

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

**Variabilidade genética em populações de *Jabiru mycteria*
(Lichtenstein, 1819) e *Mycteria americana* (Linnaeus,
1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia**



Iara Freitas Lopes

**São Carlos - SP
2006**

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

**Variabilidade genética em populações de *Jabiru mycteria*
(Lichtenstein, 1819) e *Mycteria americana* (Linneaus,
1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia**

Iara Freitas Lopes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências e Genética e Evolução.

Orientador: Profa. Dra. Sivia Nassif Del Lama

São Carlos – SP

2006

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

L864vg

Lopes, Iara Freitas.

Variabilidade genética em populações de Jabiru mycteria (Lichtenstein, 1819) e Mycteria americana (Linneaus, 1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia / Iara Freitas Lopes. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

106 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Genética de populações. 2. Mycteria americana. 3. Jabiru mycteria. 4. DNA mitocondrial. 5. Microsatélites. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

IARA FREITAS LOPES

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES *JABIRU MYCTERIA*
(LICHTENSTEIN, 1819) E *MYCTERIA AMERICANA* (LINNEAUS, 1758)
(AVES, CICONIIDAE): FLUXO GÊNICO E FILOGEOGRAFIA**

Tese de Doutorado apresentada Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências e Genética e Evolução.

Aprovada em 07 de julho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Presidente _____
(Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama)

1º Examinador _____
(Instituição)

2º Examinador _____
(Instituição)

3º Examinador _____
(Instituição)

4º Examinador _____
(Instituição)

Dedicatória

**Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Antonio Carlos Lopes e Neusa Maria de Freitas Lopes,
pelo entusiasmo e carinho**

Epígrafe

*To study the Way is to study the self.
To study the self is to forget the self.
To forget the self is to be enlightened by all things.
To be enlightened by all things is to remove the barriers between one's
self and others.*

Dogen

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Silvia Nassif Del Lama pela orientação, amizade, confiança e paciência durante todos esses anos de convivência.

À Prof. Dra. Susan M. Haig pela calorosa recepção, disposição e entusiasmo em ajudar na realização do estudo de genética de populações de *Jabiru mycteria*.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama pelas conversas produtivas, pela amizade e pelo bom humor.

Ao Prof. Dr. Travis Glenn por disponibilizar seu laboratório para que parte das análises dos cabeças-secas pudessem ser realizadas.

Aos amigos do laboratório de genética de aves da Universidade Federal de São Carlos, Fausto, Manoel, Keiko, Alessandra, Cristiano, Indhira, Mateus, Carol, Rafael, Ricardo, Juliana, Erika e Pati, obrigada pela ajuda e amizade.

À Patricia de Jesus Faria pela amizade, pela preciosa ajuda com as correções finais da tese e, principalmente, pelas idéias!

Aos amigos do “lado do mal” que sempre vão morar no meu coração... eles são muitos e não vou lembrar de todos mas gostaria de “saludar con cariño” a Margarita, a colombiana mais brasileira que eu conheço.

Aos colegas do laboratório de genética da conservação da Oregon State University, Renee Bellinger, Hope Draheim, Elise Elliott-Smith, Nathan Johnson, Tom Mullins, Peter Sanzenbacher e Oriane Taft pela convivência agradável e pelos muitos ensinamentos que recebi durante o estágio.

À Dylan C. Kesler, companheiro de laboratório, de discussões e de viagens, que me mostrou tudo de bom que os “States” tem à oferecer... Thank you!!!

Aos vários colegas brasileiros que conheci em Corvallis e que me ajudaram a matar um pouquinho as saudades do Brasil... muitas saudades de vocês agora!!!

Aos colegas que ajudaram com a coleta de amostras na região do Pantanal, Cristiano D. Rocha, Alexandre S. Cristino, Alessandra M. Tomasulo-Seccomandi, Alexandre T. B. dos Santos, Keiko K. Mattos, Marco A. Del Lama, Shannon Bouton e Mateus H. dos Santos.

Ao Prof. Dr. Dalci M. M. de Oliveira, pela ajuda na busca dos ninhos e na coleta de amostras dos tuiuiús no Mato Grosso.

Aos pesquisadores Dr. Ken Meyer e Ms. Omar Figueroa (University of Florida) e ao Dr. Gilberto Rios (UNELLEZ), por gentilmente disponibilizarem as amostras de tuiuiús coletadas nas áreas alagadas de Belize e da Venezuela, respectivamente.

Aos curadores do American Museum of Natural History, do National Museum of Natural History, do Field Museum of Natural History, da University of Michigan Museum of Zoology, da California Academy of Science, do Texas Cooperative Wildlife Collection e do Louisiana State University Museum of Natural Science, que gentilmente enviaram amostras de tuiuiús para a realização deste trabalho.

Aos donos das fazendas no Pantanal que nos permitiram a coleta de material biológico de cabeças-secas e tuiuiús em suas propriedades: A. A. R. Porfírio, J. J. Dittmar, J. Lousano, O. C. Cunha, T. Proença, R. Klabin e J. Ricardo, entre outros.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética e Evolução e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pela ajuda, conversas sérias e divertidas pelos corredores do DGE.

Aos meus muitos e queridos amigos da Federal, da USP, da UFMG, da.... não vai dar para citar todos os nomes ou vou acabar criando problemas... mas vocês sabem quem são!!!

Ao auxílio financeiro e apoio do CNPq, da CAPES, da FAPESP, do USGS-FRESC, da EMBRAPA Pantanal, da Estância Ecológica Caiman e da Neiva Guedes e toda a equipe do Projeto Arara Azul que nos auxiliaram durante a coleta no Pantanal de Miranda.

Ao IBAMA e ao CEMAVE pelas autorizações para a coleta e transporte das amostras utilizadas nesse estudo.

Aos meus pais, minha irmãs, minha sobrinha e todo o resto da família pela força, apoio e compreensão nos meus períodos de ausência.

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 2.1. Ninhos de tuiuiú amostrados na região do Pantanal.....	25
Tabela 2.2. Origem e data de coleta das amostras de tuiuiú provenientes de áreas alagadas fora da Brasil.....	28
Tabela 2.3. Colônias de cabeça-seca e número de indivíduos (n) provenientes do Pantanal e dos Estados Unidos.....	29
Tabela 2.4. Seqüências dos primers e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação e seqüenciamento do fragmento CRI em amostras de tuiuiús e cabeças-secas.....	35
Tabela 3.1. Seqüências dos primers utilizados nas amplificações e seqüenciamentos do fragmento CRI em tuiuiú.....	46
Tabela 3.2. Separação geográfica, temporal e número das amostras (n) utilizadas para a realização das análises com os diferentes marcadores moleculares.....	47
Tabela 3.3. Diversidade genética observada nas seqüências do DNAmít das populações de tuiuiú.....	51
Tabela 3.4. Estimativas de variabilidade genética baseada nos dez loci de microssatélites na amostra de tuiuiú coletada na região do Pantanal.....	52
Tabela 3.5. Diversidade genética baseada nos quatro loci de microssatélites heterólogos.....	52
Tabela 3.6. Resultados da AMOVA calculados para duas regiões do DNAmít e para quatro loci de microssatélites heterólogos, nas amostras contemporâneas	56
Tabela 3.7. Resultados da AMOVA calculados para a região CRI do DNAmít utilizando amostras contemporâneas e históricas.....	56
Tabela 3.8. Valores de <i>Fst</i> par-a-par apresentados para os dados de microssatélites e para as seqüências do fragmento CRI e da região ND2 utilizando somente amostras coletadas contemporaneamente.....	57

Tabela 3.9. Valores de <i>Fst</i> par-a-par obtidos para as seqüências do fragmento CRI do DNAmít, utilizando as amostras históricas e contemporâneas.....	57
Tabela 3.10. Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento CRI.....	58
Apêndice. Origem e data de coleta das amostras de tuiuiú provenientes de áreas alagadas da América Central e do norte da América do Sul.....	67
Tabela 4.1. Estimativas de variabilidade genética em cada colônia e nas populações do Pantanal e do sudeste dos EUA.....	77
Tabela 4.2. Dados de AMOVA obtidos nas análises do fragmento CRI de colônias reprodutivas de cabeças-secas dos EUA e do Pantanal.....	78
Tabela 4.3. Interpretação dos resultados significativos observados na “Nested Clade Analysis” dos dados apresentados na figura 4.5.....	82
Apêndice I. Eletroferogramas dos padrões normais e heteroplásmicos.....	91
Apêndice II. Distribuição dos haplótipos em cada colônia amostrada.....	92

Lista de Figuras

	Página
Figura 1.1. Casal de tuiuiús forrageando à beira da rodovia Transpantaneira.....	05
Figura 1.2. Foto de um cabeça-seca adulto à beira de uma lagoa no Pantanal de Miranda.....	07
Figura 2.1. Mapa das áreas alagadas neotropicais.....	23
Figura 2.2. Coleta de amostras de sangue de filhotes de tuiuiús na região do Pantanal.....	26
Figura 2.3. Mapa dos pontos de coleta e número de amostras de tuiuiú adquiridas em cada localidade.....	27
Figura 2.4. Mapa das colônias de cabeça-seca amostradas no Pantanal brasileiro e nos estados da Geórgia e Flórida nos EUA.....	30
Figura 2.5. Fotos da coleta e processamento do material das colônias de cabeça-seca no Pantanal e nos EUA.....	31
Figura 3.1. Mapa da área de distribuição dos tuiuiús e as localidades amostradas nesse estudo.....	44
Figura 3.2. Esquema da região de anelamento dos primers utilizados para amplificação e seqüenciamento do fragmento CRI em tuiuiú.....	46
Figura 3.3. Sítios polimórficos observados nos haplótipos identificados a partir de 58 seqüências do fragmento CRI e de 18 seqüências do ND2.....	53
Figura 3.4. Rede de haplótipos obtida para amostras contemporâneas utilizando do fragmento CRI.....	54
Figura 3.5. Rede de haplótipos gerada a partir das sequências do fragmento CRI determinada nas amostras de museu.....	54
Figura 3.6. Rede de haplótipos obtida para amostras contemporâneas utilizando do fragmento ND2.....	55

Figura 3.7. Gráficos de “mismatch distribution” obtidos para as seqüências do fragmento CRI do DNAmít de amostras de tuiuiú.....	59
Figura 3.8. Análise de “mismatch distribution” das seqüências da região ND2 do DNAmít.....	59
Figura 4.1. Mapa da localização das colônias de nidificação de cabeças-secas amostradas no presente estudo.....	73
Figura 4.2. Sítios polimórficos observados nos haplótipos identificados em seqüências do fragmento CRI de 88 indivíduos.....	76
Figura 4.3. Gráfico do resultado do Teste <i>t</i> de student aplicado aos dados de diversidade haplotípica das colônias do Pantanal e dos EUA.....	76
Figura 4.4. Dados <i>Fst</i> par-a-par computados utilizando cálculo de estatística- <i>F</i> convencional.....	79
Figura 4.5. Gráficos das curvas de “mismatch distribution” esperada e observada na população amostrada no Pantanal e do sudeste dos EUA.....	80
Figura 4.6. Rede de haplótipos e os agrupamentos para a realização da NCA.....	81

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1 Família Ciconiidae.....	3
1.1.1 O tuiuiú (<i>Jabiru mycteria</i>) (Lichtenstein, 1819).....	4
1.1.2 O cabeça-seca (<i>Mycteria americana</i>) (Linneaus, 1758).....	6
1.2. A genética e a conservação da biodiversidade.....	8
1.2.1 Estrutura genética das populações.....	8
1.2.1.1 Estimativas de fluxo gênico.....	10
1.2.1.2 Fatores históricos e subdivisão populacional.....	10
1.2.1.2.1 Filogeografia.....	11
1.2.2 Diversidade genética nas populações naturais.....	13
1.2.3 Marcadores moleculares.....	15
1.2.3.1 DNA mitocondrial.....	15
1.2.3.2 Microsatélites.....	15
1.2.4 Estrutura genética, variabilidade e conservação de populações de aves.....	16
1.3 Justificativas.....	17
1.3.1 Genética e conservação dos tuiuiús (<i>Jabiru mycteria</i>) na região Neotropical.....	17
1.3.2 Variabilidade e estrutura genética de populações das cabeças-secas (<i>Mycteria americana</i>).....	18
1.3.3 Aves aquáticas e a conservação das áreas alagáveis.....	20
1.4 Objetivos.....	21
2. CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Área de estudo.....	22
2.2 Amostragem.....	24
2.2.1 Tuiuiú.....	24
2.2.2 Cabeça-seca.....	29
2.3 Extração de DNA.....	31
2.3.1 Amostras de sangue.....	31

2.3.2 Amostras de penas.....	33
2.3.3 Amostras de material de museu.....	33
2.4 Seqüenciamentos e genotipagens.....	34
2.4.1 Amplificação e seqüenciamento de uma região variável do DNAmít em tuiuiús e cabeças-secas.....	34
2.4.2 Amplificação e seqüenciamento de uma região mais conservada do DNAmít em tuiuiús.....	35
2.4.3 Genotipagens dos locos de microssatélites heterólogos em tuiuiús.....	36
2.5 Análise de dados.....	37
2.5.1 DNA mitocondrial.....	37
2.5.2 Microssatélites.....	38
3. CAPÍTULO 3: Genética e conservação dos tuiuiús (<i>Jabiru mycteria</i>) na região Neotropical.....	40
4. CAPÍTULO 4: Variabilidade e estrutura genética de populações de cabeças-secas (<i>Mycteria americana</i>).....	68
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

Resumo

Este estudo estimou os níveis de variabilidade e estruturação genética e os padrões filogeográficos de populações naturais de tuiuiús (*Jabiru mycteria*) e de cabeças-secas (*Mycteria americana*), no continente americano. Ambas as espécies pertencem à família Ciconiidae, apresentam distribuição geográfica, morfologia e biologia similares, porém o tuiuiú é residente, enquanto que o cabeça-seca é migratório. Sequências do DNA mitocondrial (DNAMit) do primeiro domínio da região controladora (CRI, 549 pb) e do gene ND2 (ND2, 822 pb) e quatro locos de microssatélites heterólogos foram utilizados nas análises das amostras de tuiuiús, coletadas nas áreas de reprodução na América Central, no norte e no centro da América do Sul (n = 72). Ausência de diversidade foi detectada nos fragmentos do DNAMit estudados nas amostras de tuiuiús coletadas na América Central. O tamanho populacional menor e o declínio demográfico ocorrido na América Central foram considerados para explicar o baixo nível de diversidade observado nessa população de tuiuiús. Foi observada diferenciação genética significativa entre as localidades amostradas (CRI, $\Phi_{st} = 0.1767$; ND2, $\Phi_{st} = 0.4442$; microssatélites, $F_{st} = 0.1044$). A recente fragmentação do habitat e a dispersão limitada dos tuiuiús entre as áreas amostradas foram discutidas como prováveis causas da alta diferenciação genética observada. Sequências de 464 pb do CRI foram analisadas em amostras das colônias de cabeças-secas coletadas no Pantanal (n = 48) e das colônias do sudeste dos Estados Unidos (EUA) (n = 40). Não foi observada diferenciação genética significativa entre as amostras regionais (Pantanal, $F_{st} = -0.015$; EUA, $F_{st} = -0.043$), sugerindo ocorrência de fluxo gênico intenso ou recente colonização com expansão dessas populações, no Pantanal e nos EUA. Subdivisão populacional significativa foi observada, entretanto, entre as amostras do Pantanal e a do sudeste dos EUA ($F_{st} = 0.059$), indicando que o fluxo contemporâneo entre essas populações é limitado. A análise filogeográfica sugeriu ocorrência níveis intensos de fluxo gênico histórico entre as populações do Pantanal e dos EUA. Esse fluxo pode ter sido favorecido quando mudanças climáticas ocorreram no último período glacial, forçando o deslocamento dessas aves para regiões climaticamente mais estáveis e aumentando a possibilidade de trocas gênicas entre elas. Resultados indicativos de expansão demográfica recente na região do Pantanal foram evidenciados pelas análises das sequências de DNAMit em ambas espécies e podem estar associados à recente formação desta planície alagável.

Palavras Chave: Marcadores moleculares, *Mycteria americana*, *Jabiru mycteria*, Filogeografia, Conservação

Abstract

This study evaluates the levels of variability, genetic structure, and phylogeographical patterns of wild populations of Jabiru Storks (*Jabiru mycteria*) and Wood Storks (*Mycteria americana*). These species belong to the family Ciconiidae and present similar morphology, distribution, and ecological requirements. However, the Jabiru Stork is resident and Wood Stork is migratory. Sequences of 549 base pairs (bp) of the first domain of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region (CRI) and 822 bp of ND2 gene (ND2), and four heterologous microsatellite loci were used in a survey covering the entire range of Jabiru Storks (72 specimens from Central America, northern and central South America). A lack of diversity was detected in both mtDNA fragments of Central American samples analyzed. The smaller population size of Central American Jabiru Storks population and its demographic decline were potentially responsible for the lower variability observed in this area. Significant genetic differentiation was detected among locations (CRI, $\Phi_{st} = 0.1767$; ND2, $\Phi_{st} = 0.4442$; microsatellites, $F_{st} = 0.1044$). The recent habitat fragmentation and the limited dispersal of Jabiru Storks were likely causes of the high level of differentiation that we detected. Samples of Wood Storks collected in eight Pantanal colonies (n = 48) and eight southeast United States (US) colonies (n = 40) were analyzed using CRI sequences (464bp). A lack of differentiation was detected among colonies in the Pantanal ($F_{st} = -0.015$) and also among those sampled in the US ($F_{st} = -0.043$), suggesting high levels of gene flow among colonies, or even recent colonization followed by expansion in those areas. A further comparison between Pantanal and US samples revealed significant genetic structure ($F_{st} = 0.059$), which indicates that gene flow is limited between these population units. The phylogeographical analysis suggested a historical relationship between Pantanal and US populations. We hypothesize that during the last glaciation maximum, birds moved to more climatically stable areas near the equatorial region, where higher levels of gene flow then occurred. Demographic expansions in the Pantanal region was evidenced in the mtDNA analysis of both species, and might be associated with the recent formation of this wetland areas following increased temperatures and humidity in the Holocene.

Key Words: Molecular markers, *Mycteria americana*, *Jabiru mycteria*, Phylogeography, conservation

Capítulo 1

1 Introdução geral

1.1 Família Ciconiidae

As espécies da família Ciconiidae (ordem Ciconiiformes), conhecidas popularmente como cegonhas, são representadas por aves paludícolas de médio a grande porte com distribuição cosmopolita. Sete dentre as 19 espécies pertencentes à família constam na lista vermelha de espécies ameaçadas, divulgada em 2004 pela IUCN (The International Union for the Conservation of Nature): *Leptoptilos javanicus*, *Mycteria cinerea*, *Ciconia boyciana*, *Ciconia stormi*, *Ephippiorhynchus asiaticus*, *Leptoptilos dubius* e *Mycteria leucocephala*. Apesar do status que garante teoricamente maior proteção às espécies acima citadas, todas as outras espécies estão indiretamente em perigo, considerando o nível acelerado de degradação das áreas alagadas onde essas aves forrageiam e se reproduzem (Elliott, 1992).

Na região Neotropical, a família Ciconiidae está representada pelo tuiuiú (*Jabiru mycteria*), pelo cabeça-seca (*Mycteria americana*) e pelo maguari (*Ciconia maguari*). As três espécies são onívoras, possuem técnicas de forrageamento diversas, possuem bicos grandes e fortes, plumagem branca ou branca e preta e não apresentam dimorfismo sexual aparente. O período reprodutivo nas três espécies ocorre em diversas áreas alagáveis continente, durante a estação seca, quando as águas começam a baixar e as presas se concentram em lagoas e baías. Essas espécies apresentam vôo planado e aproveitam as correntes de ar quente ascendentes para planar distâncias de até 30 km, nas vizinhanças das colônias reprodutivas, à procura dos melhores lugares para forragear (Sick, 1997).

Grande parte dos estudos relativo aos aspectos ecológicos nessa família foi iniciado nas décadas de 60/70 por Kahl (1966, 1971, 1972a, entre outros). No continente americano, a maior parte das pesquisas se concentrou nas populações norte americanas de cabeça-seca (USFWS, 1984; Stangel *et al.* 1990, Van Den Bussche *et al.*, 1999; revisões e referências adicionais em Mitchell, 1999 e Coulter *et al.*, 1999). No Brasil, as colônias reprodutivas de cabeça-seca foram estudadas do ponto de vista do ecoturismo (Bouton & Frederick, 2003) e da genética (Del Lama *et al.*, 2002; Lopes *et al.* 2004; Rocha *et al.* 2004; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003; Tomasulo-Seccomandi, 2004; Lopes *et al.*,

2006). Dieta, comportamento e os movimentos sazonais das populações de tuiuiús foram estudados principalmente nas regiões do Pantanal brasileiro (Antas & Nascimento, 1996; Oliveira, 1997), nos Llanos da Venezuela (González, 1993; González, 1996a, b) e nas áreas alagadas de Belize (Paredes, 2004; Figueroa, 2005) e Honduras e Nicarágua (Frederick *et al.*, 1997). O maguari, talvez por apresentar comportamento mais arredo e possuir distribuição restrita ao continente sul americano, permanece sendo a espécie menos estudada (e.g., Thomas, 1986; González, 1998). Dados relativos à genética e conservação de duas espécies pertencentes à família Ciconiidae, o tuiuí e o cabeça-seca, serão apresentados e discutidos no presente estudo.

1.1.1 O tuiuí (*Jabiru mycteria*) (Lichtenstein, 1819)

É a única espécie representante do gênero *Jabiru* na família Ciconiidae. O adulto alcança 140 cm de altura, 280 cm de envergadura e cerca de 8.0 kg, dimensões que classificam o tuiuí como a maior ave aquática voadora das Américas. O adulto apresenta plumagem inteiramente branca, cabeça, bico e pernas com coloração negra e pescoço dilatável negro com base vermelha (Fig. 1.1). Os filhotes nascem cobertos por uma penugem branca na cabeça e no corpo (Sick, 1997; Antas & Nascimento, 1996). A espécie é considerada residente e ocorre em diversos ambientes aquáticos, distribuídos ao longo das Américas, desde o sul do México até o norte da Argentina (Hancock *et al.*, 1992), geralmente ocupando regiões alagadas pouco profundas no interior do continente mas pode também ser observada em manguezais e outros ambientes com influência marítima. Alimentam-se em bandos, associando-se a outras espécies da ordem Ciconiiformes, como por exemplo, o cabeça-seca, a garça-vaqueira (*Bulbucus ibis*) e a garça-branca-grande (*Ardea alba*). Os peixes capturados em águas rasas (menos de 50 cm) compreendem 86 % da dieta, enquanto que, anfíbios, pequenos répteis, caramujos e insetos são consumidos em menor proporção (Oliveira, 1997; Paredes, 2004).

Essa espécie nidifica isoladamente e os ninhos costumam ser reocupados de uma estação reprodutiva para outra. Pesquisadores têm proposto, a partir de dados de observação, que o mesmo casal ocupa o mesmo ninho ao longo dos anos (Kahl, 1973; Sick, 1997). Oliveira (1997) observou durante três estações reprodutivas consecutivas, que indivíduos morfologicamente identificáveis, por manchas ou outros caracteres, formaram pares estáveis que se mantiveram durante as três estações, caracterizando monogamia

social. González (1996a) identificou três ninhos de tuiuiú dentro de colônias reprodutivas de outras espécies de Ciconiiformes na Venezuela. Este evento raro foi também observado na região do Pantanal (C. D. Rocha e A. T. B. dos Santos, comunicação pessoal). A distância entre os ninhos varia de poucas dezenas de metros a 2 km e a sua localização não ocorre aleatoriamente, mas está associada às condições de forrageamento oferecidas nas áreas vizinhas (Figuerola, 2005). No Pantanal os ninhos estão preferencialmente localizados em grandes extensões de terras alagadas, em capões e cordilheiras ou perto de corixos (Antas & Nascimento, 1996; Oliveira, 1997). O tempo de construção de um novo ninho é de aproximadamente 2 meses e ninhos antigos são reformados e reutilizados por anos consecutivos. Ambos os parentais colaboram na construção dos ninhos, na incubação dos ovos, no cuidado dos filhotes e na defesa da área ao redor dos ninhos (Antas & Nascimento, 1996; González, 1996a, Oliveira, 1997).



Figura 1.1. Par de tuiuiús forrageando à beira da rodovia Transpantaneira (MT). Foto S. M. Haig.

O período reprodutivo está correlacionado às flutuações no regime de chuvas e tem início no fim da estação chuvosa se estendendo até a metade da estação seca em todas as áreas estudadas (Antas & Nascimento, 1996; González, 1996a; Oliveira, 1997; Figuerola, 2005). No Pantanal de Poconé, estado do Mato Grosso, a formação dos casais acontece no início da vazante, no mês de maio, com a reunião de um grande número de indivíduos para forragear e para a formação dos pares (Oliveira, 1997). Filhotes são observados nos ninhos entre os meses de julho e setembro e ali permanecem até outubro e novembro, quando

abandonam os ninhos na região do Pantanal (Antas & Nascimento, 1996; Oliveira, 1997). São encontrados em média três ovos por ninho e o tempo de incubação varia de 28 a 31 dias (Oliveira, 1997). Os filhotes permanecem no ninho por cerca de três meses e quando saem dos ninhos, continuam junto dos pais por aproximadamente dois meses. Dessa forma, os adultos investem em atividades relacionadas à reprodução de seis a sete meses por ano (González, 1996a).

1.1.2 O cabeça-seca (*Mycteria americana*) (Linnaeus, 1758)

O cabeça-seca é a segunda maior espécie da família Ciconiidae na região Neotropical e a única do gênero *Mycteria* existente no novo mundo. Os adultos medem cerca de 95 cm, pesam entre 2.0-3.0kg e apresentam cabeça, pescoço, bico e pernas com coloração negra e plumagem branca com exceção das rêmiges e retrizes que são negras (Fig. 1.2). Os filhotes nascem nus, possuem bicos encurvados, de cor amarela ou rosada e na terceira semana já estão empenados (Sick, 1997). A espécie pode ser encontrada desde o sudeste dos Estados Unidos (EUA) até a região norte da Argentina (Sick, 1997). São observados em diversos tipos de ambientes aquáticos caracterizados pela presença de faixas de água rasa como baías, lagos, pântanos, várzeas, entre outros. Os peixes, retirados de águas entre 15 e 50 cm de profundidade, se constituem na principal fonte alimentar da espécie. Análise do conteúdo estomacal dessas aves revelou que alimentos diversos podem ser consumidos em menor proporção como anfíbios, répteis, aves, mamíferos, artrópodes, plantas e fezes bovinas (Depkin *et al.*, 1992). A pesca depende do toque perceptivo do bico dentro da água e não da capacidade visual da ave (Hartman, 1961; Ogden *et al.*, 1978).

