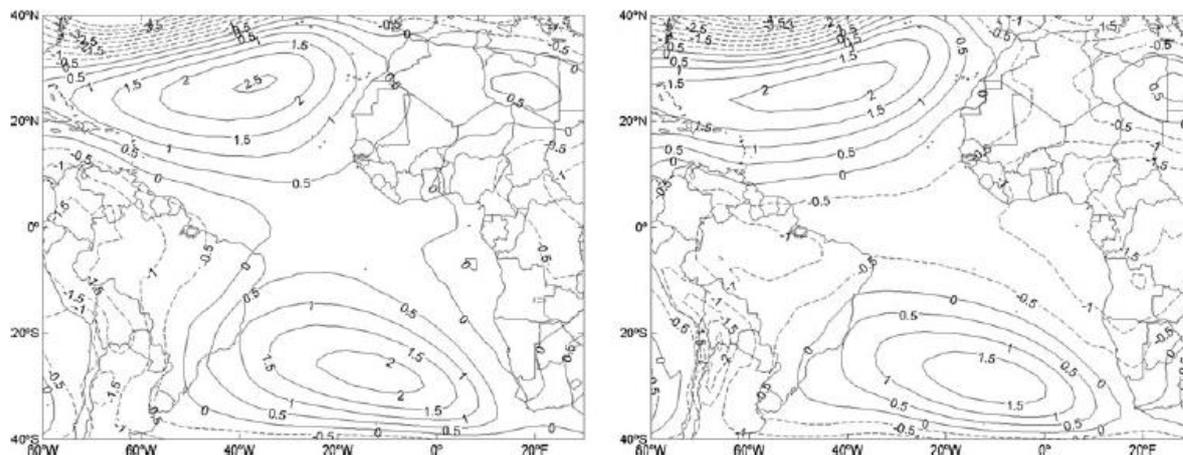


Figura 12: Análise de componentes principais 850hPA geopotencial. Mostrando a movimentação das áreas anticiclônicas, favorecendo trajetórias entre a África Centro-oeste e o Suriname, durante o mês de março.

FONTE: Massa; Doyle; Fortunato (2014)

Os nossos resultados de estruturação genética apresentam dois clusters distintos: um africano e outro brasileiro (Figura 11). Nessa figura 11 fica evidente que as populações de Fernando de Noronha, Pará e Pernambuco têm uma maior semelhança com as regiões africanas e alguns indivíduos apresentam um alto componente do cluster africano, em comparação com as de Rio Grande do Norte, São Paulo e Rio Grande do Sul. Esses resultados apontam a região norte e nordeste como portas de entrada da garça-vaqueira no Brasil. Como as populações africanas não se diferenciaram entre si, não foi possível identificar a origem dos indivíduos africanos colonizadores. Os dados obtidos confirmam a rota proposta por Massa; Doyle; Fortunato (2014), com maior probabilidade de chegada dos ventos para a região norte brasileiro, não confirmando Rio Grande do Sul como porta de entrada, como suposto pelos dados mitocondriais (CONGRAINS, 2013; MORALES-SILVA; DEL LAMA, 2014).

No estudo de Congrains (2013), baseado em dados de sequências mitocondriais e nucleares, foi proposto que a colonização brasileira pela garça vaqueira ocorreu com um fluxo gênico alto entre dois continentes amostrados.

Moralez-Silva e Del Lama (2014) também apontaram um fluxo gênico entre as duas regiões. Nossos resultados de diferenciação revelam que esse fluxo não ocorre e que o padrão observado por DNA mitocondrial não se confirmou com dados com um marcador mais variável.

6.3. Teste de alocação e migrantes

O teste de alocação mostrou que apenas 30% dos indivíduos foram alocados na sua população de origem e 70% foram atribuídos à uma outra população. Esse resultado é explicado pela alta capacidade de dispersão dessa ave (ALLENDORF; LUIKART, 2009; CONGRAINS et al, 2016), ou porque foi baixo o poder de discriminação dos locos usados. O fato de a maioria dos indivíduos brasileiros atribuídos ao continente africano estarem em Pará e Pernambuco aponta essa região como provável porta de entrada no país e está concordante com dados de diversidade maior na região N/NE e os padrões de diferenciação encontrados.

Segundo Rannala e Mountain (1997), o teste de primeira geração de migrantes, é possível descobrir migrantes, ou descendentes de migrantes, até por duas gerações no passado, mesmo que a diferenciação das frequências alélicas entre as populações sejam baixas. O teste de migração mostrou a possibilidade de uma migração bidirecional entre as populações africanas com as brasileiras (Tabela 13 A e B), porém não temos dados paralelos que confirmem essa proposição, podendo esse resultado ser um viés da análise. Como analisa Rannala e Mountain (1997) pelo menos três resultados podem ser potencialmente enganosos: (1) a falha em rejeitar a hipótese de que um indivíduo é um migrante, ou descendente, pode ser devido ao fato de que as populações de origem não foram incluídas na análise. (2) um indivíduo pode aparecer incorretamente ter originado em uma população particular que não seja aquela a partir do qual foi amostrado, devido às frequências

alélicas semelhantes ou devido ao fluxo gênico de longo prazo, entre as duas populações; (3) o fato de que muitas comparações entre pares entre as populações são realizadas para cada um de um grande número de indivíduos significa que alguns indivíduos parecerão serem imigrantes puramente por acaso; esse erro pode ser corrigido usando valores menores para α e como foi utilizado um valor mais baixo de α que o programa oferece para essa análise, podemos descartar essa hipótese. Como não há concordância entre os testes de alocação que mostraram a maioria dos indivíduos brasileiros sendo alocados no Brasil e a maioria dos africanos alocados na África com os resultados de migrantes de locais os mais diversos, optamos por não fazer inferências sobre as rotas com esses dados.

7. Conclusão

Na proposta desse trabalho, levantamos algumas perguntas que foram ou não respondidas. Os dados de microssatélites confirmam que a população brasileira de garças vaqueiras pode ser uma população derivada das populações do oeste africano. As semelhanças genéticas na comparação de frequências alélicas e índices de diversidade, com um repertório menor de alelos detectado nas populações brasileiras apontam que é possível supor que as populações africanas analisadas sejam fontes das brasileiras.

Pelos dados levantados, não foi possível determinar uma porta preferencial de saída da África, pois as populações africanas são muito semelhantes entre si quanto à sua composição genética determinada pelos microssatélites. Observamos que o F_{st} par a par entre Senegal e Pernambuco não foi significativo, mas esses dados não se confirmaram nas outras abordagens bayesianas. A entrada no país parece ter ocorrido preferencialmente pelas regiões norte e nordeste brasileiras (Pará, Pernambuco e Fernando de Noronha). Essas populações apresentaram indivíduos com alto teor de similaridade genética com o cluster africano e os testes de alocação apontaram que essa região apresenta um maior número de indivíduos alocados na África. A reconstrução completa da rota de invasão será necessária para se definir estratégias para o controle e/ou prevenção no manejo da população invasora. O uso de um grande conjunto de marcadores do tipo SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) poderá contribuir nesse sentido no futuro.

Níveis de diversidade genética semelhantes foram encontrados entre as populações brasileiras e africanas, sugerindo que o processo de colonização do continente americano tenha envolvido múltiplas introduções. Os dados não dão

suporte a ocorrência de um fluxo gênico contínuo, pois foi observada uma estruturação baixa mas clara entre as populações africanas e brasileiras.

Ferramentas genéticas fornecem informações valiosas que podem ser usadas para se desvendar os processos de colonização. Nosso trabalho confirmou a região norte-nordeste como provável porta de entrada para as garças vaqueiras no Brasil, como proposto pelos dados mitocondriais (CONGRAINS, 2013) e por dados meteorológicos (MASSA; DOYLE; FORTUNATO, 2014). Os resultados apontam que as entradas ocorreram com diversos propágulos. Esse trabalho complementa os resultados de trabalhos anteriores e avança na compreensão do processo de expansão e colonização pela garça vaqueira no Brasil.

8. Referências

- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons, 2009
- ANTAS, P.T.Z. Pantanal – Guia de Aves. Rio de Janeiro: SESC, Departamento Nacional. p. 246. 2004.
- BANHOS, A. et al. Reduction of Genetic Diversity of the Harpy Eagle in Brazilian Tropical forests. Centre for Cellular and Molecular Biology, INDIA. 2016
- BARBOSA-FILHO, R.C. et al. A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis* Linnaeus, 1758) e o atobá-de-pé-vermelho (*Sula sula* Linnaeus, 1766) no Arquipélago de Fernando de Noronha: uma abordagem ecológica reprodutiva comparada. Ornithologia, v.3, n.2, p.101-114, 2009
- BARRIENTOS, R. et al. Colonization patterns and genetic structure of peripheral populations of the trumpeter finch (*Bucanetes githagineus*) from Northwest Africa, the Canary Islands and the Iberian Peninsula. Journal of Biogeography, v. 36, n. 2, p. 210-219, 2009.
- BELLA, S. D. Biologia Reprodutiva e Alimentar de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) (Ciconiiforme, Ardeidae) e sua ocorrência em Pernambuco, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. 2003.
- BELTON, W. Cattle Egret in Rio Grande do Sul, Brazil. Bird Banding, v. 45, p. 59. 1974.
- BLACKBURN, T.M.; LOCKWOOD, J.L.; CASEY, P. Avian Invasions: The Ecology and Evolution of Exotic Birds. 1st ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2009
- BLAKER, D. Range expansion of the Cattle Egret. Ostrich, v. 42, n. S1, p. 27-30, 1971.
- BOTSTEIN, D. et. al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, v. 32, n.3, p. 314. 1980.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency, Molecular Ecology, v. 5, p. 453-455, 1996
- BROWDER, J. A. Long-distance movements of Cattle Egrets. Bird-Banding, v. 44, n. 3, p. 158-170, 1973.
- CAMPANINI, E. B. Populações brasileiras da espécie exótica invasora *Bubulcus ibis*: distribuição da diversidade genética avaliada pelos microssatélites. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2011

CLEGG, S. M. et al. Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 12, p. 8127-8132, 2002.

CONGRAINS, C. Filogeografia de *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) na África e o processo de colonização do continente Americano por essa espécie. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2013

CONGRAINS, C. et al. Genetic and paleomodelling evidence of the population expansion of the cattle egret *Bubulcus ibis* in Africa during the climatic oscillations of the Late Pleistocene. *Journal of Avian Biology*, v. 47, n. 6, p. 846-857, 2016.

CORRÊA, T.C. et al. Genetic structuring among populations of the great egret, *Ardea alba egretta*, in major Brazilian wetlands. *Wiley Online Library*. v. 26, p. 333-349. 2016.

DAVIS, M.A. *Invasion biology*. Oxford: Oxford University Press. 2009

DAWSON, D. A. et al. High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *Bmc Genomics*, v. 14, n. 1, p. 176, 2013.

DENT, A. E.; BRIDGETT, M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012

DLUGOSCH, K.M., PARKER, I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.* v. 17, p. 431–449, 2008

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analyses. *Molecular Ecology*. v. 11, p. 1591-1604. 2002

ESTOUP, Arnaud; GUILLEMAUD, Thomas. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what?. *Molecular ecology*, v. 19, n. 19, p. 4113-4130, 2010.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHEINEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 1, p. 47–50. 2005

FERREIRA, M.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. Ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. p. 220. 1998.