Durante todo o ciclo reprodutivo, os cabeça-secas formam colônias e, fora desse período, permanecem juntos, voando e forrageando em bandos (Sick, 1997). Grandes populações são encontradas na região do Pantanal durante o ciclo reprodutivo, entre julho e novembro. As colônias possuem tamanhos variáveis, podendo conter de poucas dezenas a milhares de indivíduos. O estabelecimento e o grau de atividade das colônias são influenciados pela disponibilidade de recursos e nível de predação local. O excesso de chuvas em períodos de seca levou ao abandono de colônias reprodutivas nos EUA e no Pantanal (Mitchell, 1999; I. F. Lopes e S. N. Del Lama, observação pessoal). Os grupos após o período reprodutivo se dispersam para outras regiões onde passam o período de

invernada. A direção e o destino desses deslocamentos são ainda pouco conhecidos, mas parecem ser orientados pelas condições ambientais e principalmente pela disponibilidade dos recursos alimentares (Coulter *et al.*, 1999). Fora da estação reprodutiva foram reportados movimentos de indivíduos provenientes de colônias da Florida (EUA) para os estados de Mississippi e Louisiana onde também foram observados indivíduos provenientes de populações reprodutivas do México e da Guatemala (Coulter *et al.*, 1999, Wood Stork Report, 2004; Bryan *et al.*, 2005). Indivíduos anilhados no Pantanal já foram recuperados no estado do Rio Grande do Sul e norte da Argentina durante o período de invernada (Yamashita & Valle, 1989; Antas, 1994). Um indivíduo imaturo anilhado por nosso grupo foi recuperado ao norte do Pantanal, indicando que os movimentos pós-reprodutivos podem ocorrer também na direção norte, conforme tendência de dispersão norte-sul observada em outras espécies da ordem Ciconiiformes (Melvin *et al.*, 1999).



Figura 1.2. Cabeça-seca adulto à beira de uma lagoa no Pantanal de Miranda (Mato Grosso do Sul). Foto P. de J. Faria.

A maturidade sexual é alcançada aos três ou quatro anos de vida (Coulter *et al.*, 1999). Os acasalamentos ocorrem no início da estação da seca e o nascimento dos filhotes coincide com o período de maior disponibilidade alimentar (Kahl, 1972b). Os casais se estabelecem a cada estação reprodutiva e são aparentemente monogâmicos (Coulter *et al.*, 1999). Os ninhos são construídos em árvores e distam cerca de um metro uns dos outros, e contém de um a três ovos no Pantanal (Bouton, 1999). O período de incubação flutua entre 28 e 32 dias e ambos os sexos se revezam tanto na incubação como no cuidado dos

filhotes. Coulter e Bryan (1995) observaram que novas tentativas de nidificação podem ocorrer após eventual perda da prole nos estágios iniciais do ciclo (ovos e filhotes pequenos). Os filhotes deixam o ninho entre a oitava e décima semana de vida e o período reprodutivo nessa espécie dura cerca de quatro meses por ano (Coulter & Bryan, 1995; Coulter *et al.*, 1999).

1.2 A genética e a conservação da biodiversidade

Os ambientes naturais estão sofrendo alterações e as espécies associadas a eles estão desaparecendo rapidamente devido ao crescimento acelerado das populações humanas (Pullin, 2002) e ao uso indiscriminado dos recursos naturais não-renováveis (Rampazzo, 2003). Nos anos noventa, a IUCN classificou 12,5% das espécies de plantas vasculares e 50% dos vertebrados como ameaçados de extinção (IUCN, 1996; IUCN, 1997). A taxa de extinção observada no planeta atualmente é recorde, ultrapassando de 1.000 a 10.000 vezes àquela estimada no registro fóssil (Pimm & Raven, 2000; Frankham *et al.*, 2002). Muitos afirmam que as avaliações nas taxas de extinção estão subestimadas devido ao nosso conhecimento taxonômico restrito de grupos altamente diversificados como o dos insetos (Frankham *et al.*, 2002).

A biodiversidade é geralmente avaliada ao nível dos genes, das espécies e dos ecossistemas. Controvérsias existem sobre qual destes níveis deve ser priorizado nos planos de manejo (e.g., Bowen, 1999), mas está claro que para que a conservação da biodiversidade tenha êxito todos os três níveis precisam ser preservados. O nível da biodiversidade definido pelas “populações locais geneticamente distintas”, é considerado o mais importante e sobre o qual se deve concentrar os maiores esforços de preservação (Luck *et al.*, 2003).

Os dois parâmetros principais a serem tratados neste trabalho, ambos importantes na conservação das espécies, envolvem as estimativas de subdivisão populacional e de variabilidade genética nas populações naturais. Estes dois assuntos serão aprofundados nos itens seguintes.

1.2.1 Estrutura genética das populações

A biologia da espécie, o meio ambiente e os processos evolutivos tais como a seleção natural, o fluxo gênico e a deriva genética são fatores que contribuem para a

determinação da estrutura genética das populações naturais (Slatkin, 1987). A deriva genética, a seleção natural e os mecanismos de modificação de DNA (mutações) causam alterações na distribuição da diversidade genética entre as populações de uma espécie. O isolamento promovido pelo surgimento de barreiras geográficas ou pela fragmentação do habitat reduz o movimento dos indivíduos reprodutores, acentuando as diferenças genéticas entre as populações. O fluxo gênico homogeneiza a composição genética e, portanto, reduz as diferenças entre as populações (Crochet, 1996). Espécies que possuem eficientes mecanismos de dispersão e baixa filopatria (i.e., baixa fidelidade ao local de nascimento) geralmente apresentam altas taxas de fluxo gênico, exibindo homogeneidade genética em larga escala geográfica. Por outro lado, espécies com baixa capacidade dispersiva ou alta filopatria natal frequentemente apresentam níveis baixos de fluxo gênico entre populações.

As espécies estão organizadas em um grande número de populações locais, as quais podem estar isoladas ou geneticamente relacionadas através do fluxo gênico que pode variar no espaço e tempo. Os principais modelos para explicar a estrutura genética das populações são (Futuyma, 1998; Frankham *et al.*, 2002):

- Modelo de ilhas: assume que a espécie está subdividida em populações (ou demes) com tamanhos efetivos iguais e que a troca de genes ocorre na mesma proporção, em todas as direções, independentemente da distância.

- Modelo continente-ilha: o fluxo gênico ocorre de maneira unidirecional sendo a população continente a fonte dos novos migrantes.

- Modelo de isolamento pela distância: a diferenciação é ocasionada pela limitação na dispersão dos indivíduos devido à distância geográfica entre as populações de maneira que, as populações que estão mais próximas apresentam maiores chances de trocarem genes entre si.

- Modelo passo-a-passo (“stepping-stone”): indivíduos pertencentes às populações adjacentes estão mais propensos às trocas gênicas.

- Metapopulações: se caracterizam por eventos regulares de extinção e recolonização de populações parcialmente isoladas de uma espécie.

1.2.1.1 Estimativas de fluxo gênico

Uma das técnicas mais utilizadas para se estimar o grau de fluxo gênico entre populações de uma espécie está baseada em índices de diferenciação genética como, por exemplo, a estatística- F de Wright (F_{st}) (Wright, 1965). Estimativas de F_{st} estão baseadas na distribuição das frequências alélicas, ou seja, a diferenciação genética é resultante da variação na proporção das frequências alélicas entre as populações. Os valores de F_{st} são calculados para se estimar o fluxo gênico interpopulacional supondo o modelo de ilhas (Wright, 1943). Utilizando-se marcadores genéticos neutros, as estimativas de F_{st} assumem que a subdivisão populacional é resultante apenas dos efeitos combinados da deriva genética e do fluxo gênico. As ilhas podem ser tratadas como réplicas que se caracterizam por dois parâmetros: o tamanho efetivo da população (N_e) e a taxa de migração (m). Esses parâmetros se inter-relacionam no equilíbrio mutação-deriva pela seguinte fórmula:

$$F_{st} \approx 1/(4N_e m + 1)$$

O valor de F_{ST} varia de 0 a 1, sendo que, valores próximos a 0 indicam ausência de diferenciação genética entre as populações (panmixia) e valores próximos 1 indicam subdivisão populacional acentuada.

Vários parâmetros semelhantes ao F_{st} de Wright foram propostos, como por exemplo, o Φ_{st} (Excofier *et al.*, 1992) e o R_{st} (Slatkin, 1995). O valor de Φ_{st} é obtido através de uma análise de variância molecular (AMOVA) que incorpora, além das análises de variâncias das frequências gênicas, a informação do número de mutações entre os haplótipos. O R_{st} foi desenvolvido para estimativas de diferenciação genética com dados de locos de microssatélites e incorpora o tamanho dos alelos nas análises.

1.2.1.2 Fatores históricos e subdivisão populacional

A estrutura genética das populações é profundamente afetada por processos históricos os quais geralmente explicam a distribuição dos haplótipos em uma rede de interações filogenéticas. Enquanto análises baseadas em estatística- F são apropriadas para quantificar a subdivisão em populações que se encontram no equilíbrio entre mutação e deriva genética (Slatkin & Barton, 1989; Niegel, 2002), essas abordagens não permitem inferir sobre como os alelos se relacionam entre si ou distinguir processos evolutivos (e.g., expansão populacional) envolvidos na distribuição das frequências alélicas observadas

(Larson, 1984; Templeton, 1995). A comparação intra-específica dos haplótipos gerados através de sítios de restrição ou seqüências de DNA mitocondrial (DNAMit) gera informações sobre a genealogia da espécie permitindo a construção de árvores gênicas. As árvores gênicas descrevem as relações de ancestralidade entre as seqüências de indivíduos de uma dada população. O conceito de coalescência (Kingman, 1980; Kingman, 1982a, b) relaciona a história demográfica e a genealogia da população e permite que sejam feitas estimativas que refletem a história evolutiva da mesma. Em linhas gerais, a teoria de coalescência pode ser descrita como um processo genealógico no qual se observa amostras de genes neutros de uma população de volta ao passado. Continuando de volta no tempo, o número de linhagens se reduz criando os nós (eventos de coalescência) observados nas árvores gênicas até chegar a um único ancestral do qual derivam todos os alelos descendentes, o chamado “ancestral comum mais recente” (Hudson, 1998).

Árvores gênicas e análises utilizando teoria de coalescência são ferramentas importantes para investigação dos processos evolutivos e de eventos demográficos que afetaram as populações de uma espécie no passado.

1.2.1.2.1 Filogeografia

Estudos filogeográficos têm como objetivo investigar os princípios e os processos envolvidos na distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1994). A filogeografia intra-específica investiga a estrutura genética das populações permitindo a discriminação entre processos históricos e contemporâneos pela reconstrução dos principais eventos que podem ter influenciado a estrutura genética atual. Cinco categorias foram propostas por Avise (2000) para definir os padrões que são observados nas análises filogeográficas:

- Categoria I: se caracteriza pela ocorrência de populações discretas, geograficamente isoladas e que se encontram profundamente diferenciadas geneticamente. Essas grandes descontinuidades filogeográficas frequentemente surgem devido à ocorrência de barreiras ao fluxo gênico por longos períodos de tempo, e promovem o surgimento de linhagens alopátricas.

- Categoria II: padrão observado quando as linhagens se encontram geneticamente diferenciadas sendo, porém, simpátricas. Este padrão normalmente se observa em espécies que apresentam níveis altos de fluxo gênico, tamanho efetivo grande e que sofreram

seleção balanceadora ou perda de genótipos intermediários, com retenção de algumas linhagens ancestrais. Contato secundário entre populações que evoluíram alopaticamente também é um dos eventos promotores deste padrão.

- Categoria III: caracterizada pela presença de haplótipos proximamente relacionados que estão, no entanto, alocados em regiões geograficamente distintas. Neste caso, o fluxo gênico contemporâneo deve ser baixo o suficiente para permitir a divergência genética entre populações isoladas recentemente através da deriva ou da “lineage sorting”.

- Categoria IV: padrão observado em populações panmíticas caracterizadas por níveis altos de fluxo gênico, com tamanho efetivo baixo e que não se encontram separadas por barreiras biogeográficas por longo prazo ou que sofreram expansão populacional recente. Filogenia em “forma de estrela” é uma assinatura genealógica esperada nos casos de expansão demográfica.

- Categoria V: padrão intermediário entre as categorias III e IV, as linhagens comuns se encontram proximamente relacionadas às linhagens privadas, e essas últimas se concentram em uma ou poucas populações locais. Este padrão é favorecido por fluxo gênico contemporâneo limitado entre populações que se encontram historicamente fortemente relacionadas.

A interpretação dos dados utilizando às categorias acima citadas é bastante subjetiva, e por isso, discutível. O uso de análises filogeográficas estatísticas, como a Nested Clade Analysis (NCA) (Templeton *et al.* 1992; Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 2004) permite uma análise mais objetiva dos resultados. A NCA utiliza os métodos baseados na teoria de coalescência para discriminação dos fatores determinantes da estrutura populacional. Através da utilização de árvores gênicas, a NCA testa a associação geográfica dos haplótipos e discrimina entre os efeitos do fluxo gênico (evento recorrente) e dos eventos históricos não-recorrentes, como a expansão e a fragmentação (Templeton *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1995, Templeton, 1998). Apesar de ser mais objetiva do que uma análise filogeográfica pura, a NCA tem sido alvo de críticas como as de Knowles e Maddison (2002) que apontaram inconsistências devido a não-incorporação de erros ou incertezas na NCA. Para minimizar os erros associados à NCA, Allendorf e Luikart (2007) sugerem o seu uso em conjunto com análises mais conservadoras como a AMOVA.

Estudos filogeográficos comparativos, envolvendo múltiplas espécies co-distribuídas, têm contribuído para o entendimento dos fatores que atuam na diversificação

das biotas regionais. As análises filogeográficas têm permitido o cálculo de estimativas tais como: tempo de separação entre populações, eventos de especiação, mudanças no tamanho efetivo da população ao longo do tempo, entre outras (Avice, 2000). Essas estimativas obtidas a partir dos dados moleculares podem ser avaliadas independentemente e comparadas com dados geológicos, paleontológicos, climatológicos e palinológicos referentes às regiões estudadas (Arbogast & Kenagy, 2001)

1.2.2 Diversidade genética nas populações naturais

A diversidade genética pode ser avaliada pelas diferenças individuais detectadas tanto no fenótipo (características morfológicas) quanto no genótipo (acessados ao nível do DNA) dos indivíduos de uma espécie. O grau de variabilidade genética ao nível molecular é tipicamente descrito através dos níveis de polimorfismos, heterozigosidade e diversidade alélica (Frankham *et al.*, 2002). No geral, considera-se que a variabilidade genética está associada à capacidade de adaptação das espécies ao meio ambiente e, por esse motivo, a manutenção dos níveis de variabilidade genética das populações é um dos focos principais nas estratégias de conservação (Frankham *et al.*, 2002).

Toda a variabilidade se origina através de mutação (Netto & Menck, 2001), porém, o nível de variabilidade genética apresentado por uma espécie é influenciado por uma série de fatores que atuam eliminando, aumentando ou disseminando essas novas mutações. Os principais fatores que influenciam o grau de variabilidade de uma população estão apresentados a seguir:

- Sistemas de acasalamento: a escolha randômica dos parceiros proporciona um maior nível de variabilidade, enquanto que, a ocorrência de endocruzamento ou cruzamentos preferenciais tendem a promover baixos níveis de heterozigosidade intrapopulacional (Frankham *et al.*, 2002). Uma das formas das populações naturais evitarem o endocruzamento é através da dispersão diferencial dos sexos (Greenwood, 1980).

- Tamanho das populações: populações de diferentes tamanhos respondem diferentemente aos efeitos da deriva genética e do endocruzamento (Solé-Cava, 2001). As populações pequenas geralmente apresentam uma maior probabilidade de perda de diversidade genética apenas sob o efeito da deriva. Efeitos mais severos do

endocruzamento, como por exemplo, a redução na taxa de fecundidade e da sobrevivência, podem também ser observados com mais frequência em populações pequenas (Meffe & Caroll, 1997)

- Gargalos populacionais: a recente colonização de novas áreas por um pequeno número de indivíduos (efeito fundador) ou declínios populacionais causados por catástrofes naturais, doenças ou destruição do habitat, podem promover a perda da variabilidade genética. A perda de alelos raros é geralmente mais significativa do que a perda da heterozigiosidade quando a avaliação é feita logo após a ocorrência do declínio demográfico. Períodos de declínio prolongado apresentam efeitos mais severos na perda da diversidade do que reduções, mesmo drásticas, ocorridas em apenas uma ou poucas gerações (Frankham *et al.*, 2002).

- Seleção natural: de maneira simplificada, a seleção natural pode ser definida como a reprodução diferencial e a sobrevivência dos diferentes genótipos. Acredita-se que as espécies apresentam alta diversidade genética têm maior capacidade de se adaptar às diferentes pressões de seleção a que estão sujeitas (Avisé, 1994; Frankham *et al.*, 2002). A seleção natural atua quase sempre reduzindo a variabilidade genética gerada por mutação.

- Migração: o “pool” gênico das populações de uma espécie diverge ao longo do tempo devido principalmente aos efeitos da deriva e da seleção. A migração (i.e., movimento e integração de indivíduos reprodutores entre as populações de uma espécie) reduz essas diferenças através do fluxo gênico. A alteração nas frequências alélicas da população original dependerá da proporção de alelos trazidos pelos indivíduos migrantes.

- Taxas de mutação: na ausência de migração, a diversidade genética perdida por uma população devido ao acaso ou à seleção somente será recuperada através de eventos mutacionais. As taxas de mutação são diferentes dependendo da região do genoma considerada e, geralmente, regiões não-codificadoras apresentam taxas de mutação mais elevadas do que regiões traduzidas do genoma, a não ser que exista uma pressão de seleção para alta variabilidade, como no caso dos genes do MHC (complexo principal de histocompatibilidade).

1.2.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares neutros são usados frequentemente nos estudos de populações naturais para a determinação dos padrões de fluxo gênico, de processos histórico-demográficos (e.g., gargalos e expansões populacionais) e estimativas de variabilidade genética. A utilização conjunta de marcadores com distintos padrões de herança e taxas de mutação, como os nucleares e mitocondriais, permite um melhor entendimento dos processos envolvidos no padrão de distribuição da variação genética. Apesar dos marcadores mitocondriais e nucleares estarem sujeitos às mesmas forças evolutivas (e.g., mutação, fluxo gênico e deriva genética), diferenças quanto às taxas de mutação e ao modo de herança desses marcadores podem levar à detecção de padrões distintos de variabilidade e subdivisão populacional (Avise, 1994; Avise, 2000).

1.2.3.1 DNA mitocondrial

A molécula circular do DNAmít é, na maioria das espécies, maternalmente herdada e geralmente não apresenta recombinação. Por esse motivo, o tamanho efetivo da população, calculado baseando-se no DNAmít, é quatro vezes menor quando comparado ao calculado para o genoma nuclear (Avise, 1994). Taxas de evolução distintas são observadas dependendo da região do genoma mitocondrial estudada. Essa heterogeneidade na taxa de evolução permite a realização de estudos em diferentes escalas de tempo filogenéticas, por exemplo, regiões com taxas de mutação baixas são mais apropriadas para reconstrução da história evolutiva de espécies diferentes, enquanto que, regiões com taxas de substituição mais altas são mais adequadas para as análises intra-específicas (Avise, 1994). A porção mais variável do DNAmít é conhecida como região controladora e estima-se que a taxa de substituições nessa região seja 2.8 a 5 vezes maior que a encontrada no restante da molécula (Hoelzel & Dover, 1991). A alta taxa de mutação aliada ao menor tamanho efetivo torna esta molécula mais sensível aos efeitos da deriva genética e, portanto, mais propensa a revelar a redução de variabilidade ocasionada por declínios populacionais. Essas características também evidenciam ocorrência de diferenciação genética entre populações na ausência de intenso fluxo gênico via fêmeas.

1.2.3.2 Microssatélites

Os locos de microssatélites se caracterizam por apresentarem subunidades repetitivas justapostas de 1-8 bases, geralmente localizados no genoma nuclear. São marcadores

altamente polimórficos, não-codificantes e obedecem a padrões de herança mendeliana. A maior dificuldade apontada para a utilização de microssatélites em estudos genéticos, é a necessidade de prospecção desses loci para cada espécie que se pretende trabalhar. O uso de primers heterólogos geralmente leva à detecção de um menor nível de variabilidade quando utilizado em espécies filogeneticamente distantes (Primmer *et al.*, 1996). Nos últimos anos, loci de microssatélites têm sido utilizados em diferentes tipos de análises, como por exemplo, estudos de parentesco, genética forense, estrutura genética das populações, entre outras. Por serem marcadores altamente variáveis e possuírem uma alta taxa de evolução, os microssatélites possibilitam uma melhor resolução da estrutura genética da população quando comparados aos marcadores nucleares menos polimórficos como as alozimas (Hedrick, 1999).

1.2.4 Estrutura genética, variabilidade e conservação das populações de aves

A classe aves é um dos grupos taxonômicos melhor conhecidos, com mais de 9.800 espécies descritas (Clements, 2000). Desde o início do século dezesseis até os dias hoje foram registradas a extinção de 1.3% das espécies de aves, em sua grande maioria (81%) insulares. Além da taxa de extinção observada, nota-se que as populações de 20-25% das espécies de aves do planeta passaram por redução no número de indivíduos, durante esse mesmo período. Uma recente projeção do declínio global de aves revelou que as espécies dependentes de áreas alagadas estão entre os grupos mais ameaçados no próximo século (Sekercioglu *et al.*, 2004).

Na década de oitenta, os níveis de variabilidade e diferenciação genética foram determinados em populações de aves através da utilização marcadores alozímicos (Awise & Aquadro, 1982; Barrowclough, 1983). Estes estudos geralmente demonstravam ocorrência de baixos níveis de diversidade (heterozigosidade média = 0.054) e ausência de estruturação genética ($Gst = 0.076$) nas populações investigadas (Ward *et al.*, 1992). Na década de noventa, com a disseminação do uso de marcadores moleculares que acessavam polimorfismos ao nível do DNA e exibiam níveis mais altos de variabilidade (e.g., marcadores de microssatélites e seqüências de regiões variáveis do DNAmít) novas estimativas foram realizadas em várias espécies de aves. Com o uso desses marcadores, um quadro variado de estimativas da variabilidade genética e estrutura genética da população foram observados, como por exemplo, a ocorrência inesperada de baixos níveis

de variabilidade em locos de microsatélites de algumas espécies de aves marinhas não ameaçadas (Faria, 2005; Szczys, 2005) e indícios de expansão populacional após o término do Pleistoceno em várias espécies do hemisfério norte (Congdon *et al.*, 2000; Rymer *et al.*, 2001; Moum & Árnason, 2001; Randi *et al.*, 2003; Zink *et al.*, 2003; entre outros).

Segundo Kushlan (1992) a população, definida como o grupo local de indivíduos intercruzante (deme), é a unidade mais apropriada para a conservação de aves aquáticas. A determinação da estrutura genética das populações pelo uso de marcadores moleculares é uma das ferramentas importantes para a definição da unidade populacional. Quando se determina os níveis de fluxo gênico entre populações e, indiretamente, os padrões de migração e dispersão das populações de uma espécie, pode-se tomar decisões básicas para seu manejo. Por exemplo, populações de aves aquáticas que diferem geneticamente umas das outras devem ser tratadas como unidades independentes para garantir que a variação genética apresentada pela espécie seja preservada. Por outro lado, se a espécie apresenta um alto grau de fluxo gênico e, portanto, uma grande homogeneidade genética entre as populações ao longo de sua área de ocorrência, a proteção de cada uma das populações será menos crítica (Friesen, 1997).

1.3 Justificativas

1.3.1 Genética e conservação dos tuiuiús (*Jabiru mycteria*) na região Neotropical

Observações de campo realizadas na década de setenta definiram a ocorrência de três populações disjuntas de tuiuiús ao longo de sua área de distribuição (Short, 1975; Blake, 1977). Estas populações estariam localizadas na América Central, no norte da América do Sul e no centro da América do Sul (Luthin, 1987). Estudos mais recentes, realizados para investigar os movimentos sazonais da espécie em algumas áreas restritas de ocorrência, revelaram que as populações do Pantanal (Antas & Nascimento, 1996), dos Llanos da Venezuela (González, 1996b) e das áreas alagadas de Belize (Figuroa, 2005) são residentes nas respectivas regiões.

O tuiuiú está listado no “Appendix I” do CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), status dado às espécies consideradas

ameaçadas. A espécie está também classificada como regionalmente ameaçada na América Central, devido ao recente declínio provocado pela destruição do habitat (Luthin, 1987; Elliott, 1992; Stotz *et al.*, 1996). Estima-se na região da América Central a ocorrência de um número total de somente 400 indivíduos (Paredes, 2004) ou 70-80 casais (Figueroa, 2005). Não há censos sistemáticos nas diversas áreas de ocorrência da espécie nem registros de declínios populacionais na América do Sul. A mais recente estimativa de tamanho populacional indicou ocorrência de 10.000 a 25.000 indivíduos somando-se as populações localizadas no norte e no centro da América do Sul (Wetlands International, 2002). Estimativas na década de oitenta indicaram a existência de somente 223 indivíduos nos Llanos da Venezuela (Ramo & Busto, 1984) e de 10 pares reprodutivos na costa de Suriname (de Jong & Spaans, 1984). Luthin (1987) destaca que a região do Pantanal brasileiro abriga a maior e mais estável população reprodutiva da espécie que num recente senso foi estimada em 15.800 indivíduos (Coutinho *et al.*, 1997).

Os estudos que indicam que os tuiuiús são residentes nas áreas onde se reproduzem sugerem ausência de migração e troca de integrantes entre esses grupos é, portanto, esperado um fluxo gênico reduzido entre as localidades. A detecção ou não de fluxo gênico ao nível molecular depende de vários fatores entre eles o tempo de isolamento das populações, o tamanho efetivo das populações e a taxa de mutação dos marcadores utilizados na análise. Com esse estudo, pretende-se determinar o nível de fluxo gênico entre as indivíduos amostrados em importantes áreas alagáveis dentro das três supostas populações e testar a validade desta designação. Pretende-se também verificar se o declínio sofrido pela espécie na América Central comprometeu o nível de variabilidade genética desta população quando comparada às populações sul americanas.