- FELICÍSIMO, A.M.; MUÑOZ, J.; GONZÁLES-SOLIS, J. Ocean surface winds drive dynamics of transoceanic aerial movements. *PLoS One*, v. 8, n.3, p. 2928, 2008
- FOLL, M. BayeScan v2. 1 user manual. *Ecology*, v. 20, p. 1450-1462, 2012.
- GARKE, C. Comparison of SNPs and microsatellites for assessing the genetic structure of chicken populations. *Anim Genet.* v. 43, p. 419–428, 2012
- GARRIDO-GARDUNO, T. et al. Role of habitat heterogeneity and landscape connectivity in shaping gene flow and spatial population structure of a dominant rodent species in a tropical dry forest. *Journal of Zoology*. v. 298, p. 293-302. 2016
- GOUDET, J. FSTAT version 2.9. 3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Website: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. 2002
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, p. 361-372, 1992.
- HAFNER, H. Heron Conservation. San Diego: Academic Press. 2000
- HALDANE, J.B.S. An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics*, v. 52, n.3, p. 631-635, 1954.
- HANCOCK, J.; ELLIOTT, H. The herons of the world. London Editions, London. Hancock The herons of the world 1978, 1978.
- HAVERSCHMIDT, F. Occurrence of the Cattle Egret, *Bubulcus i. ibis*, in Surinam, Dutch Guiana. *Auk*, v. 67, p. 380-381, 1950
- HOCKEY, P.A.R.; DEAN, W.R.J.; RYAN, P.G. Roberts' Birds of Southern Africa, seventh edition. Trustees of the John Voelcker Bird Book Fund, Cape Town. p.1296. 2005.
- HÖFLING, E.; CAMARGO, H.F.A. Aves no Campus. 3° ed. São Paulo. Ed. da Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. p. 168. 2002.
- HOFFMANN, A.A., BLOWS, M.W., 1994. Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends Ecol. Evol.* v. 9, p. 223–227, 1994
- HOLM, Sture. A simple sequentially rejective multiple test Procedure. *Scandinavian journal of statistics*, p. 65-70, 1979.
- ISSG (2018). "Global Invasive Species Information Network (GISIN)." Disponível em: <http://www.issg.org/publications.htm>. Acessado em 24/Maio/2018
- JACKSON, H. et al. Ancestral origins and invasion pathways in a globally invasive bird correlate with climate and influences from bird trade. *Molecular ecology*, v. 24, n. 16, p. 4269-4285, 2015.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in ecology and evolution. v. 11, p. 424-429. 1996.

JORDANA, J. et al. Genetic relationships among America donkey populations: insights into the process of colonization. Journal of Animal Breeding and Genetics. v. 133(2), p. 155-164. 2016.

KASHI, Y; SOLLER, M. Function roles of microsatellites and minisatellites. In: Microsatellite: evolution and applications. GOLDSTEIN, D.B. Oxford University Press, Oxford U.K. p. 368. 1999.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular ecology. v. 16, n.15, p. 1099-1106. 2007

KUSHLAN, J.A. The herons handbook. New York: Harper and Row, 1984

KUSHLAN, J. A.; HANCOCK, J.A. The herons: systematic and evolution. Oxford, Oxford University Express, 2005

LAROCA, B. A. Prospecção de microssatélites e caracterização genética de populações africanas de garça-vaqueira, *Bubulcus ibis*. Monografia de bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2015

LI, Y.C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology. v. 11, p.2453-2465. 2002.

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

MARSHALL, T.C. et al. Statistic confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, v. 7(5), p. 639-655. 1998.

MASSA, C.; DOYLE, M.; FORTUNATO, R.C. On how Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) spread to the Americas: meteorological tools to assess probable colonization trajectories. Int J Biometeorol. 2014.

MEESE, R. J. Cattle Egret predation causing reproductive failures of nesting tricolored blackbirds. California Fish and Game, v. 8, p. 47-50, 2012.

MIÑO, C.I. et al. Use of noninvasive 'bug-eggs' to enable comparative inferences on genetic mating system with and without parental information: A study in a cattle egret colony. PloS one, v. 12, n. 8, p. e0183153, 2017.

MORALEZ-SILVA, E. Garça vaqueira (*Bubulcus ibis*): a diversidade genética no estudo do comportamento reprodutivo e na caracterização da população invasora brasileira. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2013

- MORALEZ-SILVA, E.; DEL LAMA, S. N. Colonization of Brazil by the cattle egret (*Bubulcus ibis*) revealed by mitochondrial DNA. *NeoBiota*, v. 21, p. 49, 2014
- NIDIFFER, M.; CORTEZ-ORTIZ, L. Intragroup Genetic Relatedness in Two-Howler Monkey Species (*Alouatta pigra* and *A. palliata*): Implications for understanding social systems and dispersal. *American Journal of Primatology*. v.77, p. 1333-1345. 2015.
- NUSS, A. et al. Population Genetic Structure of the Magnificent Frigatebird *Fregata magnificens* (Aves, Suliformes) Breeding Colonies in the Western Atlantic Ocean. *Plos One*. 2016.
- PALMER, R.S. Handbook of North American birds: loons through flamingos. New Haven: Yale University Press. v.1. 1962.
- PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.
- PIRY, S. et al. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of heredity*, v. 95, n. 6, p. 536-539, 2004.
- POMPANON, F. et al. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 11, p. 847, 2005.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155(2), p. 945-959. 2000
- PRUETT, C. L.; WINKER, K. Northwestern song sparrow populations show genetic effects of sequential colonization. *Mol. Ecol.* v. 14, p. 1421–1434, 2005.
- TAMBARUSSI, E. V. et al. Paternity analyses reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. *Ecology and Evolution*. v. 5(23), p. 5588-5600. 2015.
- TELFAIR, Raymond Clark. The Cattle Egret: a Texas focus and world view. Caesar Kleburg Research Program in Wildlife Ecology, 1983.
- TELFAIR, R.C. "Cattle egret (*Bubulcus ibis*)." *The Birds of North America*, n.113, POOLE, A.; GILL, F. eds. The Academy of Natural Sciences. The American Ornithologists' Union, Philadelphia, Washington, D.C. p. 877. 1994.
- TELFAIR, R.C. Cattle Egret (*Bubulcus ibis*), *The Birds of North America Online*. Disponível em: <http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/113>. 2006
- RAMASAMY, R. K. et al. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, v. 3, n. 1, p. 431, 2014.
- RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L., Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 94, p. 9197-9221. 1997

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, v. 105, n. 3, p. 767-779, 1983.

RICE, D. W. Dynamics of range expansion of Cattle Egrets in Florida. *The Auk*, v. 73, n. 2, p. 259-266, 1956.

ROUSSET, F. Genepop version 4.6. 9. 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Quantitation of nucleic acids. *Molecular cloning: a laboratory manual*, p. A8, 2001.