1.3.2. Variabilidade e estrutura genética das populações de cabeças-secas (*Mycteria americana*)

Os cabeças-secas são aves aquáticas coloniais que apresentam ciclos reprodutivos sincronizados às flutuações periódicas no nível das águas característico das diversas áreas alagáveis que ocupam, quase continuamente, desde o sudeste dos EUA até o norte da Argentina. Redução populacional causada pelo desflorestamento, pela poluição e pela manipulação no nível das águas levou ao declínio de 60.000 para 5.000 indivíduos reprodutores no sul da Flórida, entre 1930 e 1978 (USFWS, 1984; Ogden *et al.*, 1987;

Mitchell, 1999). A espécie encontra-se listada como ameaçada de extinção na legislação interna dos EUA desde 1984 e os esforços para recuperação da população estão dando resultados, pois estimativas recentes revelam que cerca de 9.000 pares se reproduzindo no sudeste dos EUA (Wood Stork Report, 2004). Não há censos sistemáticos na região do Pantanal brasileiro e caso declínios demográficos tenham ocorrido nessa região, esses não foram registrados.

O grau de variabilidade e a diferenciação genética entre as colônias de cabeça-seca dos EUA foram determinados utilizando-se sistemas alozímicos (Stangel *et al.*, 1990), locos de microssatélites e DNA fingerprinting (Van Den Bussche *et al.*, 1999; Tomasulo-Seccomandi, 2004). As frequências alélicas levantadas nos nove sistemas alozímicos polimórficos indicaram existir diferenciação baixa, porém significativa, entre as colônias de nidificação (Stangel *et al.*, 1990). Estudos desenvolvidos por Van Den Bussche *et al.* (1999), utilizando dados de DNA fingerprinting e quatro locos de microssatélites, indicaram ausência de diferenciação genética entre as colônias e um baixo nível de variabilidade genética na população de cabeça-seca dos EUA como um todo. Análises mais recentes, utilizando dez locos de microssatélites polimórficos, evidenciaram novamente a ocorrência de subdivisão populacional entre as colônias do sudeste dos EUA (Tomasulo-Seccomandi, 2004).

A estrutura genética das colônias reprodutivas do Pantanal brasileiro foi acessada utilizando-se os mesmos locos alozímicos e microssatélites descritos para as populações dos EUA. As análises baseadas nos locos nucleares não indicaram ocorrência de subdivisão populacional entre as colônias do Pantanal (Del Lama *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004; Tomasulo-Seccomandi, 2004). Índícios de expansão demográfica dos cabeças-secas na região do Pantanal foram observados nas análises de seqüências 390/460 pares de bases do domínio III da região controladora do DNAmít (Lopes *et al.*, 2006). Níveis de variabilidade genética estimados para os marcadores nucleares foram similares entre a população do Pantanal e a dos EUA sugerindo que, apesar do declínio, a diversidade genética da população dos EUA não havia sido erodida (Del Lama *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004; Tomasulo-Seccomandi, 2004).

Análises comparativas baseadas no DNAmít nunca foram realizadas entre as populações do Pantanal e dos EUA e uma das propostas deste estudo é avaliar os níveis de variabilidade e diferenciação genética entre essas populações utilizando seqüências de

parte do domínio I da região controladora do DNAmít. Considerando que o DNAmít é um marcador mais propenso a apresentar sinais genéticos de mudanças demográficas e dos eventos de redução populacional, espera-se observar nível de variabilidade reduzido na população dos EUA em comparação com a do Pantanal, supondo que a população permaneceu estável no período em que a norte americana passou por gargalo populacional. A detecção de subdivisão populacional utilizando os dados de DNAmít dependerá dos níveis de fluxo gênico histórico e contemporâneo entre essas populações.

1.3.3 Aves aquáticas e a conservação das áreas alagáveis

Ecossistemas de áreas alagáveis estão entre os mais biodiversos e a importância da preservação deste tipo de habitat está refletida em vários tratados inter-governamentais que visam sua proteção e manejo (e.g., a Convenção de Ramsar). Apesar dos esforços, quase 50% das áreas alagáveis foram destruídas no último século pelo crescente desenvolvimento urbano e agrícola, tornando este ecossistema um dos mais ameaçados do planeta (Shine & Klemm, 1999).

Os padrões hidrológicos sazonais típicos de áreas alagáveis estão intimamente relacionados à biologia de várias espécies de aves aquáticas que regulam seus ciclos reprodutivos aos níveis de água mais apropriados para forrageamento (Ogden *et al.*, 1980; Frederick & Collopy, 1989; Frederick, 2002; entre outros). Devido a essa inter-relação, as populações de aves aquáticas são freqüentemente utilizadas como indicadoras da riqueza e da diversidade de ambientes alagados (Wetlands International, 2002). Tanto o tuiuiú como o cabeça-seca são importantes representantes do grupo de aves aquáticas que ocupam diversas áreas alagadas do continente americano. Ambas as espécies são sensíveis à degradação ambiental, e os principais fatores que ameaçam à integridade dessas populações são a implantação de projetos agrícolas, com subsequente manipulação do nível das águas e o desflorestamento, (Luthin, 1987; González, 1993, Coulter *et al.*, 1999; Paredes, 2004; Figueroa, 2005).

As colônias reprodutivas de cabeça-seca, os ninhos dos tuiuiús e as lagoas onde estas e outras espécies de aves aquáticas se reúnem para forragear, se constituem em motivo de grande interesse para observadores de aves e turistas. Devido às características acima citadas, estas espécies possuem um grande potencial para serem usadas com sucesso como “espécies-bandeira” em campanhas de conservação de áreas alagadas, beneficiando assim

outras espécies da comunidade e o ecossistema como um todo. Espera-se que estes estudos genéticos possam ser utilizados para dar subsídio às estratégias de manejo e conservação dessas espécies e indiretamente promover a preservação das áreas alagadas das quais elas dependem para forrageamento e reprodução.

1.4 Objetivos

No presente estudo serão utilizados marcadores moleculares neutros nas análises do grau de variabilidade e de diferenciação genética entre populações naturais de tuiuiús e cabeças-secas. Espera-se que estes dados possam contribuir para um melhor entendimento da biologia dessas espécies e fornecer informações que possam auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo das mesmas nas áreas úmidas enfocadas.

Na espécie *Jabiru mycteria* o presente estudo teve como objetivos:

1. Acessar o nível de variabilidade e diferenciação genética em amostras coletadas em três importantes áreas de reprodução da espécie, utilizando-se seqüências parciais da região controladora e do gene ND2 do DNAmít e quatro locos de microssatélites heterólogos;
2. Comparar o nível de variabilidade genética entre amostras históricas (1882-1973) e contemporâneas (2000-2006) coletadas em áreas alagadas da América Central e do norte da América do Sul utilizando seqüências parciais da região controladora do DNAmít.

As análises desenvolvidas para a espécie *Mycteria americana* visaram:

1. Comparar os níveis de diversidade e estruturação genética das colônias de cabeça-seca do Pantanal e do sudeste dos Estados Unidos, utilizando-se seqüências parciais da região controladora do DNAmít.
2. Investigar os níveis de subdivisão populacional e os processos filogeográficos envolvidos com a estrutura genética observada em ambas as regiões estudadas.

Capítulo 2

2 Material e Métodos

2.1 Área de estudo

Ecossistemas de áreas inundáveis possuem relevo plano, são constituídos por mosaicos com diferentes tipos de vegetação e caracterizados por alagamentos e secas periódicas que produzem importantes influxos biogeoquímicos aos quais a biota se encontra adaptada (Iriondo, 2004). Estas áreas ocorrem ao longo da costa (estuários e mangues) ou no interior do continente (pântanos) de forma naturalmente fragmentada (Whited *et al.*, 2000) (Fig. 2.1).

A região dos Everglades, localizada no sul do estado da Flórida (EUA) é considerada uma das áreas mais importantes para forrageamento e reprodução de aves aquáticas na América do Norte. Historicamente, a região dos Everglades apresentava cerca de 1.200.000 hectares de áreas sazonalmente alagadas que suportava a formação das maiores colônias reprodutivas de Ciconiiformes dos EUA (Davis & Ogden, 1994). Cerca de 50% dos Everglades foi drenada para o desenvolvimento urbano e agrícola da região no início da década de quarenta (Davis & Ogden, 1994) o que ocasionou declínio demográfico de diversas espécies da fauna na área (Gawlik, 2006). Colônias reprodutivas da espécie *M. americana* amostradas na década de noventa em áreas alagadas dos estados da Geórgia são provavelmente formadas por indivíduos provenientes das (praticamente) extintas colônias existentes no sul da Flórida.

Cerca de 10.475 km² de áreas alagadas consideradas importantes para forrageamento e reprodução de espécies como o tuiuiú são encontradas atualmente na América Central (Figuerola, 2005). Estas áreas se apresentam altamente fragmentadas e sofrem com os altos níveis de degradação devido ao acelerado crescimento humano na região (cerca de 3%/ano). Amostras de *J. mycteria* analisadas no presente estudo são provenientes das mais importantes áreas inundáveis da América Central.

O continente sul americano possui o maior número de áreas alagadas contínuas do mundo com aproximadamente 1.000.000 km² (Neiff, 2001). Dentre as principais áreas inundáveis do continente sul americano, a região dos Llanos da Venezuela e Colômbia e o Pantanal brasileiro se destacam tanto por suas dimensões como pela rica diversidade de

fauna e flora que abrigam. Amostras de *M. americana* e *J. mycteria* coletadas no Pantanal foram analisadas neste estudo. Amostras de outras áreas inundáveis da América do Sul se restringem à espécie *J. mycteria*.



Figura 2.1. Mapa das áreas alagadas neotropicais (Lehner & Döll 2001, modificado de <http://www.sage.wisc.edu/atlas/index.php>)

2.2 Amostragem

No presente estudo foram utilizadas amostras de indivíduos coletados em importantes áreas reprodutivas das espécies investigadas no continente Americano. As amostras de tuiuiús são provenientes de áreas reprodutivas na América Central (México, Belize, Nicarágua e Costa Rica) e da América do Sul (noroeste do Colômbia, Llanos da Venezuela, áreas alagadas ao sudoeste da Guiana, regiões de Loreto e Madre de Dios no Peru, e Pantanal brasileiro). Filhotes de cabeças-secas foram amostrados em colônias reprodutivas nos estados da Geórgia e Flórida nos EUA e na região do Pantanal brasileiro. A seguir serão apresentados maiores detalhes sobre a coleta de material biológico utilizado nesse estudo.

2.2.1 Tuiuiú

Foram analisadas amostras de 72 indivíduos da espécie *J. mycteria* incluindo material fresco (sangue, ossos e penas) coletado no campo ou solicitado à zoológicos e amostras de material fixado obtidas junto aos museus dos EUA.

Na região do Pantanal foram acessados 21 ninhos com filhotes, totalizando amostras de sangue de 49 indivíduos, sendo 15 da região do sul (Nhecolândia e Miranda) e 34 na região de norte (Transpantaneira) (Fig 2.3). Amostras de penas e ossos de filhotes mortos foram coletadas no chão embaixo de 5 ninhos, penas de adultos foram encontradas dentro e embaixo de 10 ninhos com filhotes. No chão embaixo de 15 ninhos vazios foram coletadas penas que provavelmente pertenciam aos adultos que estavam ocupando estes ninhos antes da nossa chegada (ver Tab. 2.1 para maiores detalhes). O acesso aos ninhos se deu através do uso de equipamentos de alpinismo, os filhotes foram capturados manualmente e após coleta de cerca de 0.5ml de sangue, utilizando EDTA 3% como anti-coagulante, foram devolvidos ao mesmo ninho de onde foram retirados (Fig. 2.2). Em todos os ninhos foram tomadas as coordenadas geográficas e, quando possível, anotados os anos em que tinham sido ocupados para reprodução. Para as análises apresentadas neste estudo foram utilizadas somente amostras de indivíduos não relacionados (i.e., uma amostra por ninho).

Tabela 2.1. Ninhos de tuiuiú amostrados na região do Pantanal.

Ninhos	Coordenadas geográficas	Amostras
EC01	19° 57' 24.3" S - 56° 19' 34.2" O	Sangue (2 F/02), Ossos (2N/03)
EC03	19° 53' 32.1" S - 56° 25' 58.8" O	Sangue (2 F/02; 2F/03)
EC06	19° 52' 14.8" S - 56° 17' 26.5" O	Ossos (1F)
EC08	19° 51' 03.1" S - 56° 16' 15.1" O	Sangue (1F), Penas: ninho (A/02), solo (A/03)
EC14	19° 52' 06.0" S - 56° 11' 12.4" O	Ossos E Penas (1F)
EC(03)	19° 57' 87.5" S - 56° 14' 89.4" O	Sangue (3F), Ossos (1F)
CD18	18° 55' 10.5" S - 56° 42' 07.5" O	Sangue (1F), Penas ninho (A)
CD19	18° 54' 46.7" S - 56° 41' 42.3" O	Sangue (1F), Penas: ninho/solo (A)
CD20	18° 56' 00.9" S - 56° 40' 34.0" O	Sangue (1F), Penas: solo (A)
CD28	18° 58' 41.9" S - 56° 40' 55.7" O	Penas solo (A)
CD29	18° 59' 02.1" S - 56° 40' 33.4" O	Penas solo (A)
CD30	18° 55' 00.0" S - 56° 43' 00.0" O	Penas solo (A)
CD31	18° 54' 35.0" S - 56° 42' 25.2" O	Penas solo (A)
CD32	18° 52' 54.5" S - 56° 43' 25.2" O	Sangue (2F), Penas e Ossos solo (1F)
NH34	18° 57' 54.8" S - 56° 37' 53.6" O	Penas solo (1A)
SP36	18° 45' 24.0" S - 56° 30' 55.6" O	Penas solo (A)
FB37	18° 48' 18.1" S - 56° 29' 24.9" O	Penas solo (A)
CD39	18° 51' 55.1" S - 56° 26' 24.1" O	Penas solo (A)
TP1	16° 44' 35.8" S - 56° 51' 30.4" O	Fresh Penas (2F)
TP2	16° 53' 58.2" S - 56° 50' 47.5" O	Sangue (3F)
TP3	16° 44' 33.9" S - 56° 51' 52.7" O	Sangue (3F)
TP4	16° 44' 24.2" S - 56° 29' 29.8" O	Sangue (4F), Penas solo (1F)
TP5	16° 43' 58.3" S - 56° 51' 45.5" O	Sangue (3F), Penas solo (A)
TP6	16° 38' 42.1" S - 56° 46' 12.7" O	Sangue (3F)
FI7	16° 23' 02.9" S - 56° 36' 21.4" O	Sangue (3F), Pena solo (A)
FI8	16° 24' 55.9" S - 56° 36' 33.0" O	Sangue (3F), Pena solo (A)
FI9	16° 23' 57.3" S - 56° 37' 46.0" O	Sangue (3F), Pena solo (A)
FI10	16° 25' 12.7" S - 56° 37' 38.7" O	Sangue (1F), Ossos (2F) Pena (A)
PA11	16° 30' 37.9" S - 56° 44' 59.5" O	Sangue (3F)
PA12	16° 30' 37.5" S - 56° 44' 59.1" O	Sangue (2F), Pena (A)
NA 2	16° 53' 57.7" S - 56° 50' 47.8" O	Pena solo (A)
NA 3	16° 43' 07.3" S - 56° 47' 15.7" O	Pena solo (A)
NA 8	16° 23' 30.9" S - 56° 37' 37.3" O	Pena solo (D)
NA 9	16° 21' 59.3" S - 56° 37' 16.8" O	Pena solo (A)
NA 10	16° 24' 56.7" S - 56° 37' 37.1" O	Pena solo (A)

Legenda: F = filhote, A = Adulto, D = desconhecido.

Amostras de indivíduos provenientes de áreas alagadas fora do Brasil foram solicitadas à museus dos Estados Unidos (n = 22) e ao zoológico da Audubon Society em New Orleans (n = 2). Sangue de indivíduos não relacionados foi gentilmente enviado pelos pesquisadores de Belize Ms. Omar Figueroa e Dr. Ken Meyer (University of Florida) (n = 6). Amostras da região dos Llanos da Venezuela foram obtidas com colaboração do pesquisador Dr. Gilberto Rios (UNELLEZ, Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Ezequiel Zamora) (n = 12). Amostras de sangue provenientes do zoológico e de Belize foram armazenadas em tampão (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 10 mM

NaCl, 2% SDS). Na tabela 2.2 pode-se obter as informações detalhadas sobre as fontes e datas da coleta dos indivíduos amostrados fora do Pantanal.



Figura 2.2. Coleta de amostras de sangue de filhotes de tuiuiús na região do Pantanal.



Figura 2.3. Mapa dos pontos de coleta e número de amostras de tuiuiu obtidas em cada localidade.

Tabela 2.2. Origem e data de coleta das amostras de tuiuiú provenientes de áreas alagadas fora do Brasil.

Origem^a	Identificação	Ano coleta	País
TCWC	9524 ^b	1973	EUA
UMMZ	136814	1931	
LSUMNS	B-51347	1956	
Dr. Meyer e Ms. Figueroa	#1 - #6	2004	Belize
AMNH	143723	1917	Nicarágua
NMNH	87485	1882	
CAS	ORN 13	1906	
CAS	ORN 14	1906	
FMNH	126937	1929	
UMMZ	133616	1951	Costa Rica
AMNH	102398	1909	
AMNH	749541	1911	
AMNH	749540	1911	
AMNH	96346	1911	
AMNH	126939	1911	
AMNH	31512	1911	
FMNH	370778	1966	Colômbia
Audubon Zoo	Lolita/Jezebel	2005 ^c	
Dr. Rios	Vz01 - Vz12	2006	Venezuela
NMNH	B12954	2000	Guiana
LSUMNS	B-51344	1964	
LSUMNS	B-51345	1981	
LSUMNS	B-51346	1962	
TCWC	6872	1964	
AMNH	237578	1927	Peru

^a Abreviações: American Museum of Natural History (AMNH), National Museum of Natural History (NMNH), Field Museum of Natural History (FMNH), University of Michigan Museum of Zoology (UMMZ), California Academy of Science (CAS), Texas Cooperative Wildlife Collection (TCWC) e Louisiana State University Museum of Natural Science (LSUMNS).

^b Indivíduo imaturo coletado no Texas (no limite sul da cidade de Houston) provavelmente originário de áreas reprodutivas do México (Arnold, 1977).

^c Indivíduos capturados juntos em 1998 na Venezuela (Alex Cole, comunicação pessoal) atualmente depositados no zoológico da Audubon Society em New Orleans.

2.2.2 Cabeça-seca

Amostras de sangue foram coletadas de filhotes de *M. americana* em oito colônias reprodutivas na região do Pantanal brasileiro (estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e em duas colônias da Geórgia (Chew Mill e Harris Neck). Amostras de DNA de outras seis colônias da Geórgia e da Florida (EUA) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ronald A. Van Den Bussche (Tab. 2.3, Fig. 2.4). No total foram analisadas amostras de 88 indivíduos.

Tabela 2.3. Colônias de cabeça-seca e número de indivíduos (n) provenientes do Pantanal e dos Estados Unidos.

Colônia	Sigla	Coordenadas geográficas	n
Porto da Fazenda	PF	16° 27' S - 56° 07' O	8
Tucum	TU	16° 26' S - 56° 03' O	8
Baía de Gaíva	BG	16° 39' S - 57° 10' O	7
Baía Bonita	BB	18° 40' S - 56° 26' O	6
Rio Vermelho	RV	19° 36' S - 56° 51' O	4
Fazenda Retirinho	FR	19° 50' S - 56° 02' O	7
Piquiri	PQ	17° 17' S - 56° 21' O	4
Fazenda Ipiranga	FI	16° 25' S - 56° 36' O	3
Total Pantanal			48
Chew Mill Pond	CM	32° 50' N - 82° 06' O	3
Harris Neck	HN	31° 38' N - 81° 17' O	7
Tamiami West	TW	25° 45' N - 80° 32' O	6
Saint Simon	SS	31° 16' N - 81° 21' O	7
Dee Dot	DD	30° 12' N - 81° 27' O	4
Pelican Island	PI	27° 48' N - 80° 26' O	7
Heard's Pond	HP	30° 53' N - 83° 55' O	5
Blackwater	BW	30° 41' N - 83° 37' O	1
Total EUA			40

Na região do Pantanal, os filhotes foram capturados com o uso de equipamentos de alpinismo e após o manuseio foram devolvidos ao mesmo ninho de onde foram retirados (Fig. 2.5). Cerca de 0.5ml de sangue foi coletado utilizando EDTA 3% como coagulante. Após centrifugação, o plasma e as hemácias foram congelados separadamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -20°C para posterior utilização. Devido à formação das colônias em áreas alagadas para minimizar o acesso de predadores, as amostras coletadas nas colônias da Geórgia exigiu o uso de barcos e escadas de alumínio para o acesso aos ninhos (Fig. 2.5). Aproximadamente 0.2ml de sangue dos filhotes coletados nas colônias reprodutivas norte americanas foi armazenado em 1ml de tampão de lise (100 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA, 1% SDS).

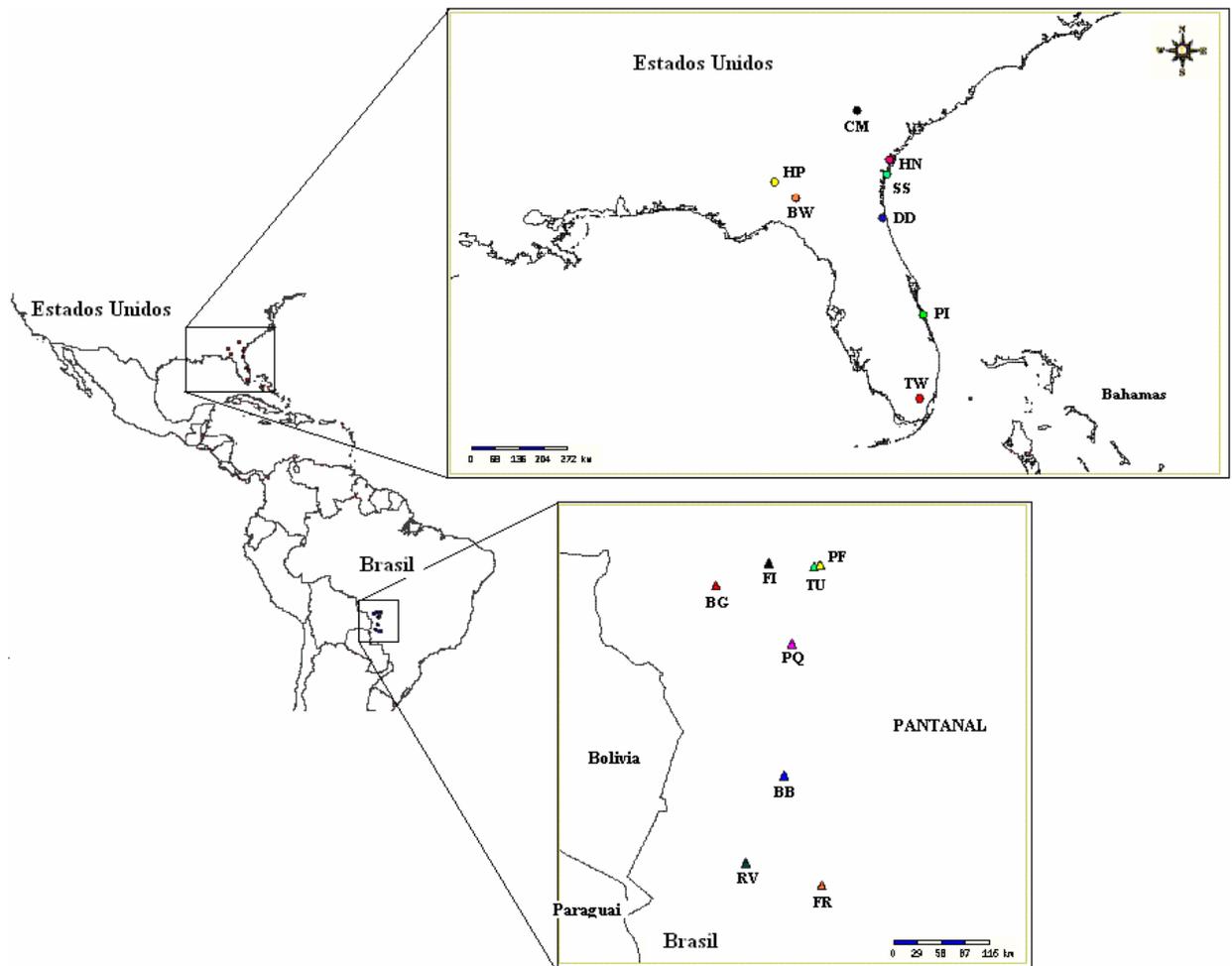


Figura 2.4. Mapa das colônias de cabeça-seca amostradas no Pantanal brasileiro e nos estados da Geórgia e Flórida nos EUA.

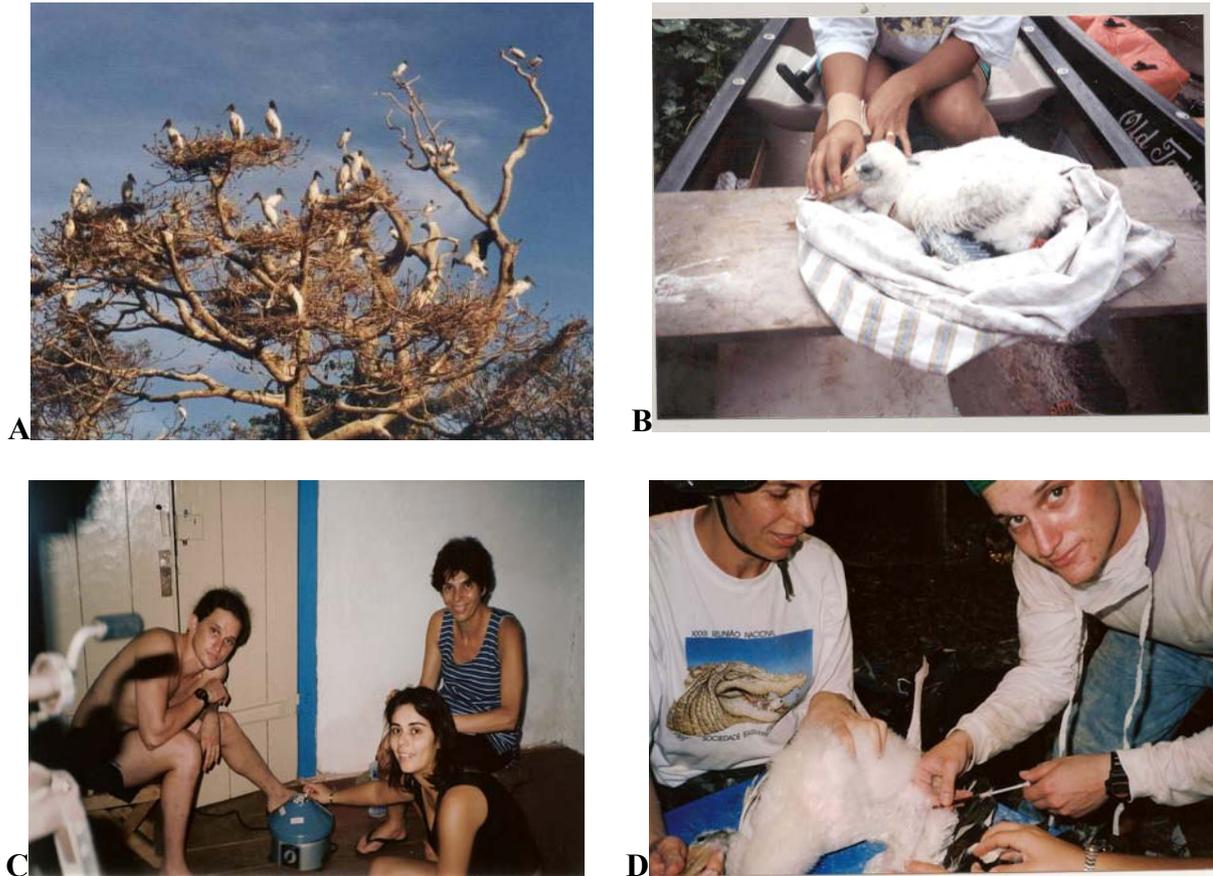


Figura 2.5. Fotos da coleta e processamento do material das colônias de cabeça-seca no Pantanal (A, C e D) e nos EUA (B).

2.3. Extração de DNA

2.3.1 Amostras de sangue

O DNA genômico foi extraído do sangue dos filhotes de tuiuiú e cabeça-seca coletados no Pantanal utilizando o protocolo de digestão com Proteinase-k seguida de isolamento do DNA com Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico e precipitação com Etanol (Sambrook *et al.*, 1989). Cerca de 20 μ l de sangue foi incubado à 55°C por 12-16 horas com 200 μ l de tampão TNE (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, EDTA 6.3mM pH 7.5) e 10 μ l de Proteínase k (10mg/ml). Após o período de incubação, seguiu-se a extração que foi realizada em três etapas. Primeiramente adicionou-se 230 μ l de Fenol e a mistura foi agitada suavemente por 10 min. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 11.988g por 10 min à temperatura ambiente. A fase superior da solução foi transferida para um tubo de

microcentrífuga de 1.5ml estéril. Os passos descritos acima foram repetidos nas etapas seguintes adicionando-se 230µl de Fenol-Clorofórmio (1:1) e 230µl de Clorofórmio-Alcool Isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado utilizando Acetato de Sódio (1M) na proporção de 10% do volume final e Etanol absoluto gelado na proporção de 2.5 vezes o volume final extraído. Após secagem, as amostras foram diluídas em água deionizada estéril e quantificadas em espectrofotômetro (260nm) ou em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. As amostras de DNA foram diluídas na concentração de 40ng/µl para utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

Parte das amostras de sangue coletadas dos filhotes nas colônias reprodutivas de cabeça-seca nos EUA foram extraídas utilizando o método das diatomáceas (MUD) (Davis *et al.*, 2001). Os reagentes e materiais necessários para a extração incluíram: Diatomaceous Earth (Sigma), GuSCN (Guanidinium Thiocyanate, Amresco ou Sigma), Triton X-100, 0.2M EDTA pH 8.0, 1M Tris-HCl pH 6.4, Etanol 70%, tubos falcon de 50ml e tubos de microcentrífuga de 1.5ml. A preparação da solução com diatomáceas foi feita através da adição de 5g de Diatomaceous Earth à 10ml de água deionizada em um tubo falcon de 50ml. Após a adição das diatomáceas 40ml de água deionizada foi acrescentado ao tubo que foi fechado, agitado vigorosamente e permaneceu em descanso por 3 horas. Após a decantação das diatomáceas, a fase líquida superior foi removida e adicionou-se mais 50ml de água deionizada. A mistura foi agitada novamente e permaneceu em descanso por mais 2 horas. A fase líquida superior foi novamente removida e adicionou-se água em volume igual ao de diatomáceas hidratadas obtidas. Antes da utilização para extração de DNA esta solução de diatomáceas foi vigorosamente agitada em vórtex. O tampão de extração combinou 24g de GuSCN, 18ml de água e 2ml de 1M Tris-HCl pH 6.4. A solução foi aquecida à 60°C para dissolver o GuSCN e acrescentada de 4.4ml de 0.2M EDTA pH 8.0 e 0.5ml de Triton X-100 e invertida para completa mistura dos reagentes. Cerca de 150µl de sangue foi submetido a uma pré-digestão com 400µl de THE (Tris High EDTA; 10mM Tris, 100mM EDTA), 2-3µl de 20% SDS, 10µl de 10ng/ml de Proteinase-k e incubado à 55°C por 10-12 horas. Antes de se iniciar a extração, 5µl de RNase foi adicionada à pré-digestão e a mistura incubada novamente à 55°C por no mínimo 3 horas. À 200µl do material pré-digerido foi adicionado 800µl do tampão de extração e 75µl de solução de diatomáceas. A mistura foi incubada 55°C por pelo menos 15 minutos, vortexada rapidamente e centrifugada 12.000g por 10 minutos para a completa decantação das diatomáceas. Após decantação o sobrenadante foi descartado e cerca de 1ml da solução de Etanol 70% foi adicionado e vortexado

rapidamente. A solução foi centrifugada por 5 segundos à 12.000g e o sobrenadante descartado. Os passos de adição do etanol, mistura, centrifugação e descarte do sobrenadante foram repetidos novamente. Após secagem do precipitado, este foi re-suspendido em 125µl de TLE (Tris Low EDTA; 10mM Tris; 0,1mM EDTA) e incubado 55°C por pelo menos 15 minutos. A mistura foi vortexada e centrifugada à 12.000g por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e utilizado como fonte de DNA nas PCRs.

2.3.2 Amostras de penas

As extrações de DNA das penas secas foram feitas através da aplicação de um protocolo de extração Fenol/Clorofórmio modificado. Após a limpeza da ponta das penas secas com algodão embebido em álcool 70%, cerca de 1cm (aproximadamente 150mg) da parte que fica inserida na pele (incluindo o coágulo de sangue encontrado na base da pena) foi picada em pedaços pequenos com uma tesoura e armazenada em tubos de microcentrífuga de 1.5ml estéreis. Foram adicionados 500µl de tampão de extração TNE, 30µl de Proteinase-k (10mg/ml) e 8µl de SDS 25% e a mistura foi incubada à 37°C em banho-maria durante sete dias. Todos os dias foram adicionados 20µl Proteinase-k e os tubos submetidos a agitação em agitador orbital antes de retornar novamente ao banho-maria. No oitavo dia o DNA foi extraído pelo método convencional de Fenol/Clorofórmio descrito acima. O material obtido foi re-suspendido em 100µl de água destilada estéril e a concentração do DNA foi estimada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.3.3 Amostras de material de museu

O DNA das amostras de museu foi extraído utilizando o kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo indicado para “Purification of Total DNA from Animal Tissues” seguindo as modificações sugeridas por Mundy *et al.* (1997) e Carlos Fernandes (Cardiff University, comunicação pessoal) para aumento do rendimento. Essas modificações incluíam: 1. após a adição de etanol e antes de transferir o material para as colunas, os tubos foram mantidos em freezer -20°C por pelo menos 1 hora; 2. o tampão AE foi aquecido à 70°C antes da eluição do material da coluna; 3. a eluição foi feita utilizando 50-100µl de tampão AE e não 200µl como sugerido no protocolo.

2.4 Seqüenciamentos e genotipagens

2.4.1 Amplificação e seqüenciamento de uma região variável do DNAmít em tuiuiús e cabeças-secas

Fragmentos de 549 (tuiuiú) ou 464 (cabeça-seca) pares de bases (pb) incluindo parte do gene ND6 (subunidade 6 da NADH desidrogenase), o RNA transportador da glutamina (RNAt Glu) e parte do primeiro domínio da região controladora do DNA mitocondrial (DNAmít) foram amplificados e seqüenciados utilizando os primers WS-L36 e WS-H601 desenhados a partir da seqüência completa da região controladora da cabeça-seca (Lopes, 2002) (Tab. 2.4). Esta região esta referida no texto como “CRI”. As amostras de cabeças-secas coletadas nos EUA foram amplificadas e seqüenciadas no Savanna River Ecology Laboratory (University of Georgia). Quatro pares adicionais de primers foram utilizados para amplificação e seqüenciamento do fragmento CRI de tuiuiús no DNA extraído dos tecidos de museu e penas (P1H, P2L, P3H, P4L, P5H, JMCR_L2, JMCR_H3 e P6L) (Tab. 2.4). Detalhes sobre a posição destes primers são dados na figura 3.2 do capítulo 3.

As PCRs para amplificação do fragmento CRI foram feitas utilizando um volume final de 50 ou 25µl dependendo do modo de purificação. Aproximadamente 100ng de DNA, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 0.25mM dNTPs, 0.5mM de cada primer, 2.5 - 4mg/ml de BSA (bovine serum albumin), 2.5 - 3.5mM MgCl₂ e 1U *Taq* DNA polimerase (Promega ou Biotools). As concentrações de BSA e MgCl₂ foram modificadas dependendo do nível de degradação do DNA. Para o DNA proveniente do material de museu utilizou-se tampão da *Taq* na concentração 1.5 vezes na reação. O programa utilizado na amplificação foi o seguinte: 5 min a 94°C (desnaturação inicial); cinco ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a temperatura de anelamento inicial (mais alta) e 20 seg a 72°C; 21 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a temperatura de anelamento inicial menos 0.5°C por ciclo (“touchdown”) e 30 seg a 72°C; 10 - 20 ciclos 20 seg a 94°C, 20 seg a temperatura de anelamento final (mais baixa) e 30 seg a 72°C; 10 min a 72°C (extensão final) (ver Tab. 2.4 para detalhes sobre as temperaturas de anelamento iniciais utilizadas para cada primer). Um microlitro do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para checagem do rendimento.

Após amplificação os produtos com volume final de 50µl foram purificados utilizando colunas Microcon (Millipore Corp.) seguindo o procedimento indicado pelo fabricante. As

amplificações com volume final de 25µl foram purificadas adicionando-se à cada 8µl de produto, 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Amersham Pharmacia Biotech) e 10U de Exo I (Exonuclease I, Amersham Pharmacia Biotech). Essa mistura foi incubada a 37°C, por 1 hora e a 80°C por 10 minutos. Após purificação os produtos foram diretamente seqüenciados utilizando Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer) seguindo as instruções do fabricante. Os seqüenciamentos foram feitos utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3730 ou 3700.

Tabela 2.4. Seqüências dos primers e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação e seqüenciamento do fragmento CRI nas amostras de tuiuiús e cabeças-secas.

Primer	Seqüências	Temp. de anelamento
WS-L36	5'-TTCCTCCCAAATAACCATA-3'	WSL-36 + WSH601 = 57° C
WS-H601	5'-CCTTGGCTGTGTGTACG-3'	
P1H ^a	5'-TAAGCCATCCCCATATTGT-3'	P1H + WS-L36 = 55° C
P2L ^a	5'-CAACACTAAACCAACTAC-3'	P2L + P3H = 51° C
P3H ^a	5'-TTCAGGCAGTAGACATT-3'	P4L + P5H = 51° C
P4L ^a	5'-TTCCCATTTGGCTTTTCT-3'	
P5H ^a	5'-GAATGTAATGTATGGGGT-3'	
JMCR_L2 ^a	5'-TTACCCCATACATTACATTC-3'	JMCR_L2 + JMCR_H3 = 53° C
JMCR_H3 ^a	5'-AGGTACTGTGATTATTCTATT-3'	
P6L ^a	5'-AGATTAACAATTCAATGATC-3'	P6L + WS-H601 = 51° C

^a Primers utilizados para amplificação e seqüenciamento do DNA extraído das penas e tecidos de museu de *J. mycteria*.

2.4.2 Amplificação e seqüenciamento de uma região mais conservada do DNAmít em tuiuiús

Os primers L5758 (5'-GGNGGNTGAATRGGNYTNAAYCARAC-3') e H6681 (5'-GGTATAGGGTGCCRATRTCTTTGTG-3') descritos por Sorenson *et al.* (1999) foram utilizados na amplificação e seqüenciamento de 822pb de uma região menos variável do DNAmít de tuiuiús. A região estudada incluiu parte do gene ND2 (subunidade 2 da NADH desidrogenase), seqüências completas de cinco RNAs transportadores (RNAt Trp, RNAt Ala, RNAt Asn, RNAt Cys e RNAt Tyr) e parte da citocromo oxidase subunidade I (COI). As PCRs foram feitas no volume final de 50µl de reação contendo aproximadamente 100ng

de DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.25 mM dNTPs, 0.5 mM de cada primer, 3.0mg/ml de BSA, 3.0 mM MgCl₂ e 2U *Taq* DNA polimerase (Promega). O programa utilizado na amplificação foi o seguinte: 5 min a 94°C (desnaturação inicial); cinco ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a 55°C e 20 seg a 72°C; 21 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a 55°C menos 0.5°C por ciclo (“touchdown”) e 30 seg a 72°C; 10 - 20 ciclos 20 seg a 94°C, 20 seg a 44.5°C e 30 seg a 72°C; 10 min a 72°C (extensão final). Os produtos foram purificados utilizando colunas Microcon (Millipore Corp.) e diretamente seqüenciados utilizando Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer) seguindo as instruções do fabricante. Os seqüenciamentos foram feitos utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3730.

2.4.3 Genotipagens dos locos de microssatélites heterólogos em tuiuiús

Dezesseis locos de microssatélites prospectados para cabeça-seca (Van Den Bussche *et al.*, 1999; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003; Tomasulo-Seccomandi, 2004) foram testados para checagem de polimorfismo em amostras de tuiuiús coletadas na região do Pantanal. Para os testes, seguiram-se as condições de PCR sugeridas em Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003) variando-se as temperaturas de anelamento para cada loco como indicada nos artigos originais. Em 10µl de volume final de reação foi adicionado aproximadamente 50ng de DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.25 mM dNTPs, 0.5 mM de cada primer, 2.5 mg/ml de BSA, 3.0 mM MgCl₂ e 0.5 U *Taq* DNA polimerase (Promega). As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguidas de 5 ciclos de 94°C – 20 seg, temperatura de anelamento mais alta (ver tabela 3.2 para maiores detalhes) – 20 seg e 72°C – 20 seg; 21 ciclos 94°C – 20 seg, temperatura de anelamento mais alta (baixando 0.5°C por ciclo) – 20seg e 72°C – 20 seg; 10 ciclos de 94°C – 20 seg, temperatura de anelamento mais baixa – 20 seg, 72°C – 30 seg, e extensão final 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados utilizando o seqüenciador automático ABI 377 e o programa Genotyper (PE Applied Biosystems).

2.5 Análise de dados

2.5.1 DNA mitocondrial

As seqüências foram manualmente alinhadas e visualmente verificadas utilizando os programas Codon Code Aligner 1.5.2 (CodonCode Corporation) e/ou Bioedit (Hall, 1999). As estimativas de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) (Nei, 1987) foram computadas utilizando o programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2000).

A distribuição espacial da diversidade genética gerada para as seqüências de DNAmít foi investigada utilizando estimativas de F_{st} par-a-par e análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) no programa Arlequin. Os índices de fixação da AMOVA, que medem a proporção de variação genética dentro das populações (Φ_{st}), entre populações dentro de grupos (Φ_{sc}) e entre os grupos (Φ_{ct}) foram aplicados para testar a associação dos grupos/populações. Os agrupamentos que maximizam as porcentagens de variância entre os grupos e minimizam os valores entre populações dentro dos grupos provavelmente refletem a subdivisão populacional mais provável (Excoffier *et al.*, 2002). A significância destes parâmetros foi testada utilizando estatísticas de permutação não-paramétrica incorporadas no programa Arlequin.

Para a realização da Nested Clade Analysis (NCA) (Templeton *et al.*, 1995), uma rede de haplótipos foi utilizada na definição de uma série de agrupamentos que foram posteriormente empregados na análise da distribuição espacial da variabilidade genética (Templeton, 1998). A rede de haplótipos, que mostra a relação evolutiva entre os haplótipos, foi gerada utilizando o programa Tcs v.1.2 (Clement *et al.*, 2000). As informações sobre os agrupamentos, tamanho das amostras e a localização geográfica de cada clado foram testadas utilizando o teste exato de contingência aleatória do programa Geodis (Posada *et al.*, 2000). Para a realização dessas análises, as coordenadas geográficas de cada população são utilizadas para o cálculo de dois parâmetros principais: a distância do clado (D_c , mede a distribuição geográfica de determinado clado) e a distância do clado “aninhado” (D_n , mede como um clado esta geograficamente distribuído em relação aos outros clados no mesmo nível hierárquico). Valores de D_c e/ou D_n significativos implicam em rejeição da hipótese nula de “não associação geográfica entre os haplótipos” que são interpretados em termos biológicos utilizando a chave de inferência publicada por Templeton (2004).

A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“mismatch distribution”) foi utilizada na investigação da história demográfica das populações estudadas (Rogers & Harpending, 1992; Harpending *et al.*, 1993). Análises de “mismatch distribution” permitem discriminar entre populações que permaneceram estáveis ao longo do tempo e populações que sofreram expansão demográfica a partir de uma população fundadora pequena (Rogers & Harpending, 1992). Dados empíricos têm demonstrado que populações estáveis apresentam padrões de curvas multimodais que estão de acordo com o equilíbrio entre mutação (que tende a aumentar a variação da população) e deriva (que promove a perda de variação) (Rogers & Harpending, 1992). Por outro lado, populações que sofreram processo de expansão demográfica apresentarão padrão unimodal devido a taxa de acumulação de novas mutações ser mais alta que a perda da variação por deriva. As curvas observadas e esperadas da “mismatch distribution” foram obtidas utilizando os programas DnaSP v. 4.1 (Rozas *et al.*, 2003) ou o Arlequin. A soma do desvio dos quadrados (*SSD*) foi utilizada para verificar o desvio entre as curvas observadas e esperadas da “mismatch distribution” dentro do modelo de expansão populacional.

Os testes de neutralidade de F_s de Fu (Fu, 1997) e D^* e F^* de Fu e Li (1993) foram aplicados aos dados utilizando-se o programa DnaSP v. 4.1 (Rozas *et al.*, 2003). Quando a hipótese nula de neutralidade é rejeitada em favor de valores de F_s significativamente negativos ($P < 0.02$), os resultados podem estar indicando ocorrência de expansão populacional recente (Fu, 1997; Schneider & Excoffier, 1999). Os testes de neutralidade de D^* e F^* são mais sensíveis à seleção e, ao serem comparados aos valores de F_s , podem auxiliar na distinção entre expansão populacional e “background selection”. Valores de F_s significativos e D^* e F^* não significativos indicam expansão demográfica, enquanto que o reverso sugere que os efeitos da seleção seja mais pronunciados.

2.5.2 Microssatélites

As frequências alélicas foram calculadas para cada loco e população utilizando o programa Genepop 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). A diversidade genética foi estimada pelo número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) calculadas para cada loco e população utilizando o programa Cervus 2.0 (Marshall *et al.*, 1998). Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados utilizando o programa Arlequin. Para testar a independência entre os loci, o cálculo de desequilíbrio de ligação foi aplicado entre os pares de loci estudados. As relações genéticas entre pares de populações

foram estimadas utilizando o cálculo de distância genética de Nei (Nei *et al.*, 1983) e ilustradas em dendogramas utilizando os métodos UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal, 1973) e “Neighbor-Joining” (Saitou & Nei, 1987) gerados no programa Dispan (Ota, 1993). Estimativas de diferenciação populacional foram obtidas utilizando comparações de *Fst* par-a-par, obtidas no programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2002), e AMOVA (global e hierárquica), utilizando o programa Arlequin.

Genética e conservação dos tuiuiús (*Jabiru mycteria*) na região Neotropical

Introdução

As estratégias atuais para conservação e manejo das espécies ameaçadas estão focadas na preservação dos altos níveis de diversidade os quais podem ser avaliados através de estudos ecológicos e/ou genéticos (Pullin, 2002; Solé-Cava, 2001). A determinação da distribuição espacial da diversidade genética intra-específica permite inferir se as populações de uma espécie são similares geneticamente ou se estão isoladas ou fragmentadas (Haig, 1998). A identificação de populações pequenas e isoladas constitui-se num passo importante para a preservação de uma espécie porque estas unidades populacionais são as mais propensas a sofrerem perdas de variabilidade pelos efeitos da deriva genética e do endocruzamento (Avise, 1994; Friesen, 1997; Frankham *et al.*, 2002). A ocorrência de níveis altos ou moderados de fluxo gênico previne o isolamento entre populações, mantém o grau de variabilidade genética da espécie e evita os efeitos deletérios do endocruzamento.

A família Ciconiidae é composta por aves paludícolas de médio a grande porte que apresentam distribuição cosmopolita (Elliott, 1992). Sete dentre as 19 espécies pertencentes à família estão classificadas como ameaçadas na lista vermelha das espécies ameaçadas, divulgada em 2004 pela IUCN (The International Union for the Conservation of Nature Red List of Threatened Species). Apesar do status que teoricamente garante maior proteção às espécies listadas, todas as outras espécies estão indiretamente em perigo, visto o acelerado nível de degradação das áreas alagadas das quais essas aves dependem para o forrageamento e reprodução (Elliott, 1992). Na região Neotropical, a família Ciconiidae está representada por três espécies: *Jabiru mycteria*, conhecida popularmente como tuiuiú; *Ciconia maguari*, também conhecida como maguari e *Mycteria americana*, denominada popularmente como cabeça-seca. O tuiuiú é o único membro do gênero *Jabiru* na família Ciconiidae. Sua ocorrência é em áreas alagáveis desde o sul do México até o norte da Argentina (Hancock *et al.*, 1992). A espécie é considerada não-migratória e a ocorrência de três populações geograficamente distintas, na América Central, norte da América do Sul e no centro da América do Sul, proposta na década de setenta (Short, 1975; Blake, 1977), nunca foi refutada (Luthin, 1987; Wetlands International, 2002). O tuiuiú está listado no CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) dentro

do “Appendix I” e é considerado regionalmente ameaçado na América Central (Luthin, 1987; Elliott, 1992; Stotz *et al.*, 1996). Entre as principais ameaças está a degradação do habitat provocada principalmente pelo desenvolvimento de projetos agrícolas com subsequente manipulação do nível das águas (Luthin, 1987; González, 1993).

Os ecossistemas de áreas alagáveis estão entre os mais biodiversos e a importância internacional deste tipo de habitat se reflete em vários tratados inter-governamentais que visam sua proteção e manejo (por exemplo, The Ramsar Convention on Wetlands). Apesar dos esforços, quase 50% das áreas úmidas alagáveis foram destruídas no último século, principalmente devido ao crescente desenvolvimento urbano e agrícola (Shine & Klemm, 1999). Os padrões hidrológicos sazonais típicos das áreas alagáveis estão intimamente relacionados à biologia de várias espécies de aves aquáticas cujos ciclos reprodutivos são regulados pelos níveis de água mais apropriados para o forrageamento (Ogden *et al.*, 1980; Frederick & Collopy, 1989; Frederick, 2002; entre outros). Populações de aves aquáticas são importantes bioindicadoras da riqueza e diversidade destes ambientes. A investigação do padrão de seleção de habitat dos tuiuiús em Belize, demonstrou que a espécie não apresenta escolha aleatória do habitat, característica que a elege como bioindicadora (Figuroa, 2005). Por ser uma ave de grande porte, facilmente distinguível em sua área de ocorrência, o tuiuiú desperta o interesse de observadores de aves e turistas. A espécie é atualmente o símbolo do Pantanal e de Belize, e possui portanto, um grande potencial para ser usada com sucesso como “espécie-bandeira” em campanhas de conservação de áreas inundáveis, beneficiando assim, outras espécies da comunidade e o ecossistema como um todo.

Censos populacionais recentes estimaram um número total de somente 400 indivíduos (Paredes, 2004) ou 70-80 casais de tuiuiús (Figuroa, 2005) na América Central. Para a América do Sul, a estimativa mais recente data de 2002 e indica a existência de 10.000 a 25.000 indivíduos habitando áreas inundáveis tanto no norte como no centro do continente (Wetlands International, 2002). A baixa densidade populacional registrada na América Central torna esta população mais vulnerável ao declínio demográfico causado pela destruição do habitat. O intenso declínio registrado na população da América Central no último século motivou algumas medidas protecionistas, como por exemplo, a proteção da espécie na legislação interna de Belize desde 1973 (Barnhill *et al.*, 2005) e a criação de uma área de conservação de 290.000 hectares no México (Bildstein *et al.*, 1991). De acordo com Figuroa (2005), a área de habitat crítico para o forrageamento e reprodução de tuiuiús na

América Central compreende somente 10.475 km², sendo que 88% destas áreas se encontram distribuídas em Belize, Honduras e Nicarágua. Medidas preservacionistas precisam ser tomadas com urgência pois a espécie já se encontra extinta no Panamá (último indivíduo foi registrado em 1927) (Wetmore, 1965) e vem desaparecendo na Costa Rica (Poveda, 2003).

O continente sul americano possui o maior número de área alagáveis contínuas do mundo (cerca de 1.000.000 km²) (Neiff, 2001). Não há registros diretos de declínio das populações sul americanas de tuiuiús, porém, apesar da maior parte das áreas alagáveis do continente ainda se encontrar bastante preservada, projetos desenvolvimentistas representam uma séria ameaça à integridade desses ecossistemas (González, 1993, Harris *et al.*, 2005). Nota-se também o fato de que a região do Pantanal, localizado no centro da América do Sul, abriga a maior e mais estável população reprodutiva da espécie (Luthin, 1987).