SAX, D. F., STACHOWICZ, J. J., GAINES, S. D. *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*. Sinauer Associates Incorporated, 2005

SCHENEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. "Arlequin: a software for population genetics data analysis." *User manual ver 2 (2000)*, p. 2496-2497. 2000

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers—just a matter offashion?. *Nature reviews genetics*, v. 5, n. 1, p. 63, 2004.

SCHUELKE, Markus. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 233, 2000.

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

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro. p. 912. 1997.

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

SONG, G. Gene flow maintains genetic diversity and colonization potential in recently rangeexpanded populations of an oriental bird, the light-vented bulbul (*Pycnonotus sinensis*, aves: Pycnonotidae). *Divers. Distrib.* v. 19, p. 1248–1262. 2013

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

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Resources*, v.4, n.3, p. 535-538. 2004.

YANG, S. et al. The first genetic map of a synthesized allohexaploid Brassica with A, B and C genomes based on simple sequence repeat markers. *Cross Mark*. v. 129, p. 689-701. 2016.

WEIR, B.S. et al. *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 1990

Wetlands International (2018). "*Waterbird Population Estimates.*" Disponível em: wpe.wetlands.org. Acessado em: 24/Maio/2018

WETMORE, A. An early record of the Cattle Egret in Colômbia. *Auk, Lawrence.* v. 80, n.3, p. 547. 1963.

Apêndice 1

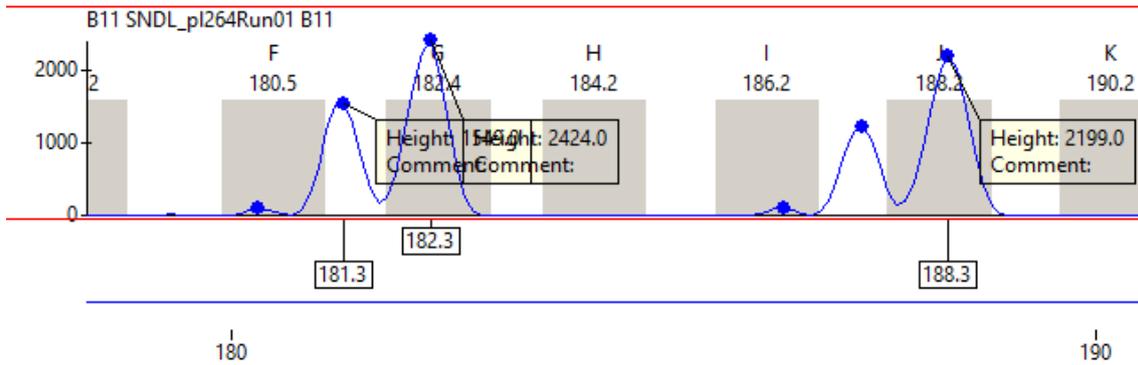


Figura S1.1: Padrão dos alelos do loco Bi32, com tamanho dos alelos de 164 e 170 mais a cauda de M13 de 18 pb.

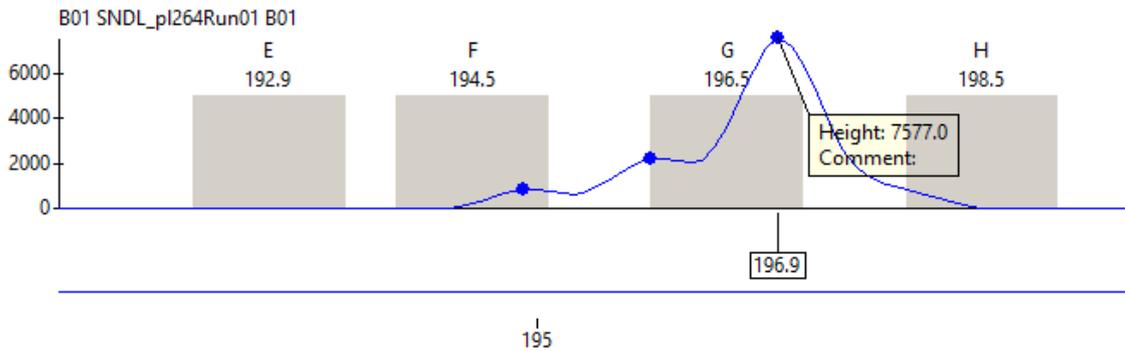


Figura S1.2: Padrão dos alelos do loco Bi33, com tamanho de alelo 178 mais a cauda de M13 de 18 pb.

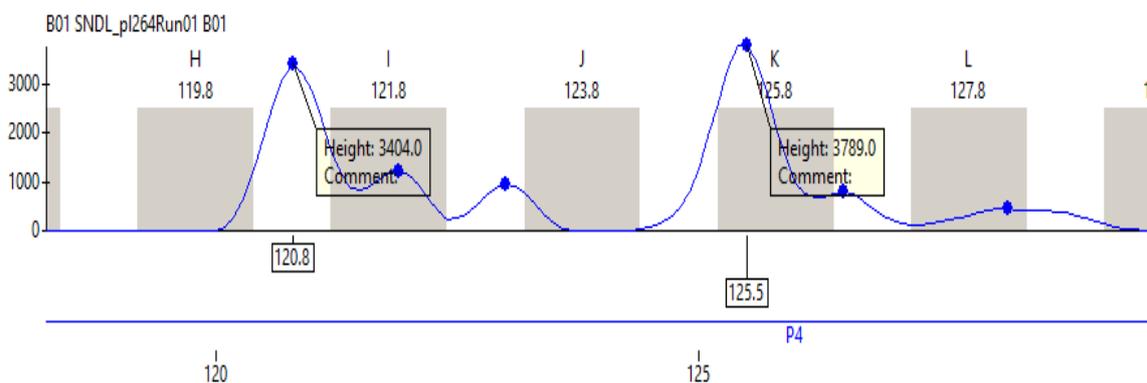


Figura S1.3: Padrão dos alelos do loco Bi34, com tamanhos de alelos 102 e 108 mais a cauda de M13 de 18 pb.