Luthin (1987) destaca a importância da realização de estudos incluindo as três populações de tuiuiús para o desenvolvimento de uma estratégia global de preservação da espécie. Com este intuito, realizamos um estudo genético pioneiro utilizando marcadores moleculares mitocondriais (549 pares de bases do domínio I da região controladora e 822 pares de bases do gene ND2) e nucleares (quatro loci de microssatélites heterólogos) em uma ampla amostragem incluindo indivíduos provenientes das três populações existentes ($n = 72$). Os objetivos específicos do presente estudo foram: 1. Estimar e comparar os níveis de variabilidade genética para amostras contemporâneas (2000-2006) e históricas (1882-1981) de cada localidades separadamente utilizando a região controladora do DNA mitocondrial. Espera-se, baseado no menor tamanho histórico da população da América Central, encontrar uma variabilidade mais baixa nesta região quando comparada às demais áreas amostradas, tanto para amostras históricas quanto recentes; 2. Investigar alterações nos níveis de variação genética ao longo do tempo utilizando as amostras históricas disponíveis em museus (1882-1966) e contemporâneas coletadas na América Central e norte da América do Sul. Devido à acentuada redução populacional ocorrida na América Central, registros genéticos desse declínio demográfico são previstos para essa população. No entanto, nas populações sul americanas, cujo histórico não demonstra esse tipo de redução drástica, não são previstas reduções da variabilidade genética; 3. Acessar o nível de diferenciação genética entre as regiões amostradas, as quais cobrem praticamente toda a área de distribuição da espécie. Baseando-se nas observações feitas por Luthin (1987), pretende-se testar a hipótese da existência de três populações geneticamente distintas:

América Central, norte da América do Sul e centro da América do Sul. A comparação dos níveis de estruturação passado e atual também será realizada para verificar os possíveis efeitos de fragmentação do habitat na estruturação genética dos tuiuiús.

Material e Métodos

Amostras e extração de DNA

No total foram obtidas amostras de 72 indivíduos para a realização desse estudo. As amostras de sangue dos filhotes de tuiuiús foram coletadas em 21 ninhos, na região do Pantanal, durante as estações reprodutivas de 2002 e 2003 (Fig. 3.1). Aproximadamente 0.5ml de sangue foram coletados de cada filhote, utilizando-se EDTA 3% como anti-coagulante. Penas e ossos de filhotes mortos assim como penas de adultos foram coletadas dentro ou embaixo dos ninhos (n = 9). Somente uma amostra/ninho foi utilizada nas análises.

Amostras dos indivíduos provenientes de outros países foram solicitadas a museus dos Estados Unidos (n = 22) e ao zoológico da Audubon Society em New Orleans (n = 2). Sangue e penas de indivíduos não relacionados foram gentilmente enviados por pesquisadores que as coletaram no campo em Belize (n = 6) e na região dos Llanos da Venezuela (n = 12). Amostras de sangue provenientes do zoológico e de Belize foram armazenadas em tampão (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS). No total, foram obtidas 15 amostras provenientes da população da América Central (México - 1, Belize - 8, Nicarágua - 1 e Costa Rica - 5) e 27 originárias das áreas alagáveis sul americanas (Colômbia - 7, Venezuela - 14, Guiana - 1, Peru - 5) (Fig. 3.1). Informação detalhada sobre as fontes e datas de coleta de indivíduos amostrados fora do Pantanal pode ser encontrada no Apêndice.

O DNA genômico foi extraído do sangue e das penas através da digestão com Proteinase-k, e isolamento do DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação com etanol (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA das amostras de museu foi extraído utilizando-se o kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo indicado, e conforme modificações sugeridas por Mundy *et al.* (1997) e Carlos Fernandes (Cardiff University, comunicação pessoal) para aumento do rendimento. A concentração do DNA foi estimada em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio.

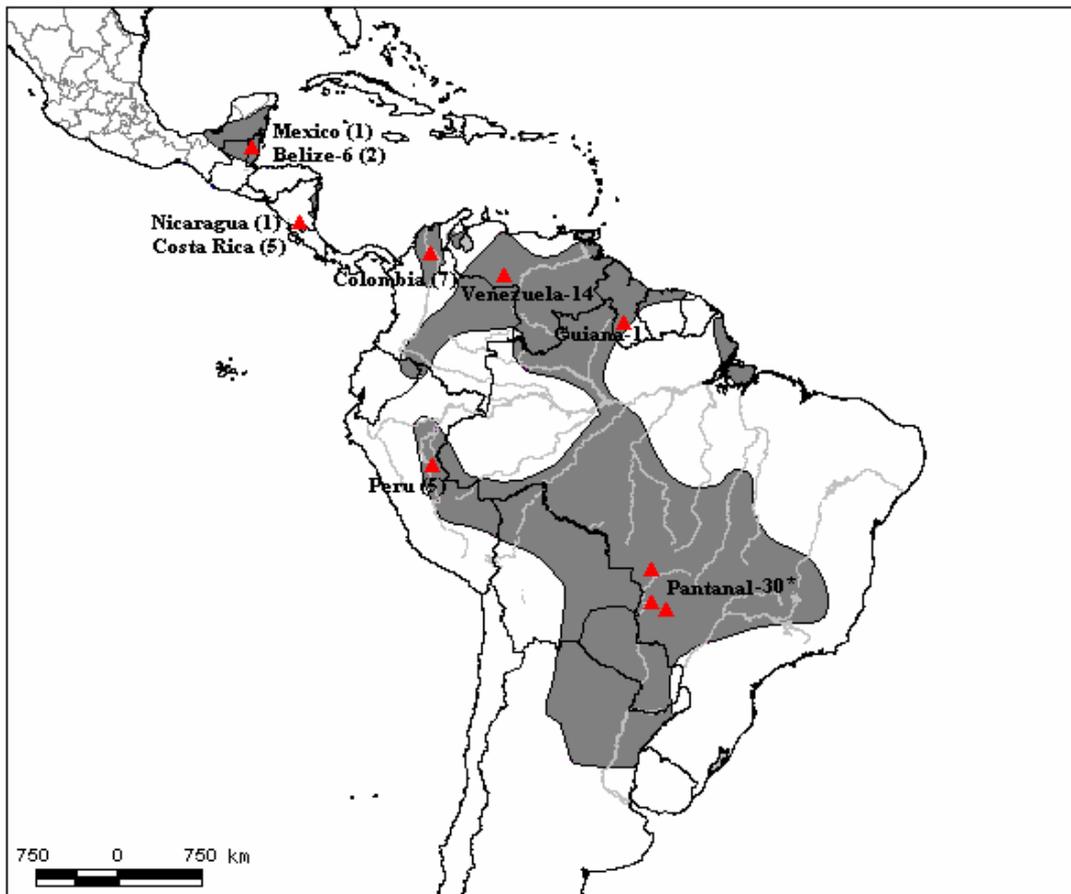


Figura 3.1. Mapa da área de distribuição dos tuiuiús e as localidades amostradas nesse estudo. O número de indivíduos amostrados nos museus está indicado entre parênteses e as amostras coletadas contemporaneamente encontram-se fora dos parênteses. * Na região do Pantanal foram amostradas três localidades: Miranda e Nhecolândia (MS) e Transpantaneira (MT) (modificado de: www.natureserve.org/getData/animalData.jsp).

Sequenciamento e genotipagem

Duas regiões do DNA mitocondrial (DNAmít) foram analisadas nesse estudo, uma região mais variável que foi referida ao longo do texto como “CRI”, e uma região mais conservada que foi denominada “ND2”.

O fragmento CRI analisado apresentou 549 pares de bases (pb) incluindo parte do gene ND6 (subunidade 6 da NADH desidrogenase), o RNA transportador da glutamina (RNAt Glu) e parte do primeiro domínio da região controladora do DNAmít. O fragmento CRI foi amplificado e seqüenciado para amostras de DNA extraído de sangue utilizando os primers WS-L36 e WS-H601 desenhados a partir das seqüências da região controladora de

cabeça-seca (Lopes, 2002) (Fig. 3.2). As seqüências do fragmento CRI obtidas para 19 indivíduos amostrados no Pantanal foram utilizadas no desenho de oito primers para posições internas empregados na amplificação e seqüenciamento das amostras de DNA extraído dos tecidos de museu e penas (Fig. 3.2, Tab. 3.1).

Os primers L5758 e H6681 descritos por Sorenson *et al.* (1999) foram utilizados na amplificação e seqüenciamento de 822pb de uma região menos variável (ND2) do DNAmít incluindo metade do gene ND2 (subunidade 2 da NADH desidrogenase), seqüências completas de cinco RNAs transportadores (RNAt Trp, RNAt Ala, RNAt Asn, RNAt Cys e RNAt Tyr) e parte da citocromo oxidase subunidade I (COI).

As reações em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação de ambas as regiões do DNAmít, foram feitas utilizando um volume final de 50µl de reação contendo aproximadamente 100ng de DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.25 mM dNTPs, 0.5 mM de cada primer, 2.5 - 4 mg/ml de BSA (bovine serum albumin), 2.5 - 3.5 mM MgCl₂ e 1U *Taq* DNA polimerase (Promega). As concentrações de BSA e MgCl₂ foram variáveis dependendo do nível de degradação do DNA. Para as amostras de DNA proveniente do material de museu foi utilizado tampão da *Taq* na diluição 1.5 vezes. O programa utilizado na amplificação foi o seguinte: 5 min a 94°C (desnaturação inicial); cinco ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a temperatura de anelamento inicial (mais alta) e 20 seg a 72°C; 21 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a temperatura de anelamento inicial menos 0.5°C por ciclo (“touchdown”) e 30 seg a 72°C; 10 - 20 ciclos 20 seg a 94°C, 20 seg a temperatura de anelamento final (mais baixa) e 30 seg a 72°C; 10 min a 72°C (extensão final) (ver Fig. 3.2 para detalhes sobre as temperaturas de anelamento iniciais utilizadas para cada primer). Um microlitro do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para checagem do rendimento. Os produtos foram purificados utilizando colunas Microcon (Millipore Corp.) e diretamente seqüenciados utilizando Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer) segundo instruções do fabricante. Os seqüenciamentos foram feitos utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3730 ou 3700.

Amplificações dos fragmentos de DNAmít feitas com o DNA molde extraído das peças de museu seguiram as seguintes precauções para evitar problemas de contaminação: 1. A extração de DNA foi feita em uma sala separada nunca antes utilizada para extração de DNA contemporâneo; 2. Extrações “brancas” (i.e., feitas sem adição de tecido) foram

incluídas em todos os conjuntos de extrações; 3. Os resultados das extrações “brancas” e controles negativos (PCR com água) foram utilizados em cada conjunto de amplificação.

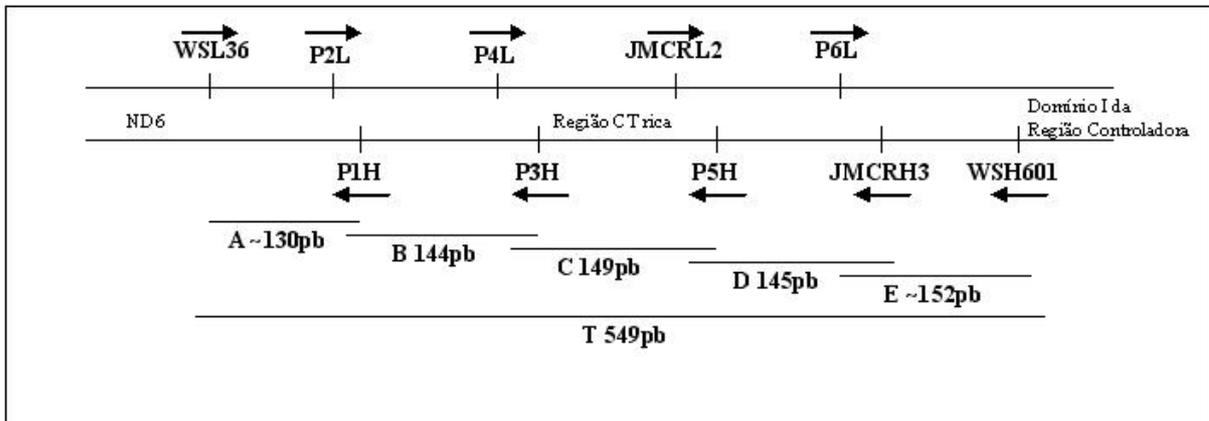


Figura 3.2. Esquema da região de anelamento dos primers utilizados para amplificação e seqüenciamento do fragmento CRI em tuiuiú. As temperaturas de anelamento iniciais utilizadas nas PCRs foram: 55°C fragmento A; 51°C fragmentos B, C e E; 53°C fragmento D; e 57°C fragmento T. As seqüências dos primers estão indicadas na tabela 4.1.

Tabela 3.1. Seqüências dos primers utilizados nas amplificações e seqüenciamentos do fragmento CRI em tuiuiú.

Primer	Seqüências
WS-L36	5'-TTCCTCCCAAATAACCATA-3'
WS-H601	5'-CCTTGGCTGTGTGTACG-3'
P1H	5'-TAAGCCATCCCCATATTGT-3'
P2L	5'-CAACACTAAACCAACTAC-3'
P3H	5'-TTCAGGCAGTAGACATT-3'
P4L	5'-TTCCCATTTGGCTTTTCT-3'
P5H	5'-GAATGTAATGTATGGGGT-3'
JMCR_L2	5'-TTACCCCATACATTACATTC-3'
JMCR_H3	5'-AGGTACTGTGATTATTCTATT-3'
P6L	5'-AGATTAACAATTCAATGATC-3'

Dezesseis loci de microssatélites isolados para cabeça-seca (Van Den Bussche *et al.*, 1999; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003; Tomasulo-Seccomandi, 2004) foram testados nas amostras de tuiuiús coletadas na região do Pantanal. Todos os loci foram amplificados seguindo-se as condições de PCR sugeridas em Tomasulo-Seccomandi *et al.* (2003), variando-se as temperaturas de anelamento como indicadas nos artigos originais. A identificação dos genótipos do loco WS04 foi feita pela primeira vez utilizando

incorporação da fluorescência. Os produtos de PCR foram analisados utilizando o seqüenciador automático ABI 377 e o programa Genotyper (PE Applied Biosystems).

As amostras foram agrupadas geograficamente nas análises dos três marcadores e temporalmente nas análises do fragmento CRI (Tab. 2). Considerou-se as amostras coletadas no México, Belize, Nicarágua e Costa Rica como provenientes da população da América Central (AC). Amostras originárias das áreas alagáveis da Colômbia, Venezuela e Guiana foram consideradas oriundas da população do norte da América do Sul (NAS). Amostras coletadas no Peru (PER) e no Pantanal (PAN) foram consideradas unidades independentes.

Tabela 3.2. Separação geográfica, temporal e número das amostras coletadas (n_c) e utilizadas (n_u) para a realização das análises com os diferentes marcadores moleculares.

Estimativas	População	Regiões	n_c	Marcador
Históricas	América Central	México	1	CRI ($n_u = 21$)
		Belize	2	
		Costa Rica	5	
		Nicarágua	1	
	América do Sul	Colômbia	7	
		Peru	5	
Contemporâneas	América Central	Belize	6	CRI ($n_u = 37$)
	América do Sul	Venezuela	14	ND2 ($n_u = 18$)
		Guiana	1	Microsatélites ($n_u = 50$)
		Pantanal	30	

Análises estatísticas

DNA mitocondrial

As seqüências foram manualmente alinhadas e visualmente verificadas utilizando o programa Bioedit (Hall, 1999). Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram calculadas utilizando o programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2000). Uma rede de haplótipos que ilustra as interações filogenéticas entre os haplótipos observados foi gerada no programa Tcs (Clement *et al.*, 2000) para amostras recentes e históricas do fragmento CRI e somente para as amostras recentes investigadas na região ND2.

A distribuição da variação genética dentre e entre populações foi investigada através da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) baseando-se nas frequências haplotípicas e nas diferenças par-a-par entre as seqüências (estatística- Φ) e foi testada utilizando 10.000 permutações. A análise hierárquica foi feita estimando-se os índices de fixação Φ_{st} , Φ_{ct} e Φ_{sc} para se avaliar a proporção de variação dentro das populações, entre os grupos e entre populações dentro de grupos, respectivamente. Análises de F_{st} par-a-par foram calculadas baseando-se somente nas frequências haplotípicas.

Os testes de neutralidade de F_s de Fu (Fu, 1997) e D^* e F^* de Fu e Li (1993) foram aplicados aos dados utilizando-se o programa DnaSP v. 4.1 (Rozas *et al.*, 2003). Quando a hipótese nula de neutralidade é rejeitada em favor de valores de F_s significativamente negativos ($P < 0.02$), os resultados podem estar indicando ocorrência de expansão populacional recente (Fu, 1997; Schneider & Excoffier, 1999). Os testes de neutralidade de D^* e F^* são mais sensíveis à seleção e, ao serem comparados aos valores de F_s , podem auxiliar na distinção entre expansão populacional e “background selection”. Valores de F_s significativos e D^* e F^* não significativos indicam expansão demográfica, enquanto que o reverso sugere que os efeitos da seleção seja mais pronunciados. A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“mismatch distribution”) foi calculada como um teste adicional para inferências de expansão populacional (Rogers & Harpending, 1992) utilizando o programa DnaSP. Populações estáveis geralmente apresentam gráficos com padrões de curvas bi- ou multi-modais, enquanto que, curvas unimodais são freqüentemente observadas em populações que sofreram expansão demográfica recente (Rogers & Harpending, 1992; Harpending, 1994). A soma do desvio dos quadrados (SSD), que verifica a existência de desvio entre as curvas observadas e esperadas da “mismatch distribution” dentro do modelo de expansão populacional, foi calculada usando o programa Arlequin.

Microsatélites

O número médio de alelos por loco (A), e a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram calculados para cada loco e população utilizando o programa Cervus 2.0 (Marshall *et al.*, 1998). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aplicado para cada loco utilizando o programa Arlequin. O programa Genepop 3.4 (Raymond & Rousset, 1995) foi utilizado no cálculo de desequilíbrio de ligação e frequências alélicas. Estimativas dos

valores de *Fst* par-a-par foram calculadas para as populações utilizando o programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2002). Estimativas de AMOVA global e hierárquica foram feitas no Arlequin utilizando os mesmos agrupamentos feitos para as análises de DNAmIt.

Resultados

Uma das amostras dos dois indivíduos provenientes do zoológico da Audubon foi excluída das análises subseqüentes porque ambos indivíduos apresentavam seqüências idênticas nos fragmentos do DNAmIt analisados e não exibiam alelos distintivos nos loci de microsatélites investigados. Esse procedimento foi tomado para se evitar a inclusão de possíveis indivíduos relacionados.

Nas análises do fragmento CRI, o seqüenciamento do fragmento “C” em algumas amostras provenientes de museus foi dificultado devido à presença de uma região repetitiva, rica em bases T e C (Fig. 3.2). Devido à dificuldade de se obter seqüências confiáveis desse fragmento para algumas amostras de museus, excluiu-se 29pb (intervalo entre 250 e 278pb) das seqüências do fragmento “C” de todos os indivíduos, utilizando-se os 520pb restantes nas análises posteriores.

Estimativas de variabilidade genética

Quinze sítios polimórficos foram encontrados nas seqüências do fragmento CRI, definindo 22 haplótipos entre os 58 indivíduos analisados, incluindo-se nessas análises material proveniente dos museus. O haplótipo CRI_1 foi identificado em todas as populações estudadas. Três haplótipos (CRI_3, CRI_9 e CRI_15) foram identificados em duas localidades, um (CRI_4) encontra-se compartilhado por três áreas amostradas e 17 estão restritos à uma única região (haplótipos privados) (Fig. 3.3). Considerando-se apenas as amostras coletadas contemporaneamente, foram identificados 13 haplótipos em 37 indivíduos, enquanto que nas 21 amostras históricas foram detectados 12 haplótipos diferentes (Figs. 3.3, 3.4 e 3.5). Na tabela 3.3 estão apresentados os níveis de variabilidade genética das amostras contemporâneas (c) e históricas (h) que foram coletadas para cada população. A população do Pantanal apresentou maior índice de diversidade haplotípica ($h = 0.906$) e nucleotídica ($\pi = 0.0045$) quando comparada às populações contemporâneas amostradas no norte da América do Sul ($h = 0.678$, $\pi = 0.0036$) e na América Central ($h =$

0.000, $\pi = 0.0000$). As redes de interação filogenética entre os haplótipos observados nas amostras contemporâneas e históricas estão apresentadas nas figuras 3.4 e 3.5, respectivamente.

Seis haplótipos foram definidos a partir das seqüências de 822pb da região ND2 de 18 indivíduos, coletados em três áreas reprodutivas da espécie: Belize (*AC*), Llanos da Venezuela e Rupununi na Guiana (*NSA*) e Pantanal (*PAN*). O único haplótipo representado nas amostras coletadas na América Central (ND2_5) foi também observado nas outras localidades amostradas (Figs. 3.3 e 3.6). Em contraste, três e cinco haplótipos diferentes foram observados nas amostras de seis indivíduos coletados na região norte da América do Sul e no Pantanal, respectivamente. Considerando-se todos os indivíduos analisados, a diversidade haplotípica foi 0.745 e a diversidade nucleotídica foi 0.0019 (Tab. 3.3). Na figura 6 está representada a rede de interações filogenéticas entre os haplótipos determinados para o fragmento ND2.

O cálculo das diferenças entre as diversidades haplotípicas obtidas para as duas regiões do DNAmít analisadas nas amostras contemporâneas, evidenciaram diferenças significativas entre os níveis de diversidade haplotípica das amostras coletadas em Belize (*AC*) e das amostras coletadas nos Llanos da Venezuela e Rupununi na Guiana (*NSA*) e Pantanal (*PAN*) (*AC* x *NSA*, $t = 17.77$; *AC* x *PAN*, $t = 68.62$). Os níveis de diversidade haplotípica observados entre as amostras coletadas nos Llanos da Venezuela e Rupununi na Guiana (*NSA*) e no Pantanal (*PAN*) não apresentaram valores significativamente diferentes (*NSA* x *PAN*, $t = 5.3$)

Dez loci se apresentaram polimórficos dentre os 16 loci de microssatélites heterólogos testados na amostra de tuiuiús coletada no Pantanal: WS01, WS04 e WS06 (Van Den Bussche *et al.*, 1999); WS03, WS08, WS13, WS16, WS17, WS18 e WS20 (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003, Tomasulo-Seccomandi, 2004). Foram detectados de dois a sete alelos nestes loci. A heterozigosidade intraloco observada variou de 0.111 (WS03) a 0.900 (WS04) (Tab. 3.4). Na análise de desequilíbrio de ligação, após aplicação da correção de Bonferroni, obteve-se resultado significativo somente entre o WS17 e o WS18, indicando que estes loci podem estar ligados.

A análise nos loci WS04, WS13, WS18 e WS20 foi estendida para as amostras contemporâneas, provenientes do norte da América do Sul e da América Central. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao deficit de heterozigotos foram observados para os loci WS04 e WS20 nas amostras de Belize e do Pantanal. Na análise

incluindo 50 indivíduos, observou-se que as amostras provenientes das áreas alagadas sul americanas (*NAS* e *PAN*) apresentavam níveis similares de heterozigidade observada, enquanto que, a amostra originária da América Central apresentava heterozigidade menor, apesar desses valores não diferirem significativamente entre si (*AC* x *NSA*, $t = 1.06$; *AC* x *PAN*, $t = 2.17$; *NSA* x *PAN*, $t = 1.13$) (Tab. 3.5).

Tabela 3.3. Diversidade genética observada nas seqüências do DNAm_{it} das populações de tuiuiú onde pode-se verificar o número de indivíduos amostrados (*n*), o número de haplótipos detectados (*n*^o hap), os valores de diversidade haplotípica (*h*) e diversidade nucleotídica (π).

Amostras ^a	CRI				ND2			
	n	n ^o hap	<i>h</i>	π	n	n ^o hap	<i>h</i>	π
<i>AC</i> -h	9	6	0.833	0.0050	----	----	----	----
<i>AC</i> -c	5	1	0.000	0.0000	6	1	0.000	0.0000
<i>NAS</i> -h	7	4	0.809	0.0044	----	----	----	----
<i>NAS</i> -c	8	3	0.678	0.0036	6	3	0.600	0.0008
<i>PER</i> -h	5	5	1.000	0.0050	----	----	----	----
<i>PAN</i> -c	24	12	0.906	0.0043	6	5	0.933	0.0027
Total	58	22	0.866	0.0045	18	6	0.745	0.0018

^a*AC*, América Central; *NAS*, norte da América do Sul; *PER*, Peru; *PAN*, Pantanal. A inclusão das letras “h” e “c” após os nomes das populações indicam a utilização de amostras históricas (h) ou contemporâneas (c) nas análises.

Tabela 3.4. Estimativas de variabilidade genética baseada nos dez loci de microssatélites na amostra de tuiuiú coletada na região do Pantanal.

Loco	Tamanho dos alelos ^a	Temp. de anelamento (°C) ^b	n	Ho	He
WS01	166/176/186	52	29	0.310	0.319
WS03	168/172	60	27	0.111	0.107
WS04	181/183/185/187/193	60	30	0.900	0.769
WS06	224/238	53	15	0.267	0.515
WS08	175/177	60	17	0.353	0.471
WS13	219/221	60	29	0.138	0.189
WS16	126/130	55	25	0.560	0.509
WS17	253/257/302	60	20	0.550	0.601
WS18	302/306/350	55	30	0.500	0.605
WS20	145/149/153/157/161	55	30	0.267	0.675*
Todos			30	0.396	0.476*

^a Nas análises realizadas em amostras provenientes de populações fora do Pantanal foram também observados os alelos: 189 e 195 no loco WS04; 310 e 358 no loco WS18; e 141 no loco WS20.

^b a temperatura de anelamento indicada se refere à temperatura inicial do processo “touchdown”.

* Frequências genotípicas fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3.5. Diversidade genética baseada nos quatro loci de microssatélites heterólogos (WS04, WS13, WS18 e WS20).

Localidade	n	A	na	Ho	He
AC	6	2.25	0	0.333	0.439
NAS	14	4.25	5	0.464	0.595
PAN	30	3.75	3	0.450	0.560
Total	50	5.00	---	0.440	0.592

n, número de indivíduos; A, número médio de alelos por loco; na, número de alelos privados; Ho, heterozigidade observada; He, heterozigidade esperada.