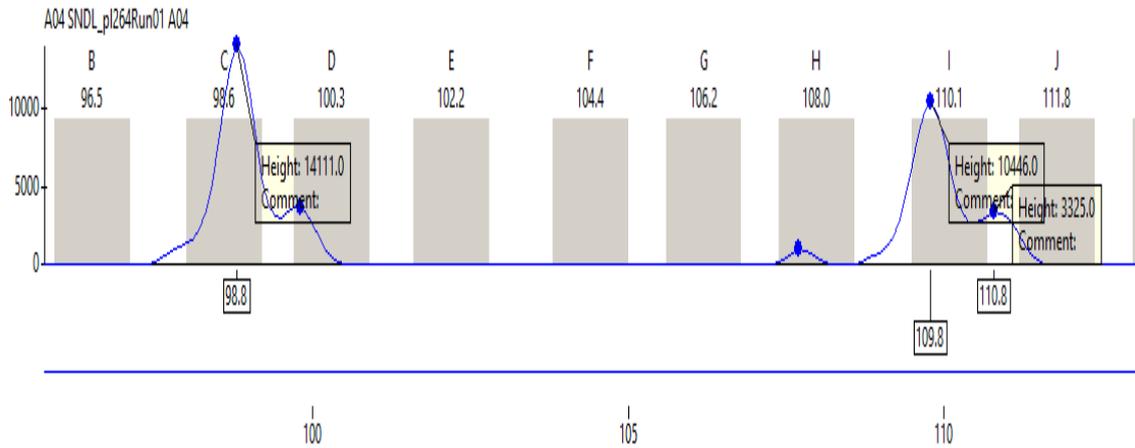


Figura S1.4: Padrão dos alelos do loco Bi36, com tamanhos de alelos 80 e 92 mais a cauda de M13 de 18 pb.

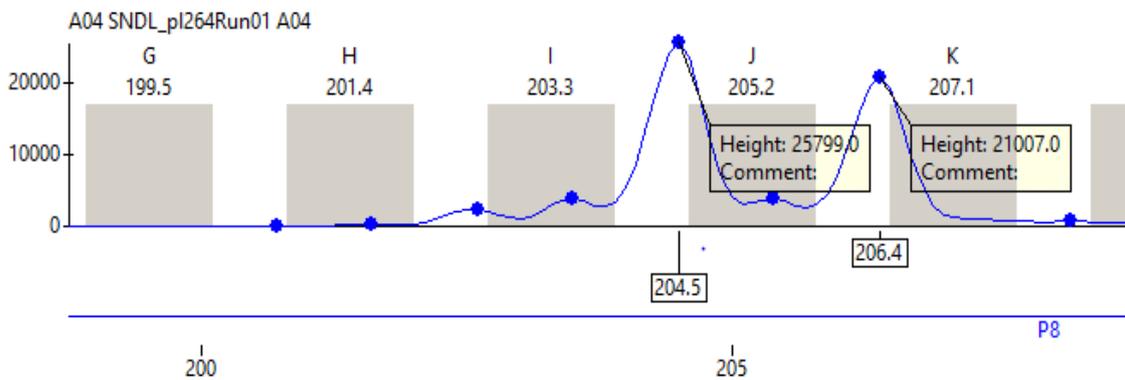


Figura S1.5: Padrão dos alelos do loco Bi38, com tamanhos de alelos 186 e 188 mais a cauda de M13 de 18 pb

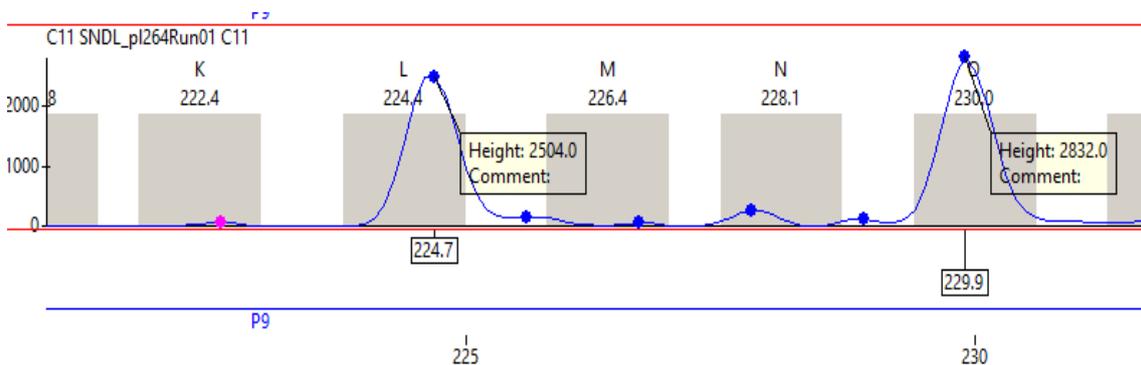


Figura S1.6: Padrão dos alelos do loco Bi39, com tamanhos de alelos 208 e 212 mais a cauda de M13 de 18 pb

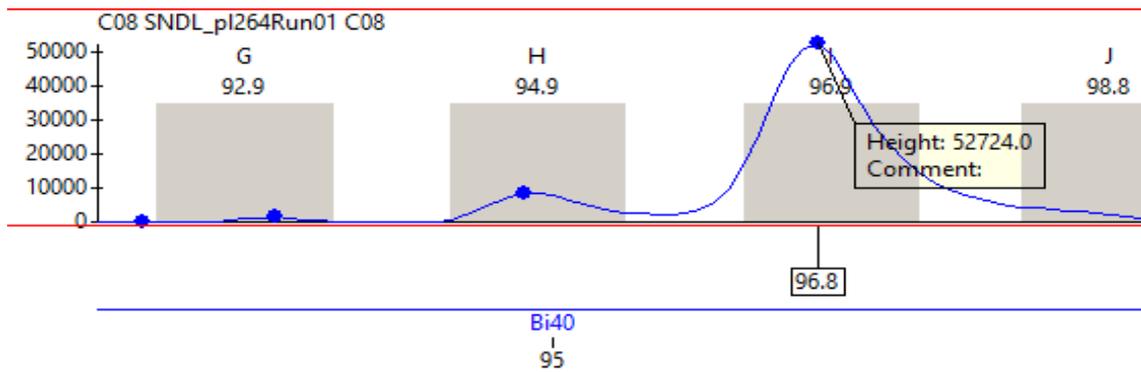


Figura S1.7: Padrão dos alelos do loco Bi40, com tamanho do alelo 96

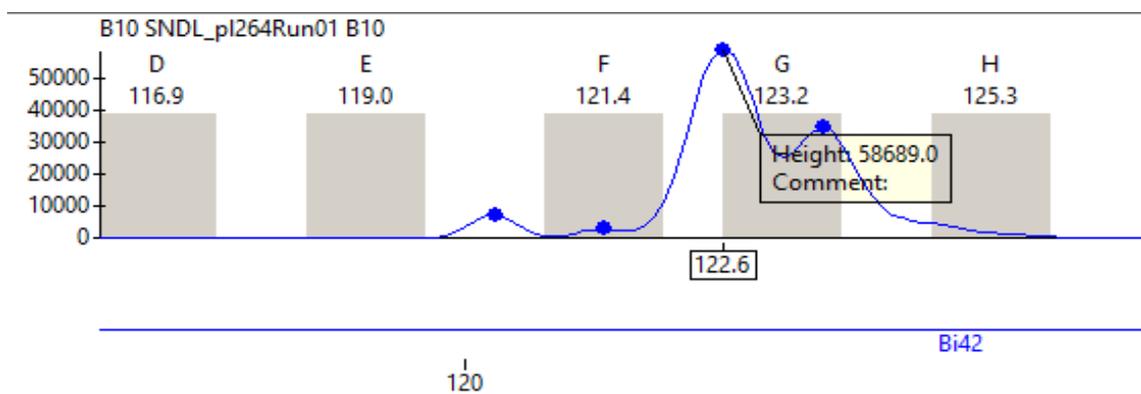


Figura S1.8: Padrão dos alelos do loco Bi42, com tamanho de alelo 122

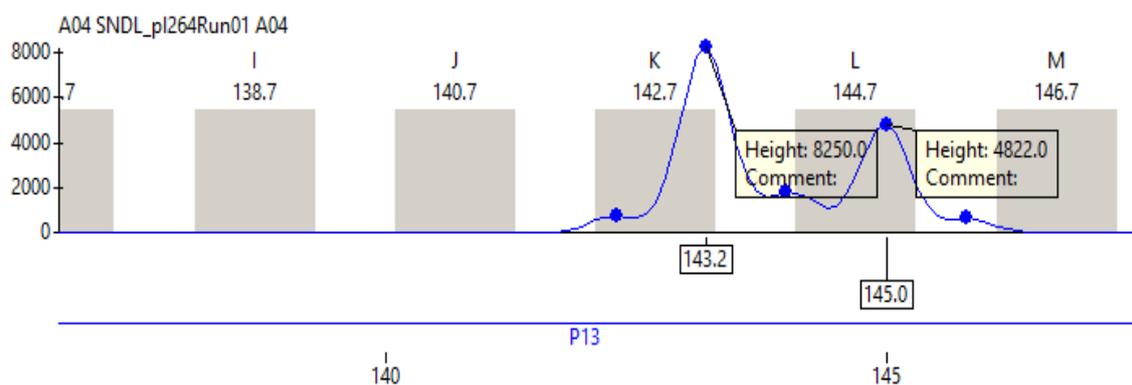


Figura S1.9: Padrão dos alelos do loco Bi43, com tamanhos de alelos 126 e 128 mais a cauda de M13 de 18 pb

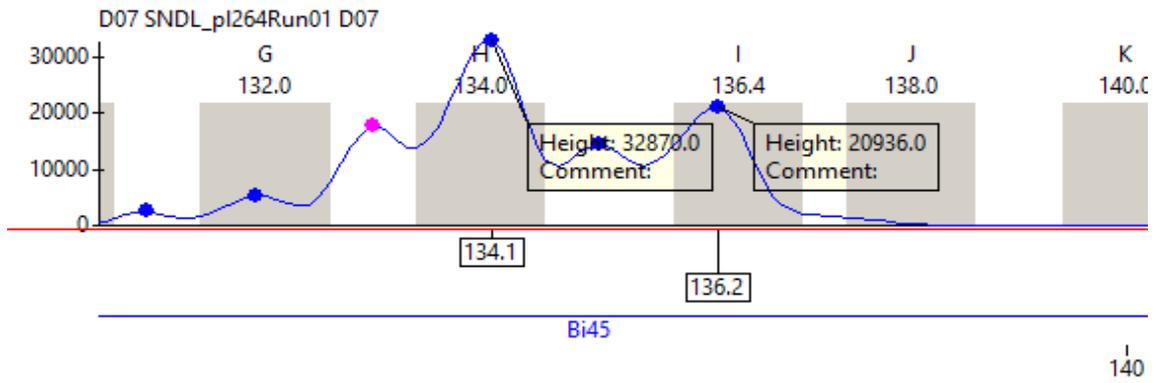


Figura S1.10: Padrão dos alelos do loco Bi45, com tamanho dos alelos 134 e 136

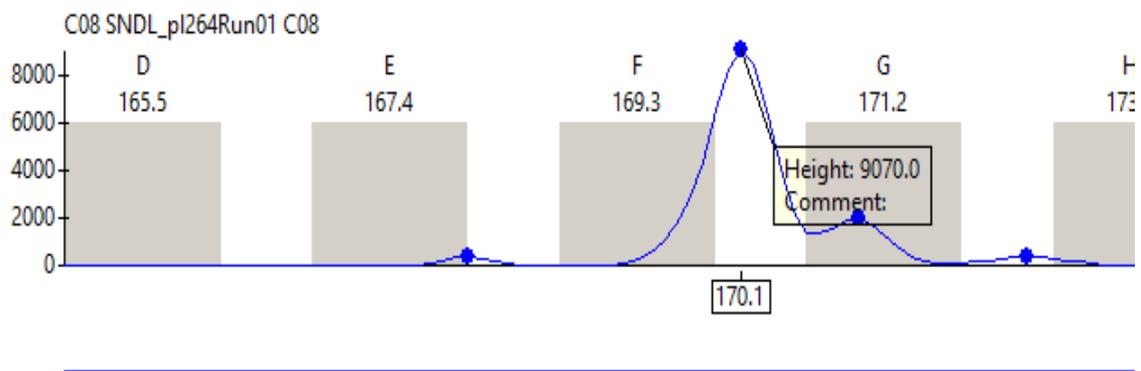


Figura S1.11: Padrão dos alelos do loco Bi46, com tamanho do alelo 152 mais a cauda de M13 de 18 pb