Haplótipos Região Controladora	Sítios Polimórficos				Haplótipos Região Conservada	Sítios Polimórficos				
	000000013333334 002234901123499 695987401978426	Am. Central	norte Am. do sul	Peru		Pantanal	001245 097202 376135	Am. Central	norte Am. do sul	Pantanal
CRI_1	GTTAGAGTGGCTACC	4	7	1	6	ND2_1	TCTGTA	0	4	1
CRI_2	..C...A...C...	1	0	0	0	ND2_2	..C..G	0	0	2
CRI_3	...G.....	1	0	0	2	ND2_3	...A.G	0	0	1
CRI_4	A..G.....C..	5	3	0	3	ND2_4	...AAG	0	0	1
CRI_5	AC.G.....	1	0	0	0	ND2_5	C.....	6	1	1
CRI_6C..T	1	0	0	0	ND2_6	.T....	0	1	0
CRI_7	A..G.....TC..	1	0	0	0					
CRI_8	A..G...A..C...	0	1	0	0					
CRI_9	A..G.....C..	0	2	1	0					
CRI_10	...A.....	0	1	0	0					
CRI_11A..	0	1	0	0					
CRI_12	...A..A..C...	0	0	1	0					
CRI_13C...	0	0	1	0					
CRI_14A.....	0	0	1	1					
CRI_15	...G.....C..	0	0	0	4					
CRI_16	A..G...A..C...	0	0	0	1					
CRI_17C...	0	0	0	2					
CRI_18	...G.....C..	0	0	0	1					
CRI_19	A..G...A..C..T	0	0	0	1					
CRI_20G.....	0	0	0	1					
CRI_21	A..G.....T	0	0	0	1					
CRI_22	...G.....CC..T	0	0	0	1					

Figura 3.3. Sítios polimórficos observados nos haplótipos identificados a partir de 58 seqüências do fragmento CRI e de 18 seqüências do ND2. Os haplótipos encontrados apenas nas amostras provenientes do museu (coletadas entre 1882 e 1981) estão evidenciados em cada população pela cor vermelha; haplótipos observados tanto nas amostras proveniente dos museus quanto nas amostras contemporâneas (2000-2006) estão representados em azul; haplótipos detectados somente nas amostras contemporâneas estão representados em preto.

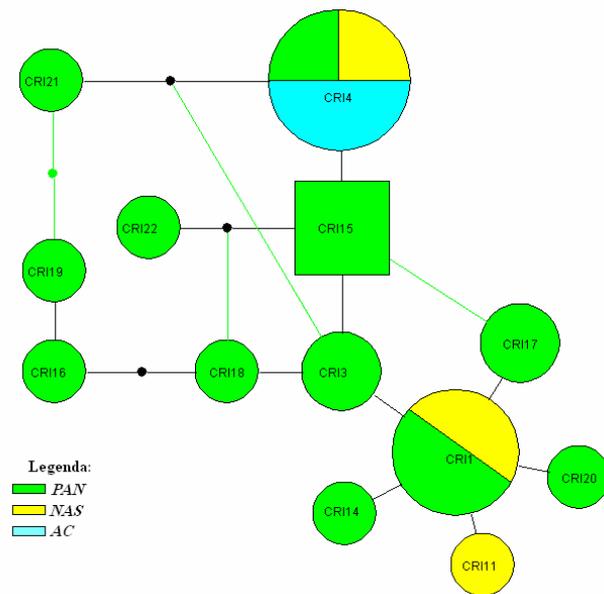


Figura 3.4. Rede de haplótipos obtida utilizando o fragmento CRI de amostras contemporâneas coletadas em Belize (*AC*), Llanos da Venezuela e Ripununi na Guiana (*NSA*) e no Pantanal (*PAN*). Conexões de haplótipos representadas pelas linhas pretas são mais prováveis de acordo com as regras de Crandall e Templeton (1993).

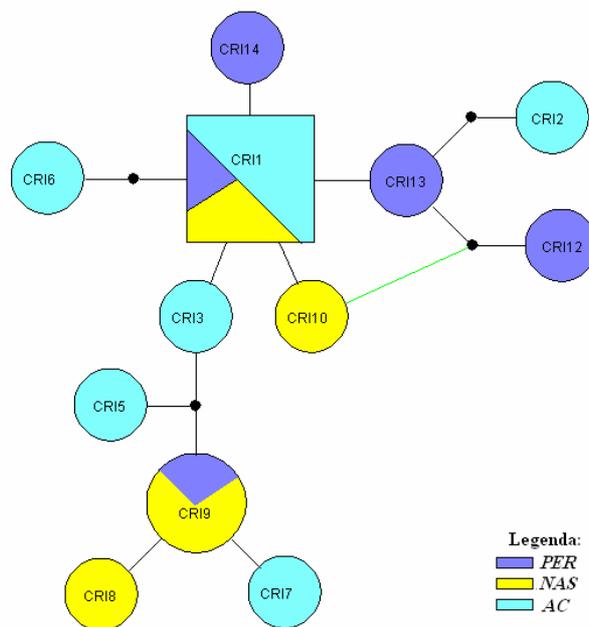


Figura 3.5. Rede de haplótipos gerada a partir das sequências do fragmento CRI determinada nas amostras de museu coletadas no Peru (*PER*), na Colômbia (*NSA*) e na Costa Rica e Nicarágua (*AC*).

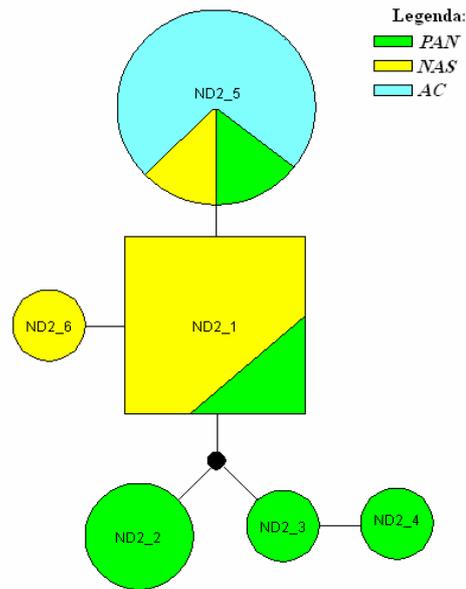


Figura 3.6. Rede de haplótipos obtida utilizando o fragmento ND2 detectados em amostras contemporâneas coletadas em Belize (AC), Llanos da Venezuela e Ripununi na Guiana (NSA) e no Pantanal (PAN).

Estimativas de subdivisão populacional

Nas amostras contemporâneas, os dados de AMOVA global obtidos para ambos os fragmentos do DNAmít (CR1 e ND2) indicaram uma diferenciação significativa entre as populações (Tab. 3.6). A análise hierárquica resultou em valores de Φ_{ct} não significativos, não permitindo o agrupamento preferencial entre essas populações. As estimativas de F_{st} par-a-par utilizando seqüências do DNAmít revelaram ocorrência de subdivisão genética significativa entre a América Central e as duas outras populações amostradas (ND2) ou somente entre o Pantanal e a América Central (CRI) (Tabs. 3.8 e 3.9).

A análise conjunta das amostras contemporâneas e históricas baseada nos dados do fragmento CRI, evidenciou a ocorrência de subdivisão populacional na AMOVA ($\Phi_{stGlobal} = 0.1344$, $P < 0.01$). As estimativas de F_{st} par-a-par demonstrou a ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as amostras contemporâneas da América Central e as amostras históricas do Peru, do norte da América do Sul e da América Central e do Pantanal (Tab. 3.9). A análise das amostras históricas separadamente não evidenciou a resultados significativos na AMOVA ($\Phi_{stGlobal} = -0.0486$, $P > 0.05$) ou nas análises de F_{st} par-a-par.

A AMOVA obtida para os dados dos microssatélites revelou valores de F_{st} significativos tanto na análise global como na hierárquica (Tab. 3.6). As estimativas de F_{st} par-a-par indicaram nível de diferenciação significativa entre amostras da América Central e norte da América do Sul quando estas foram comparadas ao Pantanal (Tab. 3.7).

Tabela 3.6. Resultados da AMOVA calculados para duas regiões do DNAmít (CRI e ND2) e para quatro loci de microssatélites heterólogos, nas amostras contemporâneas.

AMOVA	CRI	ND2	Microssatélites
Todas as localidades	Φ_{st} : 0.1767**	Φ_{st} : 0.4442**	F_{st} : 0.1044**
(AC) vs. (NAS + PAN)	Φ_{st} : 0.3223**	Φ_{st} : 0.4772**	F_{st} : 0.1260**
	Φ_{sc} : -0.0110	Φ_{sc} : 0.3638*	F_{sc} : 0.0902**
	Φ_{ct} : 0.3297	Φ_{ct} : 0.1782	F_{ct} : 0.0393
(AC + NAS) vs. (PAN)	Φ_{st} : 0.1508**	Φ_{st} : 0.4772**	F_{st} : 0.1107**
	Φ_{sc} : 0.3170*	Φ_{sc} : 0.3638*	F_{sc} : 0.0567
	Φ_{ct} : -0.2434	Φ_{ct} : 0.1782	F_{ct} : 0.0569
(AC + PAN) vs. (NAS)	Φ_{st} : 0.3240**	Φ_{st} : 0.4123**	F_{st} : 0.0849**
	Φ_{sc} : 0.0663	Φ_{sc} : 0.3832	F_{sc} : 0.1549**
	Φ_{ct} : -0.3813	Φ_{ct} : -0.0503	F_{ct} : -0.0829

* $0.05 > P > 0.01$, ** $P < 0.01$

Tabela 3.7. Resultados da AMOVA calculados para a região CRI do DNAmít utilizando amostras contemporâneas e históricas.

AMOVA	CRI
Todas as localidades	Φ_{st} : 0.1344*
(AC-h + AC-c) vs. (NCA-h + NCA-c) vs. (PER-h) (PAN-c)	Φ_{st} : 0.1194*
	Φ_{sc} : 0.2773*
	Φ_{ct} : -0.2184
(AC-h + NAS-h + PER-h) vs. (AC-c + NSA-c + PAN-c)	Φ_{st} : 0.1623*
	Φ_{sc} : 0.0867*
	Φ_{ct} : 0.0828*

* $P < 0.01$

Tabela 3.8. Valores de *Fst* par-a-par apresentados para os dados de microssatélites (acima da diagonal) e para as seqüências do fragmento da região ND2 (abaixo da diagonal) utilizando somente amostras coletadas contemporaneamente.

Localidade	<i>AC</i>	<i>NAS</i>	<i>PAN</i>
<i>AC</i>	-----	0.0440	0.1511**
<i>NAS</i>	0.6400*	-----	0.0825**
<i>PAN</i>	0.4400*	0.1097	-----

* $0.05 > P > 0.01$, ** $P < 0.01$

Tabela 3.9. Valores de *Fst* par-a-par obtidos para as seqüências do fragmento CRI do DNAmIt, utilizando as amostras históricas (h) e contemporâneas (c) coletadas na América Central (*AC*), no norte da América do Sul (*NAS*) no Peru (*PER*) e no Pantanal (*PAN*).

Localidade	<i>AC-h</i>	<i>CA-c</i>	<i>NAS-h</i>	<i>NAS-c</i>	<i>PER-h</i>	<i>PAN-c</i>
<i>AC-h</i>	-----					
<i>AC-c</i>	0.4944*	-----				
<i>NAS-h</i>	-0.0152	0.5398*	-----			
<i>NAS-c</i>	0.0264	0.3739	0.0549	-----		
<i>PER-h</i>	0.0028	0.5000*	-0.0493	0.0849	-----	
<i>PAN-c</i>	0.0883	0.3107*	0.0329	0.0297	-0.0038	-----

* $P < 0.01$

Inferências demográficas

O teste de neutralidade de Fu aplicado aos dados relativos às seqüências do fragmento CRI nas amostras de tuiuiú coletadas no Pantanal apresentou valor significativo (Tab. 3.10). Valores não significativos de *F_s* foram obtidos para amostras da América Central e do norte da América do Sul, tanto para as provenientes dos museus (Tab. 3.10) como para as contemporâneas (*CA*, *F_s* não pôde ser calculado devido à ausência de variabilidade; *NAS*, *F_s* = 1.412, *P* = 0.303). Os testes de neutralidade de D* e F* não apresentaram resultados significativos para nenhuma das amostras analisadas (Tab 3.10).

As análises de “mismatch distribution” demonstraram que somente a curva de distribuição da amostra do Pantanal coincide com a esperada segundo modelo de expansão populacional (Fig. 3.8). No entanto, de acordo com o teste da soma dos desvios dos quadrados da “mismatch distribution”, somente a curva da América Central apresenta desvio significativo do modelo de expansão (os valores de SSD estão apresentados na Fig. 3.8).

Valores não significativos do F_s foram obtidos para as seqüências da região ND2 do DNAmít (NAS , $F_s = -0.858$, $P = 0.232$; PAN , $F_s = -1.846$, $P = 0.053$). A detecção de apenas um haplótipo nas amostras coletadas em Belize não permitiu que estes testes fossem feitos nessa população. Distribuição unimodal foi observada nas análises de “mismatch distribution” nas populações do norte da América do Sul e do Pantanal (Fig. 3.9). O valor de P da soma do desvio dos quadrados revelou que os padrões obtidos para ambas as curvas não desviaram significativamente do modelo de expansão populacional (NAS , $SSD = 0.037$, $P = 0.235$; PAN , $SSD = 0.049$, $P = 0.343$).

Tabela 3.10. Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento CRI.

Localidade	F_s	D*	F*
<i>AC</i>	-1.324	-0.894	-0.857
<i>NAS</i>	-0.673	-0.398	-0.353
<i>PER</i>	-2.517	-0.668	-0.692
<i>PAN</i>	-5.900*	-0.629	-0.721
Total	-14.878*	-2.249	-2.080

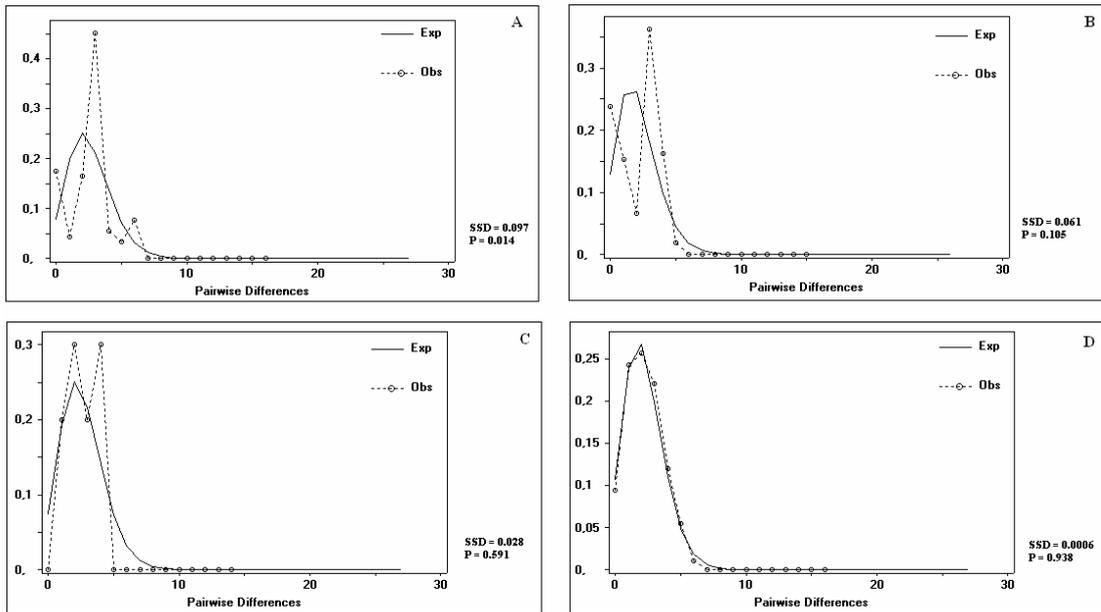


Figura 3.7. Gráficos de “mismatch distribution” obtidos para as seqüências do fragmento CRI do DNAmít de amostras de tuiuiú coletadas na América Central (A), no norte da América do Sul (B), no Peru (C) e no Pantanal (D). a significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas pelo modelo de expansão populacional foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

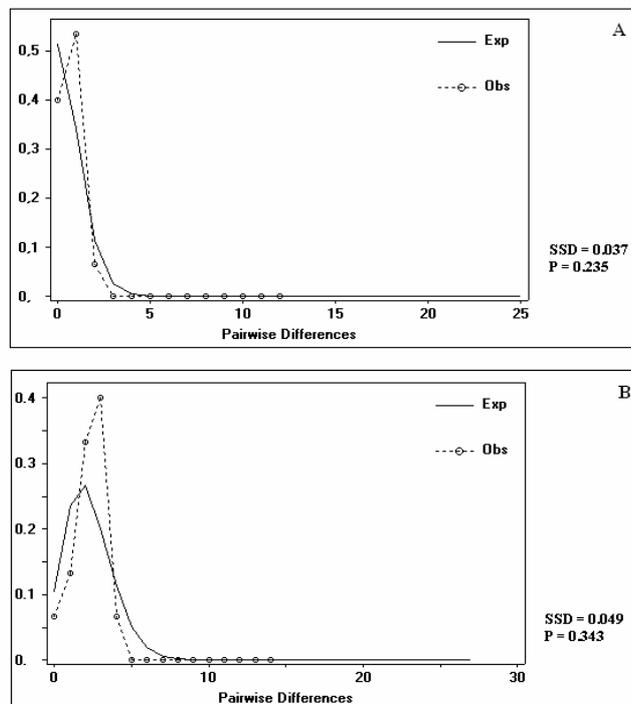


Figura 3.8. Análise de “mismatch distribution” das seqüências da região ND2 do DNAmít obtidas para amostras coletadas no norte da América do Sul (A) e no Pantanal (B).

Discussão

Variabilidade genética

De acordo com Luthin (1987), a região do Pantanal brasileiro abriga a população mais estável e numerosa de tuiuiús de todo continente americano. Diferentemente do reportado para outras áreas de ocorrência, o tuiuiú no Pantanal é considerado não somente uma espécie comum como também abundante, com uma população estimada de 15.800 indivíduos (Coutinho *et al.*, 1997). A variabilidade genética da população de tuiuiús do Pantanal, avaliada segundo dados nos loci de microssatélites heterólogos, foi similar à variabilidade observada para a população de cabeça-seca da região baseada nesses mesmos loci (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, *in prep*; Rocha *et al.*, 2004).

A população do Pantanal foi comparada, em termos de nível de heterozigosidade, às outras duas populações amostradas recentemente, verificando-se que os níveis de heterozigosidade das populações sul americanas são semelhantes entre si, enquanto que, a população da América Central apresenta um grau de variabilidade menor (Tab.3.4). O mesmo resultado foi observado nas análises dos dados de seqüências do DNAmít (Tab. 3.2). Entretanto, apesar da observação de níveis mais baixos ou mesmo ausência total de variabilidade nas amostras coletadas contemporaneamente na América Central, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de diversidade genética dessas populações. Esse resultado pode ser atribuído ao nosso pequeno número amostral.

Níveis de diversidade genética de indivíduos provenientes das áreas alagadas do Peru se restringiram às análises do fragmento CRI do DNAmít. A maioria da amostra foi coletada entre 1962 e 1981 e níveis altos de diversidade haplotípica e nucleotídica foram observados. A região ocupada pelos tuiuiús no Peru está localizada a leste da Cordilheira dos Andes e a oeste da floresta Amazônia, essa área foi pouco habitada e parece não ter sofrido altos níveis de degradação até o final de década de sessenta (Diamond & Terborgh, 1967). Atualmente, porém, as regiões de Loreto e Madre Dios são consideradas pólos turísticos no Peru e podem estar sofrendo com impactos antrópicos (Kirkby *et al.*, 2000). Apesar de nossos dados apontarem para um alto nível de variabilidade genética mitocondrial na população peruana de tuiuiús acessada entre 1962 e 1981, para uma avaliação mais precisa do status atual desta população, será necessária uma análise de amostras contemporâneas e a inclusão de um número maior de marcadores.

Variabilidade histórica x contemporânea

A análise do fragmento CRI do DNAmít nas amostras contemporâneas (2000 - 2006) e históricas (1909 - 1966), coletadas no norte da América do Sul, revelou uma leve redução, porém não significativa, da diversidade haplotípica e nucleotídica nessa população. Informações recentes e precisas sobre o status demográfico da população de tuiuiús das áreas ao norte da América do Sul não foram ainda levantadas, assim como para a maioria das espécies de aves neotropicais. Apesar da falta de informação direta acerca dessa população, há indícios da degradação do habitat dentro dessa área da distribuição (Luthin, 1987; Morales, 1990; González, 1993). A destruição do habitat foi apontada como o fator crucial do declínio da população centro americana dessa espécie (Paredes, 2004; Figueroa, 2005). Esse também pode ser um fator de ameaça para população que habita as áreas alagadas ao norte da América do Sul.

Análises comparativas baseadas no fragmento CRI entre amostras dos museus (1882 - 1973) e recentes (2004) coletadas na América Central demonstraram a ocorrência de seis haplótipos diferentes nas amostras históricas, enquanto que, somente um haplótipo (CRI_4) foi detectado nas amostras contemporâneas (Tab 3.3, Fig. 3.3). O haplótipo CRI_4, observado em cinco indivíduos de Belize, encontra-se representado também nas populações contemporâneas da América do Sul, mas não foi detectado nas amostras históricas dessa população. A não-detecção do haplótipo CRI_4 nas amostras históricas da América Central pode ser explicada pelo nosso pequeno número amostral ou, alternativamente, pela mudança na frequência desse haplótipo devido aos efeitos da deriva genética associada ao declínio populacional, como observado nas populações de Whooping Crane (*Grus americana*) nos Estados Unidos (Glenn *et al.*, 1999).

A população de tuiuiús da América Central, considerada menor devido à baixa disponibilidade de habitat, encontra-se também ameaçada pelas altas taxas de crescimento demográfico humano na região (Paredes, 2004). Em concordância com o pressuposto de que gargalos populacionais tendem a eliminar alelos encontrados em baixa frequência (Nei *et al.*, 1975), não se observou ocorrência de alelos privados nos loci de microssatélites das amostras provenientes da América Central. Considerando-se que os marcadores de DNAmít estão entre os mais sensíveis aos efeitos de redução populacional, e que populações pequenas e em declínio sofrem mais intensamente com os efeitos da deriva genética, era esperada uma redução na diversidade do DNAmít na população da América

Central em comparação com as demais. Entretanto, a total ausência de variabilidade genética observada na análise de ambas as regiões DNAmIt nas amostras de Belize foi surpreendente. Por possuir quase metade do habitat requerido para reprodução dos tuiuiús na América Central, acredita-se que Belize abrigue grande parte da população residente na região. Nossa amostragem ($n = 6$), apesar de baixa, cobre cerca 12% do “pool” gênico das fêmeas reprodutoras na área (aproximadamente 25 casais; Figueroa, 2005) validando, portanto, a inclusão desses dados na nossa discussão. Embora nossos resultados evidenciem que o menor tamanho populacional aliado ao recente declínio demográfico provavelmente tiveram grande impacto no nível de diversidade do DNAmIt da amostra analisada, a ampliação da amostragem e a genotipagem dos loci de microssatélites nas amostras de museus são os passos requeridos para a melhor caracterização do nível de variabilidade atual e perda da diversidade após o declínio

Estrutura genética da população

Estudos independentes que investigaram os movimentos sazonais da espécie foram realizados em três das áreas amostradas nesse estudo, o Pantanal (Antas & Nascimento, 1996), os Llanos da Venezuela (González, 1996b) e as áreas alagadas de Belize (Figueroa, 2005). Todos estes estudos confirmam que, apesar de possuir alto potencial para dispersão, as populações são residentes em cada uma das regiões investigadas. Em concordância com os estudos acima citados, as análises de diferenciação genética utilizando os três marcadores moleculares (CR1, ND2 e microssatélites), resultaram em estimativas que apoiam a existência de diferenciação genética entre as populações coletadas recentemente. Todos os valores de AMOVA global apresentaram-se altamente significativos indicando existência de diferenças genéticas de 10% (microssatélites) a 44% (ND2) entre as populações (Tab. 3.8). Os valores de *Fst* par-a-par indicaram que a amostra coletada no Pantanal diferenciou significativamente das amostras do norte da América do Sul e da América Central (microssatélites) ou somente da América Central (CRI) (Tabs. 3.8 e 3.9). As análises de *Fst* par-a-par utilizando os dados do fragmento ND2 evidenciaram as diferenças significativas entre as amostras coletadas na América Central e as do norte da América do Sul e do Pantanal (Tab. 3.8).

Por outro lado, nas amostras dos museus, os resultados obtidos para estimativas de subdivisão populacional utilizando o fragmento CRI não indicaram diferenciação genética

entre as localidades investigadas. Estes resultados contraditórios podem ter relação com uma possível fragmentação e declínio demográfico dessas populações nas últimas décadas. De acordo com Avise (1994), em populações estáveis e que apresentam tempo de geração longo, não se espera que as seqüências de DNA evoluam rápido o suficiente para ocorrerem mudanças na composição genotípica da população num período de décadas. Entretanto, Johnson *et al.* (2004) investigando mudanças temporais na composição genética de populações de *Tympanuchus cupido* que sofreram forte declínio demográfico, observaram um aumento da estruturação populacional das mesmas em decorrência da fragmentação do habitat em apenas 50 anos. Novamente, ao contrário do que se observa para espécies de aves do hemisfério norte, que possuem monitoramento de longo prazo, pouco se sabe sobre o status demográfico das populações de tuiuiú tanto hoje como no passado. Como a maioria das amostras históricas utilizadas nesse estudo foram coletadas antes da década de sessenta, e logo após esse período foi registrado um crescimento acelerado das populações humanas com intensificação da destruição do habitat (Pullin, 2002), é plausível associar estes eventos ao possível declínio das populações de tuiuiú nas áreas mais habitadas como a América Central e as áreas litorâneas do norte da América do Sul. A detecção de fluxo gênico a nível molecular depende de vários fatores entre eles o tempo de isolamento das populações, o tamanho efetivo da população e a taxa de mutação dos marcadores utilizados (Frankham *et al.*, 2002). Análises utilizando marcadores mitocondriais revelam padrões relativos ao componente matriarcal que podem ser influenciadas pela dispersão diferencial das fêmeas, fenômeno predominante nas aves (Greenwood, 1980). Investigações dos padrões de fluxo gênico utilizando os loci de microsatélites nas amostras provenientes dos museus poderão ajudar esclarecer o padrão de subdivisão histórico dessas populações.

História demográfica das populações

A investigação dos padrões histórico-demográficos indicam resultados mais contundentes de expansão demográfica recente para a população de tuiuiús do Pantanal: padrão unimodal de “mismatch distribution” nas duas regiões do DNAm_{it} analisadas e valor de F_s significativo nas análises do fragmento CRI. Esses resultados são similares aos obtidos nas análises do DNAm_{it} de outras populações de aves aquáticas que se reproduzem no Pantanal como o cabeça-seca (Lopes *et al.*, 2006) e o colhereiro (*Platalea*

ajaja) (Santos, 2005). Como estas espécies apresentam biologia semelhante a do tuiuiú, é esperado que todas as três espécies apresentem padrões filogeográficos similares como acontece com muitas espécies co-distribuídas (Avise, 2000).

Os indícios de expansão da população de tuiuiús no Pantanal devem estar relacionados à recente formação desta planície alagada, localizada no centro do continente sul americano. A bacia do Pantanal foi formada pela migração oeste e compressão do escudo brasileiro com o soerguimento da Cordilheira da Andes entre o Plioceno tardio e Pleistoceno recente (aproximadamente 2.5 milhões de anos atrás) (Ussami *et al.*, 1999). Entretanto, as características atuais da região são atribuídas às recentes mudanças climáticas com aumento da umidade ocorridas na transição do Pleistoceno/Holoceno (entre 10.200 e 5.190 anos atrás) (Bezerra, 1999; Assine & Soares, 2004) assim como a vegetação do sudeste e centro-oeste brasileiro que foi também estabelecida neste mesmo período (entre 10.000 e 6.000 anos atrás) (de Oliveira, 1992; Barbieri *et al.*, 2000; Behling, 2002; Assine & Soares, 2004). De acordo com estes dados paleogeológicos, é possível supor que ao estabelecimento da população de tuiuiús no Pantanal tenha ocorrido durante a transição Pleistoceno/Holoceno como observado para outras espécies de aves aquáticas que se reproduzem na região (Lopes *et al.* 2006; Santos, 2005).

Não foram observados indícios fortes da ocorrência de expansão demográfica recente para as populações da América Central e para o norte da América do Sul. Este padrão é esperado para regiões que permaneceram climaticamente estáveis durante a última glaciação. As evidências de estabilidade demográfica em espécies que ocupam esta região esta de acordo com as reconstruções paleoclimáticas que apontam a região equatorial como climaticamente estável durante o último ciclo glacial (Colinvaux *et al.*, 2000; Colinvaux & de Oliveira, 2001). A amostragem e análise de populações de cabeças-secas, colhereiros e outras espécies de aves aquáticas em áreas ao norte da América do Sul podem confirmar essa hipótese.

Implicações conservacionistas

Dados provenientes de estudos genéticos têm sido usados no estabelecimento de estratégias de manejo e conservação de várias espécies que se encontram vulneráveis ou ameaçadas de extinção (exemplos em: Frankham *et al.*, 2002). Com esse estudo,

esperamos contribuir com informações que possam dar subsídio para o desenvolvimento de estratégias de conservação de tuiuiús ao longo de sua área de distribuição.

Por ser considerada atualmente a maior e mais estável população de tuiuiús ao longo de sua área de ocorrência, os níveis de variabilidade genética determinados na população do Pantanal foram usados como referência nas comparações entre as populações. O alto nível de diversidade observado nesta população pode ser ainda resultado da recente expansão demográfica como indicado nas análises do fragmento CRI. Expansões populacionais frequentemente se caracterizam pela ocorrência de vários haplótipos em baixa frequência que elevam as estimativas de diversidade haplotípica como a que foi observada no Pantanal. A redução, ainda que não significativa, dos níveis de variabilidade observados na comparação das amostras antigas e recentes coletadas no norte da América do Sul, pode estar indicando ocorrência de declínio populacional não documentado que merece ser melhor avaliado. Os altos níveis de variabilidade detectados nas análises do fragmento CRI do DNAmít nos indivíduos do Peru indicam que esta população não apresentava registros de redução da variabilidade genética no período em que foi amostrada (entre 1927 e 1981), porém, somente a análise de amostras contemporâneas poderá caracterizar o status atual desta população.

Em contraste com o observado para as localidades estudadas na América do Sul, forte redução da variabilidade genética foi observada para na população de tuiuiús da América Central. O recente declínio, com extinção da espécie em várias áreas anteriormente ocupadas pela mesma, está provavelmente relacionado com esta perda de diversidade genética observada. A estimativa mais recente aponta para a existência de somente 70-80 pares reprodutivos na região (Figueroa, 2005), com a maioria deles habitando áreas alagadas de Belize, Honduras e Nicarágua (Frederick *et al.*, 1997; Figueroa, 2005). Diante da situação alarmante em que se encontra a população de tuiuiús da América Central, é de crucial importância a preservação das áreas críticas para forrageamento e reprodução da espécie bem como o monitoramento do sucesso reprodutivo dessa população a longo prazo.

Tentamos em nossas análises avaliar o nível de estruturação genética entre as três populações de tuiuiús sugeridas nos trabalhos de Short (1975) e Blake (1977). Nossos resultados evidenciaram diferenciação genética significativa entre as amostras coletadas contemporaneamente que estão de acordo com os dados de observação dos padrões de movimento dessa espécie (Antas & Nascimento, 1996; González, 1996; Figueroa, 2004) e

a subdivisão populacional sugerida por Short e Blake na década de 70. No entanto, a detecção de ausência de diferenciação genética significativa nas análises dos fragmentos CRI das amostras provenientes dos museus, nos leva a crer que a atual estruturação genética observada pode ser devida ao fenômeno de aumento da fragmentação do habitat e declínio recente dessas populações. A interrupção do fluxo possivelmente existente no passado, pode ter efeitos deletérios principalmente para a população residente na América Central que apresenta atualmente nível de variabilidade mais baixo que a população da América do Sul. A análise das amostras recentes e históricas, utilizando outros tipos de marcadores neutros, como os microssatélites, podem ajudar a esclarecer melhor este padrão observado.

Apêndice. Origem e data de coleta das amostras de tuiuiú provenientes de áreas alagadas da América Central e do norte da América do Sul.

Origem^a	Identificação	Ano coleta	Região	País
TCWC	9524 ^b	1973	Texas	EUA
UMMZ	136814	1931	Siboon River	
LSUMNS	B-51347	1956	Orange walk district	
Drs. Meyer e Figueroa	#1 - #6	2004	---	Belize
AMNH	143723	1917	San Carlos	Nicarágua
NMNH	87485	1882	Lea Palma	
CAS	ORN 13	1906	---	
CAS	ORN 14	1906	---	
FMNH	126937	1929	Guanacaste	
UMMZ	133616	1951	Guanacaste	Costa Rica
AMNH	102398	1909	Simitri	
AMNH	749541	1911	San Jorge River	
AMNH	749540	1911	San Jorge River	
AMNH	96346	1911	Bolivar	
AMNH	126939	1911	San Jorge River	
AMNH	31512	1911	San Jorge River	
FMNH	370778	1966	---	Colômbia
Audubon Zôo	Lolita/Jezebel	2005 ^c	Llanos	
Dr. Rios	Vz01 - Vz12	2006	Llanos	Venezuela
NMNH	B12954	2000	Rupununi	Guiana
LSUMNS	B-51344	1964	Loreto	
LSUMNS	B-51345	1981	Madre de Dios	
LSUMNS	B-51346	1962	Loreto	
TCWC	6872	1964	Loreto	
AMNH	237578	1927	Ucayali	Peru

^a Abreviações: American Museum of Natural History (AMNH), National Museum of Natural History (NMNH), Field Museum of Natural History (FMNH), University of Michigan Museum of Zoology (UMMZ), California Academy of Science (CAS), Texas Cooperative Wildlife Collection (TCWC) e Louisiana State University Museum of Natural Science (LSUMNS).

^b Indivíduo imaturo coletado no Texas (no limite sul da cidade de Houston) provavelmente originário de áreas reprodutivas do México (Arnold, 1977).

^c Indivíduos capturados juntos em 1998 na Venezuela (Alex Cole, comunicação pessoal) atualmente depositados no zoológico da Audubon Society em New Orleans.

Variabilidade e estrutura genética de populações de cabeças-secas (*Mycteria americana*)

Introdução

O cabeça-seca (*Mycteria americana*, Ciconiidae, Ciconiiformes) é uma ave aquática que se reproduz colonialmente em áreas periodicamente alagáveis da região tropical e subtropical das Américas. As colônias reprodutivas dessa espécie se formam anualmente e apresentam distribuição quase contínua ocupando grandes extensões de áreas alagáveis disponíveis desde o sudeste dos Estados Unidos (EUA) até o norte da Argentina (American Ornithologist's Union, 1998). De acordo com Palmer (1962), não foram identificadas características que possibilitassem a designação de subespécies ou populações distintas ao longo de sua área de distribuição. Os padrões de movimento pós-reprodutivos estão aparentemente relacionados à abundância e disponibilidade de alimento (Coulter *et al.*, 1999) e estudos desenvolvidos nas colônias reprodutivas dos EUA sugerem que, apesar de colônias de nidificação se formarem durante muitos anos consecutivos no mesmo local, a grande maioria destas são transitórias na natureza (Ogden & Patty, 1981; Kushlan *et al.*, 1975).

Como outras espécies pertencentes à família Ciconiidae que se encontram regionalmente ameaçadas devido à perda do habitat (IUCN, 2004), a população reprodutiva de cabeças-secas do sudeste dos EUA foi considerada ameaçada após sofrer intenso declínio demográfico em decorrência de atividades antrópicas, principalmente manipulação do nível das águas na região sul da Flórida (USFWS, 1996; Coulter *et al.*, 1999). O declínio ocorreu entre 1930 e 1978 quando a redução de 60.000 para 5.000 indivíduos reprodutores na região foi reportada (Ogden & Patty, 1981; Ogden *et al.*, 1987). Concomitantemente ao declínio das grandes colônias reprodutivas do sul da Flórida (seis colônias que representavam de mais de 75% da população total dos EUA entre 1958 e 1960), ocorreu uma redução no tamanho e na localização das colônias, que começaram a se estabelecer no centro-norte da Flórida e nos estados do Geórgia e Carolina do Sul (Michell, 1999; Coulter *et al.*, 1999). No último censo aéreo, realizado em 2003 para contabilizar o número de indivíduos reprodutores no sudeste dos EUA, foram identificados cerca de 9.000 casais nidificando em 78 colônias (Wood Stork Report, 2004).

O Pantanal, localizado na região centro-oeste do Brasil, se destaca como um dos sítios mais importantes para nidificação e forrageamento de diversas espécies de aves aquáticas na América do Sul (Harris *et al.*, 2005). Além de ser a maior área intracontinental periodicamente alagável do planeta, com cerca de 150.000 km², a região também se caracteriza como uma zona de contato entre três principais domínios florísticos: a floresta Amazônica, o cerrado do Brasil central e o Chaco Paraguai e Boliviano. O nível baixo de endemismo e a diversidade de espécies da região são atribuídos à recente formação desta planície inundável (entre 10.000 e 5.000 anos atrás) (Junk, 2003). Sítios de nidificação de cabeças-secas se estabelecem no Pantanal durante o período da seca (entre julho e novembro). Fora deste período, os jovens e os adultos se dispersam para outras regiões. Não existem levantamentos sistemáticos do número de cabeças-secas se reproduzindo anualmente na região do Pantanal, mas considerando o bom estado de preservação da área e que o declínio está associado à perda de habitat, pressupõe-se que a população pantaneira desta espécie tem permanecido estável.

Estudos da variabilidade e estruturação genética da população reprodutiva de cabeças-secas do sudeste dos EUA foram realizados utilizando marcadores alozímicos (Stangel *et al.*, 1990), microssatélites e DNA fingerprinting (Van Den Bussche *et al.*, 1999). O nível de variabilidade foi considerado alto para os marcadores alozímicos e baixo para os microssatélites e DNA fingerprinting. Ambas as investigações indicaram a ocorrência de diferenciação genética baixa entre as colônias, explicada supondo uma recente colonização da área estudada (3.000-3.500 anos atrás) e ocorrência de fluxo gênico intenso entre as colônias. Investigações do nível de variabilidade e padrão de subdivisão populacional nas colônias do Pantanal foram conduzidas utilizando os mesmos loci alozímicos e microssatélites descritos para a população dos EUA (Del Lama *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004). Os níveis de variabilidade observados no Pantanal foram similares aos observados na população dos EUA e foi encontrada ausência de subdivisão entre as colônias do Pantanal e baixa diferenciação entre estas e as colônias dos EUA. A diferenciação genética baixa observada entre as colônias amostradas no sudeste dos EUA e no Pantanal foi explicada supondo ocorrência de fluxo gênico intermediado por membros das colônias localizadas entre essas duas populações e/ou por um histórico populacional comum durante a última glaciação (Del Lama *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004). Estudos mais recentes, utilizando dez loci de microssatélites, evidenciaram novamente níveis de variabilidade similares na população do Pantanal e dos EUA

(Tomasulo-Seccomandi, 2004). No entanto, a análise da estrutura genética dessas populações demonstrou a ocorrência de subdivisão entre as colônias dos EUA, previamente detectada pelas análises alozímicas, e entre os EUA e o Pantanal. Ausência de estruturação genética foi detectada entre as colônias amostradas no Pantanal. A subdivisão genética das colônias dos EUA foi explicada supondo o efeito severo da deriva genética, uma vez que a destruição das áreas alagadas no sul da Flórida promoveu a fragmentação das grandes colônias em colônias menores e mais numerosas. O estudo baseado na análise do domínio III da região controladora do DNA mitocondrial (DNAMit) de cabeças-secas amostrados no Pantanal evidenciou a ocorrência de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância e de eventos históricos de expansão populacional (Lopes *et al.*, 2006).

Devido à ausência de recombinação e herança predominantemente materna, os efeitos dos eventos demográficos afetam o DNAMit quatro vezes mais rapidamente do que os genes nucleares (Avise, 1994). A alta taxa de mutação aliada ao menor tamanho efetivo torna esta molécula mais sensível aos efeitos da deriva genética e, portanto, mais propensa a apresentar indícios de redução de variabilidade causados por declínios populacionais e padrões de diferenciação genética entre populações, na ausência de intenso fluxo gênico via fêmeas (Wilson *et al.*, 1985; Avise, 1994; Frankham *et al.*, 2002), além de ser um marcador apropriado para avaliação dos padrões filogeográficos e da história recente das espécies (Avise, 2000).

No presente estudo foi realizada uma análise comparativa utilizando-se seqüências do primeiro domínio da região controladora do DNAMit e amostras filhotes de cabeças-secas coletadas em colônias no Pantanal ($n = 48$) e no sudeste dos EUA ($n = 40$). Por apresentar taxa de mutação mais alta do que os domínios II e III da região controladora, o domínio I foi escolhido para este estudo. Nesta análise pretende-se: 1. Avaliar e comparar o nível de variabilidade genética das colônias amostradas na população do Pantanal e dos EUA, bem como para as populações como um todo. Espera-se observar um nível de variabilidade menor na amostra dos EUA quando comparada à do Pantanal, caso o declínio populacional tenha afetado a diversidade da população dessa região; 2. Verificar os padrões de subdivisão entre as colônias dentro de cada população e entre elas. Supõe-se encontrar homogeneidade genética entre as colônias das regiões estudadas, tendo em vista que essas colônias reprodutivas não se caracterizaram como unidades populacionais em avaliações prévias com marcadores nucleares e mitocondrial. No entanto, espera-se

encontrar, uma vez que a região controladora do DNAmít apresenta uma alta taxa de mutação, diferenciação genética, mesmo que pequena, entre as populações do Pantanal e os EUA; 3. Fazer inferências sobre os eventos histórico-demográficos, responsáveis pela atual estrutura genética observada. Fatores históricos geralmente têm grande influência no padrão de subdivisão populacional contemporânea apresentado pelas espécies e esses fatores nunca foram avaliados numa análise comparativa entre estas duas populações. Será testada a hipótese de que esses grupos apresentaram um histórico populacional comum devido à redução do habitat disponível durante o último período glacial, com conseqüente deslocamentos dessas populações para áreas mais restritas, próximas ao equador. Considerando-se as análises prévias baseadas no DNAmít nas colônias de nidificação de cabeças-secas do Pantanal, espera-se confirmar os indícios de expansão demográfica recente nessa área.

Material e Métodos

Amostragem e extração de DNA

Neste estudo foram analisadas 48 amostras de oito colônias reprodutivas de cabeça-seca coletadas entre 1999 e 2003, na região do Pantanal (estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul): Fazenda Ipiranga (FI; 16°25'S, 56°36'O), Porto da Fazenda (PF; 16°27'S, 56°07'O), Baía de Gaíva (BG; 16°39'S, 57°10'O), Baía Bonita (BB; 18°40'S, 56°26'O), Fazenda Retirinho (FR; 19°50'S, 56°02'O), Rio Vermelho (RV; 19°36'S, 56°51'O), Tucum (TU; 16°26'S, 56°03'O) e Piquiri (PQ; 17°17'S, 56°21'O). As amostras norte americanas incluíram material coletado em duas colônias da Geórgia durante a estação reprodutiva de 2002 (Chew Mill Pond – CM; 32°50'S, 82°06'O e Harris Neck – HN; 31°38'S, 81°17'O) e amostras de outras seis colônias provenientes da Flórida e da Geórgia, cedidas pelo pesquisador Ronald A. Van Den Bussche (Heard's Pond – HP, 30°53'N, 83°55'O; Blackwater – BW, 30°41'N, 83°37'O; Dee Dot Ranch – DD, 30°12'N, 81°27'W; St. Simon – SS, 31°16'N, 81°21'O; Pelican Island – PI, 27°48'N, 80°26'O e Tamiami West – TW, 25°45'N, 80°32'O). Na figura 4.1 pode-se observar o mapa com a localização das colônias amostradas.

Na região do Pantanal as amostras de sangue foram coletadas dos filhotes utilizando EDTA 3% como anticoagulante. Após centrifugação, o plasma e os eritrócitos foram

congelados separadamente para posterior utilização. O DNA foi extraído dos eritrócitos utilizando o método Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). O sangue coletado nas colônias da Geórgia foi armazenado em tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 1% SDS) e o DNA extraído utilizando-se o protocolo de “Diatomaceous Earth” (MUD) (Davis *et al.*, 2000). A concentração do DNA foi estimada em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio ou em espectrofotômetro (260nm). Utilizou-se soluções diluídas de DNA em água na concentração de 40ng/μl nas reações em cadeia da polimerase (PCR)

Amplificação e seqüenciamento

A partir de seqüências completas da região controladora e parte da subunidade 6 da NADH desidrogenase (ND6) de cabeça-seca (Lopes, 2002) foram desenhados os primers WS-L36 (5'-TTCCTCCCAAATAACCATA-3') e WS-H601 (5'-CCTTGGCTGTGTGTA CG-3'), utilizados na amplificação e seqüenciamento de um fragmento 464 pares de bases (pb) que incluíram parte do gene ND6, o RNA transportador da glutamina (RNAt Glu) e parte do primeiro domínio da região controladora do DNAmít. O fragmento foi designado nesse estudo como “CRI”.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25μl contendo aproximadamente 100ng de DNA, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 0.25mM dNTPs, 0.5mM de cada primer, 2.5mg/ml de BSA (bovine serum albumin), 2.5 mM MgCl₂ e 1U *Taq* DNA polimerase (Biotools). As reações foram posteriormente submetidas ao seguinte programa de PCR: desnaturação inicial: 94°C - 5 min; 5 ciclos: 94°C - 20 seg, 55°C - 20 seg, 72°C - 20 seg; 21 ciclos: 94°C - 20 seg, 55°C (baixando 0.5°C por ciclo) - 20seg, 72°C - 20 seg; 10 ciclos: 94°C - 20 seg, 44.5°C - 20 seg, 72°C - 30 seg; extensão final: 10 - 72°C. Um microlitro do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, para checagem do rendimento. Amplificações que apresentaram rendimento acima de 50ng/μl foram purificadas adicionando-se 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Amersham Pharmacia Biotech) e 10U de Exo I (Exonuclease I, Amersham Pharmacia Biotech) à 8μl de produto. Essa mistura foi incubada à 37°C, por 1 hora e à 80°C, por 10 minutos. Após purificação, os produtos foram diretamente seqüenciados utilizando Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit

(Perkin Elmer), segundo as instruções do fabricante. Os seqüenciamentos foram feitos utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3700.

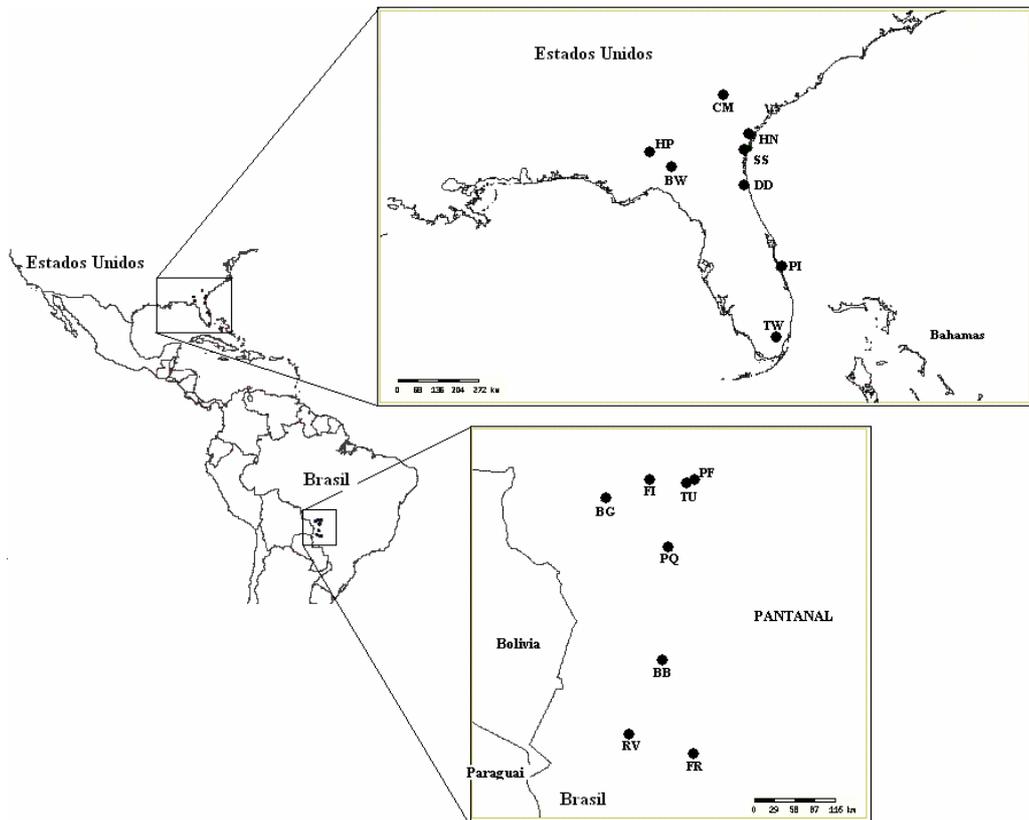


Figura 4.1. Mapa da localização das colônias de nidificação de cabeças-secas amostradas no presente estudo. Abreviações: Fazenda Ipiranga (FI), Porto da Fazenda (PF), Baía de Gaíva (BG), Baía Bonita (BB), Fazenda Retirinho (FR), Rio Vermelho (RV), Tucum (TU) e Piquiri (PQ), Chew Mill Pond (CM), Harris Neck (HN), Heard's Pond (HP), Blackwater (BW), Dee Dot Ranch (DD), St. Simon (SS), Pelican Island (PI) e Tamiami West (TW)

Análises estatísticas

As seqüências foram manualmente alinhadas e visualmente verificadas utilizando o programa Codon Code Aligner 1.5.2 (CodonCode Corporation). Bases ambíguas, decorrentes de picos sobrepostos nos eletroferogramas de 37 indivíduos, foram denotadas como indicado dentro do código IUPAC (R = A/G, Y = C/T, S = G/C, W = A/T, K = G/T, M = A/C, B = C/G/T, D = A/G/T, H = A/C/T, V = A /C/G, N = A/T/C/G) (Apêndice I).

As diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) (Nei, 1987) foram computadas pelo programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2000) e utilizadas na descrição da variabilidade genética das populações. A distribuição espacial da diversidade genética foi investigada através de estimativas de AMOVA (global e hierárquica) (Excoffier *et al.*, 1992) e de F_{st} par-a-par. A significância no nível de diferenciação foi testada nas amostras subdivididas em colônias, dentro de cada população (Pantanal e EUA) e entre as populações, utilizando amostras subdivididas e não-subdivididas em colônias. Estas análises de subdivisão populacional foram realizadas utilizando o programa Arlequin e a significância destes parâmetros foi testada utilizando 10.000 permutações.

Desvios da neutralidade foram avaliados na população do Pantanal e do sudeste dos EUA através do teste de F_s de Fu (Fu, 1997) utilizando o programa Arlequin. Fu (1997) demonstrou que os testes de F_s são sensíveis aos desvios do equilíbrio demográfico, particularmente nos casos de expansão populacional recente (Schneider & Excoffier, 1999). A análise da distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“mismatch distribution”) (Rogers & Harpending, 1992) foi calculada como uma forma adicional de avaliar sinais de expansão demográfica nas populações das duas regiões. A soma do desvio dos quadrados (SSD) foi aplicada para verificar a significância dos desvios entre as curvas observadas e esperadas da “mismatch distribution”.

Utilizando as informações genealógicas das seqüências, a “Nested Clade Analysis” (NCA) (Templeton *et al.*, 1995), testa a associação filogeográfica dos haplótipos, discriminando entre os efeitos de eventos recorrentes, como fluxo gênico restrito (particularmente fluxo gênico restrito devido ao isolamento pela distância; Wright, 1943) e os eventos históricos não-recorrentes (e.g., expansão demográfica, colonização ou fragmentação) (Templeton *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998). Para a realização da NCA, as seqüências foram analisadas pelo programa Tcs v.1.2 (Clement *et al.*, 2000) que gerou uma rede de haplótipos baseado na estatística de parsimônia. A rede

de haplótipos foi posteriormente organizada em uma série de agrupamentos que foram utilizados na identificação das associações haplotípicas filogeograficamente informativas (Templeton, 1998). As informações sobre os agrupamentos, tamanho das amostras e localização geográfica de cada clado foram testadas pelo teste exato de contingência aleatória do programa Geodis (Posada *et al.*, 2000). A rejeição da hipótese nula de “não associação geográfica entre os haplótipos” foi interpretada em termos biológicos através de chave de inferência publicada por Templeton (2004).