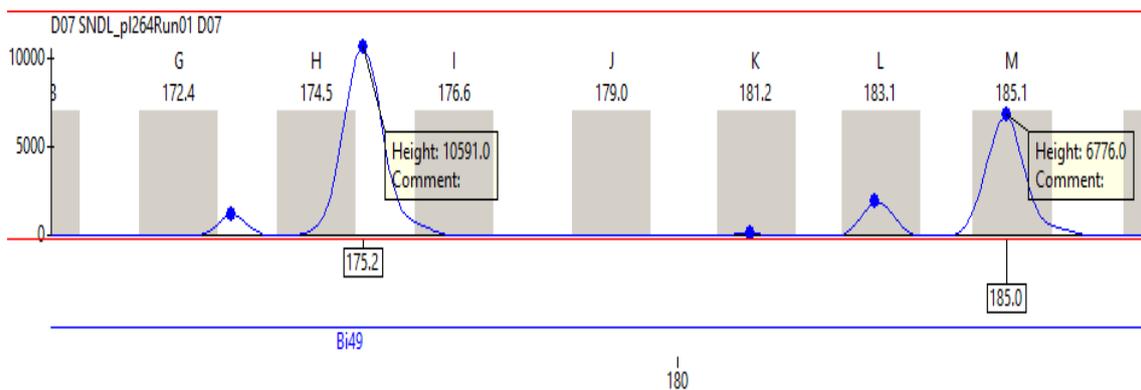


Figura S1.12: Padrão dos alelos do loco Bi49, com tamanho dos alelos 158 e 168 mais a cauda de M13 de 18 pb

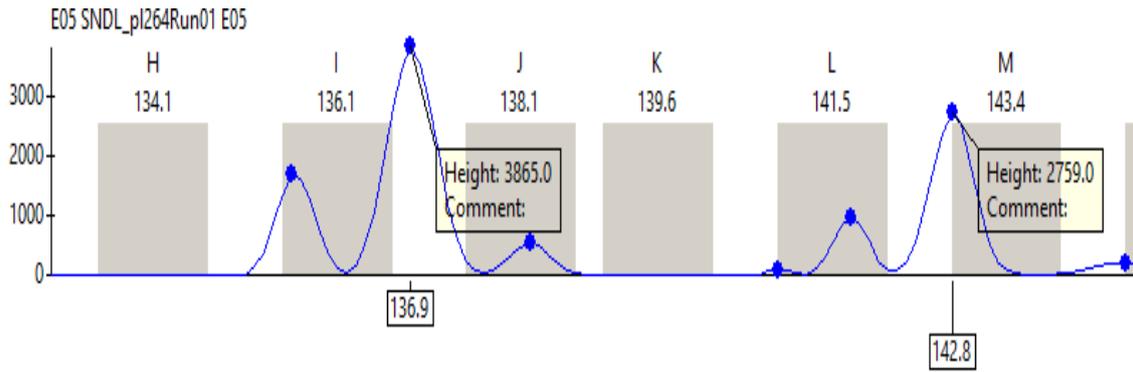


Figura S1.13: Padrão dos alelos do loco Bi50, com tamanho dos alelos 118 e 124 mais a cauda de M13 de 18 pb

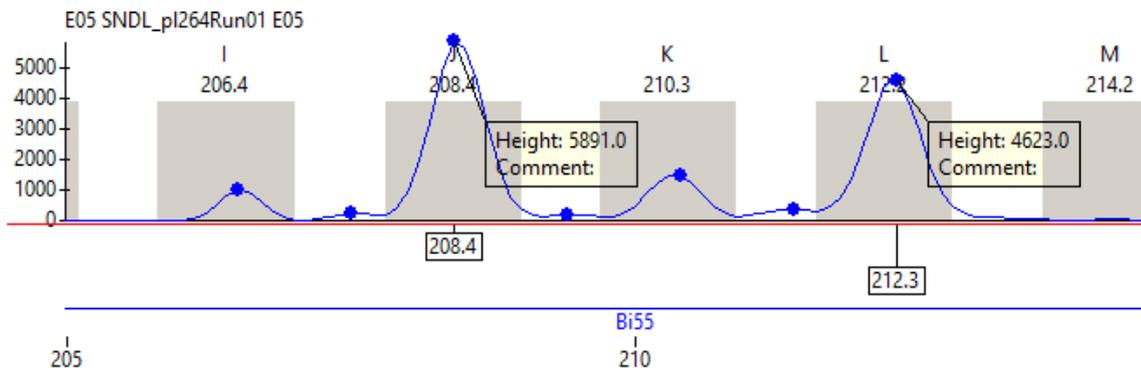


Figura S1.14: Padrão dos alelos do loco Bi55, com tamanho dos alelos 190 e 194 mais a cauda de M13 de 18 pb

Apêndice 2

Tabela S2.1: Valores de p obtidos nos testes para o equilíbrio de Hardy-Weinberg; p'= valor do p corrigido pelos testes de Bonferroni; * fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg

GB	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,135	0,013	1
	Bi33	0,7126	0,0203	1
	Bi34	0,5272	0,0131	1
	Bi36	0,0131	0,0027	0,1834
	Bi38	0,5399	0,0064	1
	Bi39	0,4269	0,0123	1
	Bi40	1	0	1
	Bi42	0,755	0,0026	1
	Bi43	0,7543	0,0087	1
	Bi45	0,2347	0,0049	1
	Bi46	0,3734	0,0134	1
	Bi49	1	0	1
	Bi50	0,0901	0,0051	1
	Bi55	0,0514	0,0092	0,7196
SE	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,07	0,009	0,98
	Bi33	0,8018	0,0153	1
	Bi34	0,054	0,0069	0,756
	Bi36	0,1211	0,0109	1
	Bi38	0,0595	0,0044	0,833
	Bi39	0,0138	0,0021	0,1932
	Bi40	10.000	0	1
	Bi42	0,168	0,0138	1
	Bi43	0,3753	0,0042	1
	Bi45	0,5335	0,0049	1
	Bi46	0,6801	0,0156	1
	Bi49	0,3249	0,0186	1
	Bi50	0,0262	0,0114	0,3668
	Bi55	0,0818	0,0209	1
GA	locos	p	S.E.	p'

Bi32	0,9502	0,0063	1
Bi33	0,7246	0,0103	1
Bi34	0,0041	0,0014	0,0574
Bi36	0,9299	0,0051	1
Bi38	0,0262	0,0032	0,3668
Bi39	0,0569	0,0061	0,7966
Bi40	10.000	0	1
Bi42	0,4479	0,0134	1
Bi43	0,6126	0,0073	1
Bi45	0,579	0,0024	1
Bi46	0,1388	0,008	1
Bi49	0,5225	0,0134	1
Bi50	0,5479	0,0174	1
Bi55	0,2997	0,0155	1

AS	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,0254	0,0074	0,3556
	Bi33	0,2871	0,0169	1
	Bi34	0,0493	0,0075	0,6902
	Bi36	0,8602	0,0055	1
	Bi38	0,0606	0,0038	0,8484
	Bi39	0,2134	0,0102	1
	Bi40	1	0	1
	Bi42	0,1257	0,009	1
	Bi43	0,1017	0,003	1
	Bi45	0,733	0,0046	1
	Bi46	0,1579	0,01	1
	Bi49	0,4945	0,0132	1
	Bi50	0,2417	0,0258	1
	Bi55	0,9659	0,0062	1

NI	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,1792	0,0238	1
	Bi33	0,0014	0,0006	0,0196*
	Bi34	0	0	0*
	Bi36	0,6089	0,0161	1
	Bi38	0,683	0,005	1
	Bi39	0,6457	0,0085	1

Bi40	1	0	1	
Bi42	0,8247	0,0086	1	
Bi43	0,8449	0,008	1	
Bi45	0,2867	0,0044	1	
Bi46	0,2046	0,0162	1	
Bi49	0,6537	0,0168	1	
Bi50	0,9562	0,0034	1	
Bi55	0,8108	0,0099	1	
<hr/>				
FN	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,0007	0,0003	0,0098*
	Bi33	0,1043	0,009	1
	Bi34	0,8229	0,0054	1
	Bi36	0,0407	0,0037	0,5698
	Bi38	0,4937	0,0096	1
	Bi39	0,1727	0,007	1
	Bi40	1	0	1
	Bi42	0,8052	0,0036	1
	Bi43	1	0	1
	Bi45	1	0	1
	Bi46	0,984	0,0027	1
	Bi49	0,9317	0,0039	1
	Bi50	0,3986	0,0243	1
	Bi55	0,4323	0,0304	1
<hr/>				
PA	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,2153	0,005	1
	Bi33	0,4339	0,0161	1
	Bi34	0,1792	0,0122	1
	Bi36	0,2738	0,0121	1
	Bi38	0,1422	0,0061	1
	Bi39	0,6039	0,0074	1
	Bi40	0,377	0,003	1
	Bi42	1	0	1
	Bi43	0,1189	0,0067	1
	Bi45	0,7063	0,0034	1
	Bi46	0,2622	0,0181	1
	Bi49	0,95	0,002	1

Bi50	0,0898	0,0093	1
Bi55	0,0024	0,0015	0,0336*

PE	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,4071	0,019	1
	Bi33	0,589	0,0107	1
	Bi34	0,2304	0,0059	1
	Bi36	0,1287	0,0205	1
	Bi38	0,5102	0,0094	1
	Bi39	0,0822	0,0051	1
	Bi40	1	0	1
	Bi42	0,0936	0,0056	1
	Bi43	0,7758	0,0025	1
	Bi45	0,824	0,0027	1
	Bi46	0,5737	0,0054	1
	Bi49	0,1134	0,0053	1
	Bi50	0,1328	0,0046	1
	Bi55	0,9165	0,0099	1

RN	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,0891	0,0096	1
	Bi33	0,9244	0,0053	1
	Bi34	0,6445	0,0073	1
	Bi36	0,099	0,0091	1
	Bi38	0,6074	0,0062	1
	Bi39	0,7972	0,0065	1
	Bi40	1	0	1
	Bi42	0,3777	0,0075	1
	Bi43	0,0345	0,0049	0,483
	Bi45	0,8762	0,0016	1
	Bi46	0,1898	0,0156	1
	Bi49	0,0704	0,0032	0,9856
	Bi50	0,0179	0,0036	0,2506
	Bi55	0,1709	0,0225	1

RS	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,3771	0,009	1
	Bi33	0,6934	0,0136	1
	Bi34	0,0089	0,0019	0,1246

Bi36	0,0394	0,0039	0,5516
Bi38	0,9635	0,0021	1
Bi39	0,0122	0,003	0,1708
Bi40	0,5586	0,0014	1
Bi42	1	0	1
Bi43	0,7822	0,0066	1
Bi45	1	0	1
Bi46	0,3256	0,0174	1
Bi49	0,0423	0,0035	0,5922
Bi50	0,001	0,0003	0,014*
Bi55	0,648	0,0147	1

SP	loco	p	S.E.	p'
	Bi32	0,197	0,0152	1
	Bi33	0,0508	0,0045	0,7112
	Bi34	0,7289	0,011	1
	Bi36	0,097	0,0077	1
	Bi38	0,6961	0,0036	1
	Bi39	0,0009	0,0005	0,0126*
	Bi40	1	0	1
	Bi42	1	0	1
	Bi43	0,5218	0,0064	1
	Bi45	0,2463	0,0053	1
	Bi46	0,7134	0,0166	1
	Bi49	0,7115	0,0055	1
	Bi50	0,0045	0,0018	0,063
	Bi55	0,1128	0,0153	1