Resultados

Diversidade genética

Dos 88 indivíduos analisados, 37 apresentaram sítios heteroplásmicos, os quais foram designados utilizando o código internacional IUPAC (Fig. 4.2, Apêndice I). Vinte e sete haplótipos foram caracterizados em 464pb de indivíduos amostrados em 16 colônias reprodutivas no sudeste dos EUA e no Pantanal (Figs. 4.2 e 4.6, Apêndice II). O haplótipo H1 se encontrou representado em todas as colônias, enquanto que, o haplótipo H17 esteve presente em três colônias dos EUA (TW, PI e HP) e três do Pantanal (PF, BG e FI). Os dez haplótipos exclusivos das populações americanas encontraram-se representados por somente um indivíduo cada. Dos 15 haplótipos encontrados somente na população do Pantanal os haplótipos H11, H12, H14 e H26 foram identificados em pelo menos duas colônias.

Na tabela 4.1 estão apresentados os níveis de variabilidade genética das populações amostradas. A população do Pantanal apresentou índice de diversidade haplotípica ($h = 0.822$) mais alto do que o observado na população dos EUA ($h = 0.546$). Dentro das populações, a diversidade haplotípica variou de 0.666 (FI) a 0.952 (BG) no Pantanal, e de 0.000 (DD) a 0.900 (HP) nos EUA. O teste t de student, aplicado para testar as diferenças entre os valores de diversidade haplotípica observado nas colônias dentro de cada população, evidenciou uma diferença estatisticamente significativa entre elas (Teste- $t = 2.3503$, $P = 0.0351$) que foi ilustrado no gráfico apresentado na figura 4.3. Aplicando-se o mesmo teste aos dados de diversidade nucleotídica, no entanto, a diferença entre os níveis de variabilidade nesse parâmetro nas colônias amostradas nas duas populações não diferiu significativamente (Teste- $t = 0.6162$, $P = 0.5493$).

Sítios Polimórficos			
Haplótipos	00000000122222222223333334444		
Região	2345777920001111121456682455		
Controladora	25430591734513457803763911215	Pantanal	EUA
h1	CGGAGCCTCCCCCCTTTCACACCG-TA	19	27
h2-.-	0	1
h3M.....-.-	0	1
h4	..K.....-.-	0	1
h5	M.....-.-	0	1
h6	M...R.....-.-	0	1
h7RY.....-.-	0	1
h8RY.Y.....Y.....-.-	0	1
h9Y.....-.-	1	0
h10R.YY.....M.....-.-	1	0
h11Y.....YY.....-.-	2	0
h12R.Y.....YY.....-.-	5	0
h13Y.Y.....YY.....-.-	1	0
h14RY.Y.....YY.....-.-	6	0
h15RY.Y.....YY.....-.-	1	0
h16CCY.....-.-	0	1
h17AT.C.....CC.....-.-	3	3
h18AT.C.....CC.....T.....-.-	1	0
h19	.S.R.AYYC.....CC.....-.-	1	0
h20	.S.R.A.TC.....-.-	1	0
h21A.TC.....A.....ACC.....	1	0
h22	.G.A.A.TCT.T..G....T.A...AC..	0	1
h23	.G.R.A.YCT.T..S....T.A...AC..	0	1
h24	.G.A.A.TC.T..G....T.A...AC..	1	0
h25	.S.R.R.YY.T..G....Y.A...RC..	1	0
h26	.S.R.R.YC....S..YY.TWAT..AC..	2	0
h27	.S.R.R.TY....S..YY.TWAT..AC..	1	0

Figura 4.2. Sítios polimórficos dos haplótipos identificados nas seqüências do fragmento CRI de 88 indivíduos amostrados em 16 colônias reprodutivas do Pantanal e do sudeste dos EUA.

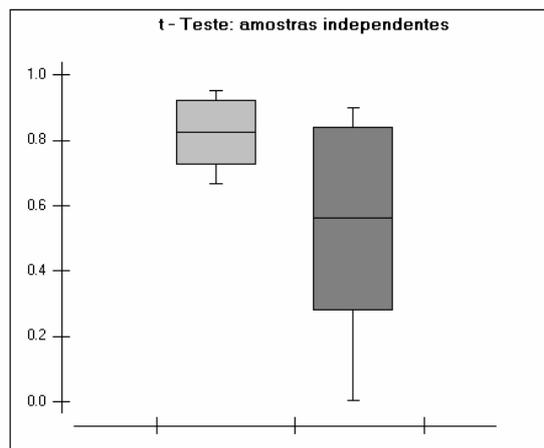


Figura 4.3. Gráfico do resultado do Teste *t* de student aplicado aos dados de diversidade haplotípica das colônias do Pantanal (cinza claro) e dos EUA (cinza escuro).

Tabela 4.1. Estimativas de variabilidade genética em cada colônia e nas populações do Pantanal e do sudeste dos EUA.

População	n	n° hap	<i>h</i>	π
Porto da Fazenda (PF)	8	6	0.928	0.0041
Tucum (TU)	8	5	0.857	0.0046
Baía de Gaíva (BG)	7	6	0.952	0.0014
Baía Bonita (BB)	6	4	0.800	0.0007
Rio Vermelho (RV)	4	3	0.833	0.0129
Fazenda Retirinho (FR)	7	4	0.714	0.0072
Piquiri (PQ)	4	3	0.833	0.0000
Fazenda Ipiranga (FI)	3	2	0.666	0.0072
Total Pantanal	48	17	0.822	0.0045
Chew Mill Pond (CM)	3	2	0.666	0.0000
Harris Neck (HN)	7	3	0.524	0.0012
Tamiami West (TW)	6	3	0.600	0.0043
Saint Simon (SS)	7	3	0.524	0.0074
Dee Dot (DD)	4	1	0.000	0.000
Pelican Island (PI)	7	4	0.714	0.0082
Heard's Pond (HP)	5	4	0.900	0.0037
Blackwater (BW)	1	1	---	---
Total EUA	40	12	0.546	0.0039

Legenda: n = indivíduos amostrados, n° hap = número de haplótipos detectados, *h* = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica.

Estrutura genética da população

O resultado da AMOVA global evidenciou a ocorrência de diferenciação genética significativa entre a população do Pantanal e a do sudeste dos EUA quando estas não foram subdivididas em colônias (Tab. 4.2). Resultado similar foi observado na análise hierárquica quando cerca de 6% da variância foi explicada pela variação entre as populações dessas duas regiões. Novamente, a estimativa de F_{st} obtida a análise das amostras coletadas no Pantanal e no sudeste dos EUA, sem a subdivisão em colônias, gerou um valor significativo ($F_{st} = 0.059$, $P = 0.004$), indicando existência de diferenciação genética entre essas unidades populacionais. A subdivisão das amostras em colônias na estimativa de AMOVA global não resultou na distinção das duas populações, dado este concordante com as estimativas de F_{st} par-a-par apresentadas na figura 4.4. Entre as colônias amostradas no Pantanal, o único resultado significativo de F_{st} par-a-par foi observado entre as colônias de FR e BG, e semelhantemente, entre as colônias dos EUA, somente um resultado de F_{st} diferiu significativamente de zero (CM e DD). Valores de F_{st} significativos foram observados também entre as colônias de BG, PF e FI amostradas no Pantanal e a colônia DD dos EUA.

Tabela 4.2. Dados de AMOVA obtidos nas análises do fragmento CRI de colônias reprodutivas de cabeças-secas dos EUA e do Pantanal.

Agrupamentos^a	Componentes da variância	% de variação	Estatística-F
EUA + Pantanal (total)	Entre populações	5.88	$F_{st} = 0.059^*$
	Dentro das populações	94.12	
EUA + Pantanal (colônias)	Entre populações	0.97	$F_{st} = 0.009$
	Dentro das populações	99.03	
EUA vs. Pantanal (colônias)	Entre grupos	6.30	$F_{ct} = 0.063^*$
	Entre populações dentro dos grupos	-2.43	$F_{sc} = -0.026$
	Dentro das populações	96.13	$F_{st} = 0.039$

^a total = análise da amostra sem subdivisão em colônias; colônias = análise da amostra subdividida em colônias. * $P < 0.05$.

	BG	BB	FR	RV	PF	TU	PQ	FI	CM	HN	TW	SS	DD	PI
BB	0.00314													
FR	0.09259	-0.05867												
RV	0.03041	-0.08711	-0.13240											
PF	-0.07463	-0.06667	0.03898	-0.01408										
TU	0.06286	-0.02128	0.08134	0.03203	-0.00251									
PQ	-0.00782	-0.15129	-0.07475	-0.11111	-0.05109	-0.08367								
FI	0.01894	-0.11628	-0.12228	-0.13580	-0.04348	0.05714	-0.13580							
CM	0.06835	-0.11628	-0.12228	-0.13580	0.00617	0.05714	-0.13580	-0.20000						
HN	0.17803	-0.02439	-0.04598	-0.02836	0.10965	0.15372	-0.02836	-0.11149	-0.11149					
TW	0.11227	-0.05000	-0.06356	-0.06024	0.04901	0.11656	-0.06024	-0.25806	-0.13043	-0.07117				
SS	0.17803	-0.02439	-0.04598	-0.02836	0.10965	0.15372	-0.02836	-0.11149	-0.11149	-0.06944	-0.07117			
DD	0.33806	0.11111	0.05724	0.16667	0.25448	0.30435	0.16667	0.11111	0.11111	-0.02156	0.01370	-0.02156		
PI	0.07197	-0.05867	-0.06061	-0.07475	0.01868	0.08134	-0.07475	-0.21471	-0.12228	-0.04598	-0.10583	-0.04598	0.05724	
HP	-0.01476	-0.06047	-0.03938	-0.08541	-0.04609	0.02588	-0.08541	-0.19612	-0.09037	0.02063	-0.06452	0.02063	0.19463	-0.08005

Figura 4.4. Dados *Fst* par-a-par computados utilizando cálculo de estatística-*F* convencional. Valores significativos ($P < 0.05$) estão indicados dentro dos boxes. Colônias amostradas no Pantanal: Baía de Gaíva (BG), Baía Bonita (BB), Fazenda Retirinho (FR), Rio Vermelho (RV), Porto da Fazenda (PF), Tucum (TU), Piquiri (PQ) e Fazenda Ipiranga (FI) e Colônias amostradas no sudeste dos EUA: Chew Mill Pond (CM), Harris Neck (HN), Tamiami West (TW), St. Simon (SS), Dee Dot Ranch (DD), Pelican Island (PI) e Heard’s Pond (HP).

História demográfica

O teste de neutralidade de Fu aplicado às seqüências do fragmento CRI resultou em valores significativos em ambas as populações investigadas (Pantanal, $F_s = -11.173$, $P = 0.000$; EUA, $F_s = -5.536$, $P = 0.004$). Os gráficos de distribuição das diferenças pareadas (“mismatch distribution”) se apresentaram como uma curva bimodal para a amostra do Pantanal e multimodal para os dados dos EUA (Fig. 4.5). Entretanto, o teste da soma dos desvios dos quadrados foram não-significativos para ambas as populações (Pantanal, $SSD = 0.055$, $P = 0.327$; EUA, $SSD = 0.043$, $P = 0.083$), indicando que as curvas não diferiram do modelo esperado de expansão demográfica.

A rede de haplótipos gerada a partir dos dados das seqüências do fragmento CRI e os agrupamentos utilizados na NCA estão apresentados na figura 4.6. Quando considerados todos os haplótipos identificados (i.e., Pantanal e EUA analisadas em conjunto) a hipótese nula de “ausência de associação entre os haplótipos e sua distribuição geográfica” é rejeitada em três clados, porém a análise não gerou inferências conclusivas nesses clados (Tab. 4.3). A análise dos haplótipos observados somente na população dos EUA não produziu resultado significativo. A análise dos haplótipos identificados somente na população do Pantanal, identificou fluxo gênico restrito com isolamento pela distância e expansão demográfica como os dois eventos que poderiam explicar à rejeição da hipótese nula (Tab. 4.3).

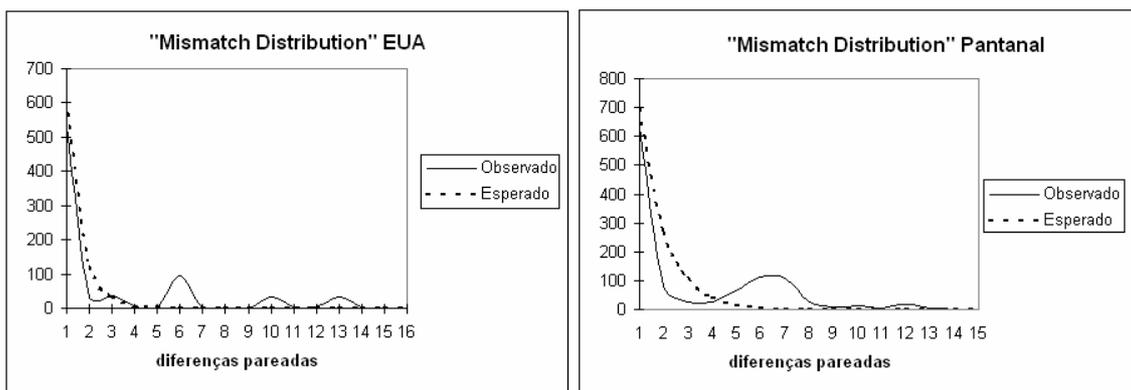


Figura 4.5. Gráficos das curvas de “mismatch distribution” esperadas e observadas na análise da população amostrada no Pantanal e no sudeste dos EUA.

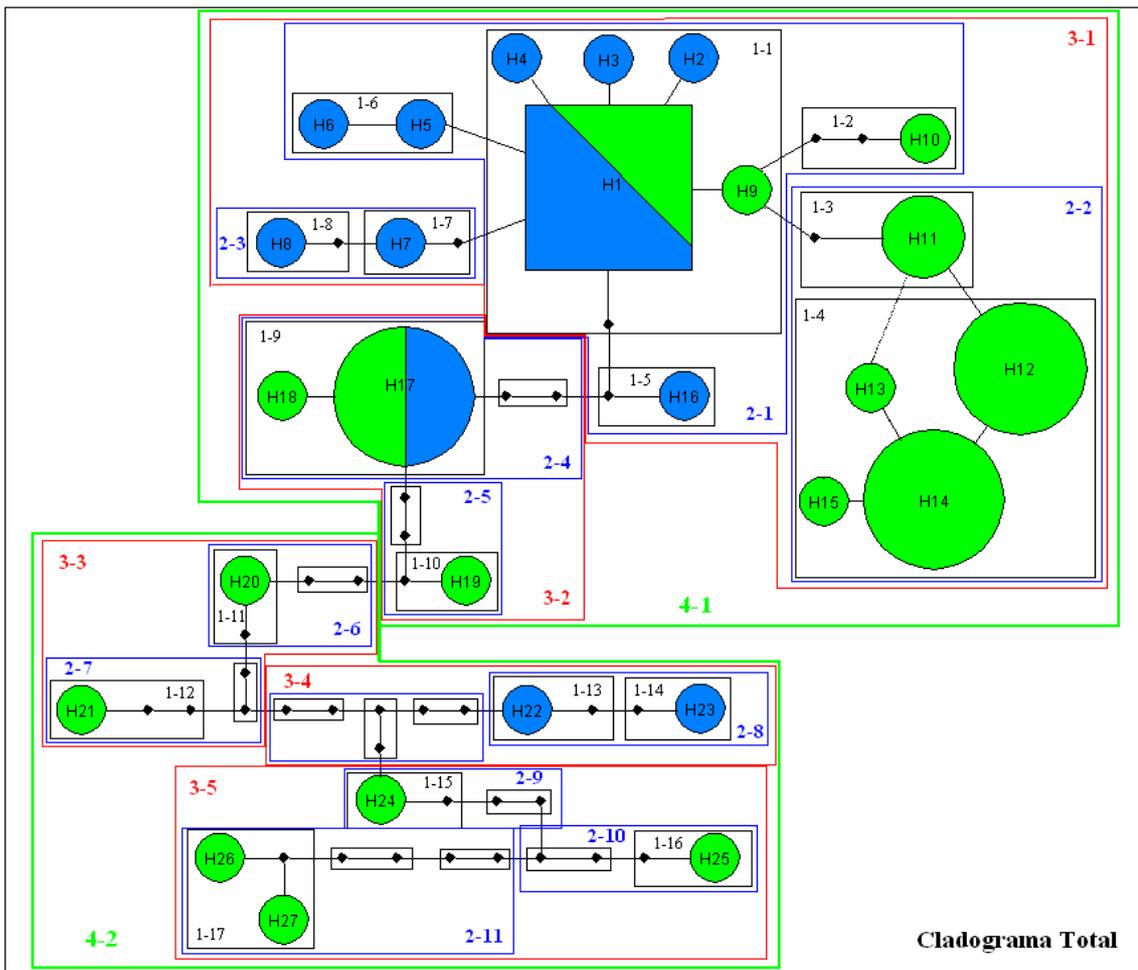


Figura 4.6. Rede de haplótipos e os agrupamentos para a realização da NCA. Haplótipos identificados nas populações do Pantanal (verde) e no sudeste dos EUA (azul) estão com a mesma notação usada na tabela 4.2. Os pontos pretos indicam os haplótipos intermediários não amostrados.

Tabela 4.3. Interpretação dos resultados significativos observados na “Nested Clade Analysis” dos dados apresentados na figura 4.5.

Clado	Chave de inferência	Evento demográfico
Pantanal + EUA		
3-1	1N 2adN 3Y 5Y 15Y 16N 18N	Amostragem inadequada para discriminar entre fragmentação, expansão ou isolamento pela distância.
4-2	1Y 19Y 20N	Amostragem inadequada
Cladograma Total	1N 2N 11N 17N	Não conclusivo
Pantanal		
3-1	1N 2acdY 3N 4N	Fluxo gênico restrito com isolamento pela distância
4-1	1N 2N 11bcY (expansão) 12 N	Expansão contínua
Cladograma Total	1N 2N 11bcY (expansão) 12 N	Expansão contínua

Discussão

Evidências de heteroplasma pontual em Mycteria americana

A observação de picos duplos em várias posições das seqüências é indicativa da ocorrência de heteroplasma, condição que se caracteriza pela presença de mais de uma cópia do DNAmít no genoma de um indivíduo. Diferenças de tamanho entre os fragmentos, devido às inserções/deleções de repetições adjacentes características da região controladora de aves já foram reportadas para muitas espécies (Berg *et al.*, 1995; Kidd & Friesen, 1998; Crochet & Desmarais, 2000; Kvist *et al.*, 2003), inclusive no domínio III da região controladora de cabeça-seca (Lopes *et al.*, 2006). Burg e Croxall (2001) observaram heteroplasma pontual no domínio I de duas espécies de albatrozes (*Thalassarche melanophris* e *T. impavida*). Embora o DNAmít seja predominantemente transmitido pela mãe à prole na maioria das espécies, inclusive nas aves, a heteroplasma pode ser gerada por mutações somáticas nos ovócitos ou pela passagem de mitocôndrias paternas durante a fertilização (Kvist *et al.*, 2003). A análise das seqüências da região controladora de três pares de irmãos foi utilizada para verificação da origem dos padrões de heteroplasma observados no domínio III da região controladora de cabeça-seca, quando se comprovou que a mutação havia sido matematicamente transmitida (Lopes *et al.*, 2006). A exemplo do

estudo acima citado, pretendemos investigar os padrões tidos como heteroplásmicos em pares irmãos com a finalidade de esclarecer sobre a origem das mutações. Ambigüidades nas seqüências também podem ser decorrentes da ocorrência de cópias nucleares. No entanto, no presente estudo, essa suposição pôde ser descartada pois os primers utilizados foram desenhados especificamente para a cabeça-seca com base em clones da região controladora dessa espécie (Lopes, 2002). Portanto, as ambigüidades observadas devem ser resultantes da ocorrência de heteroplasmia e não da inserção de cópias mitocondriais no genoma nuclear.

Diversidade genética EUA x Pantanal

Vários estudos têm demonstrado que a diversidade genética pode ser perdida como consequência dos gargalos populacionais (Frankham *et al.*, 2002). O efeito do declínio populacional na variabilidade genética de uma espécie depende de sua intensidade e do número de gerações atingidas pelo processo. Kushlan e Froghring (1986) registraram o declínio de 75% da população reprodutiva de cabeças-secas do sul da Flórida em 15 anos. Apesar da ocorrência de colônias reprodutivas da espécie ao longo de vários pontos na costa do Golfo, a grande maioria da população reprodutiva dos EUA (>75%) utilizava as áreas alagáveis do sul da Flórida para nidificar (Coulter *et al.*, 1999). Não existem estimativas do tempo de geração nessa espécie, no entanto, considerando-se que a longevidade na natureza varia de sete a onze anos e que a primeira reprodução acontece por volta dos 4 anos de vida (Coulter *et al.*, 1999), pode-se supor que o período mais crítico de redução populacional atingiu pelo menos duas gerações.

Para verificar se a variabilidade genética da população de cabeças-secas dos EUA foi perdida em função do declínio sofrido pela mesma, seus níveis de diversidade genética foram investigados. Primeiramente foram utilizados 20 sistemas alozímicos (Stangel *et al.*, 1990) e as estimativas de heterozigosidade entre 7.7 e 10.6% foram consideradas altas quando comparadas às estimativas de variabilidade baseadas nos loci alozímicos, em outras espécies de aves (Evans, 1987). Os dados levantados por Van Den Bussche *et al.* (1999) utilizando quatro loci de microssatélites, no entanto, evidenciaram níveis de heterozigosidade entre 28.1 e 56.9%, valores considerados baixos e similares aos observados para outras espécies de vertebrados que haviam sofrido intensos gargalos populacionais. O primeiro estudo realizado na população reprodutiva do Pantanal, para a

qual não existem registros de declínio recente, evidenciou a ocorrência de níveis de variabilidade similares para os sistemas alozímicos quando comparada à população dos EUA (Del Lama *et al.*, 2002). Estes dados foram indicativos de que o declínio sofrido pela população dos EUA não havia sido suficientemente intenso para promover erosão da diversidade genética alozímica, ou ainda que a baixa diversidade genética fosse uma característica da espécie. Análises comparativas posteriores entre essas duas populações, envolveram primeiramente os quatro loci de microssatélites analisados nas populações dos EUA (Rocha *et al.*, 2004), e depois outros dez loci, prospectados e analisados no mesmo laboratório para essas duas populações (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, *in prep*). As informações geradas nesses dois trabalhos revelaram níveis de heterozigosidade baixos, porém semelhantes entre as duas populações, com destaque para a redução no número de alelos raros na população dos EUA, como esperado para populações que sofreram redução populacional (Nei *et al.*, 1975).

Baseando-se na análise de parte da região controladora do DNAm_{it}, o presente estudo evidenciou diferenças significativas entre o nível de diversidade haplotípica (Teste- $t = 2.4942$, $P = 0.0268$) das colônias amostradas no Pantanal e nos EUA, porém, o nível de diversidade nucleotídica detectado foi similar entre as colônias de ambas as populações (Teste- $t = 0.6162$, $P = 0.5493$) (tabela 4.1). A estimativa de diversidade haplotípica é uma medida equivalente à heterozigosidade calculada para os dados diplóides, enquanto que, a diversidade nucleotídica é uma medida da diversidade calculada a nível nucleotídico. A diversidade nucleotídica é mais informativa porque é calculada com base tanto no número de haplótipos quanto nas diferenças nucleotídicas existente entre eles, porém este parâmetro é pouco informativo quando se deseja testar os efeitos de perda de variabilidade em decorrência de gargalos populacionais. A diversidade haplotípica é fortemente afetada pela eliminação de haplótipos raros que acontece quase imediatamente após o gargalo, enquanto que, a diversidade nucleotídica reflete uma mudança menos dramática na média das diferenças entre os haplótipos (Maruyama & Fuerst, 1985). A diferença no grau de significância entre essas duas medidas, quando aplicada aos nossos dados, pode estar refletindo os efeitos do recente declínio ocorrido na população dos EUA. Análises prévias utilizando dados provenientes de marcadores nucleares (microssatélites e alozimas), não evidenciaram o menor nível de heterozigosidade na população dos EUA em comparação com o Pantanal provavelmente devido às características desses marcadores moleculares. Por serem marcadores recombinantes e bi-parentalmente herdados, a variabilidade

observada nos marcadores nucleares requer um número maior de gerações para ser erodida. Por outro lado, a diversidade haplotípica do DNAmít é mais rapidamente afetada pelos efeitos de declínios populacionais devido ao seu tamanho efetivo quatro vezes menor (Avice, 1994; Frankham *et al.*, 2002).

O nível de diversidade haplotípica reduzida no DNAmít da população dos EUA pode ser explicada, alternativamente, pelos efeitos históricos (e.g., recente expansão demográfica ou gargalos históricos) já hipotetizados por Van Den Bussche *et al.*, (1999). Esta hipótese poderá ser testada futuramente através da análise da variabilidade do DNAmít de amostras de espécimens de museu, coletados antes do declínio populacional do século passado.

Estimativas de subdivisão populacional

Ausência de diferenciação genética foi evidenciada na maioria dos resultados de F_{st} par-a-par entre as colônias amostradas nos EUA e no Pantanal. Apenas as comparações entre duas colônias nos EUA (CM e DD; $F_{st} = 0.111$) e duas no Pantanal (FR e BG; $F_{st} = 0.092$) produziram valores significativos ($P < 0.05$). Todas as demais comparações apresentaram valores não significativos, indicando ausência de estruturação tanto na população do sudeste dos EUA como no Pantanal.

Resultados similares foram observados nas análises dessas populações utilizando marcadores nucleares (Van Den Bussche *et al.*, 1999; Del Lama *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004) e mitocondriais (Lopes *et al.*, 2006). Fluxo gênico intenso e a recente colonização com expansão dessas populações foram as alternativas levantadas nos trabalhos anteriores para explicar a homogeneização genética das colônias dentro dessas regiões. Estes argumentos foram também evidenciados no estudo utilizando marcador de DNAmít restrito às colônias do Pantanal (Lopes *et al.*, 2006) e parecem ser procedentes na presente análise.

Um padrão diferente foi observado nas colônias dos EUA por Stangel *et al.*, (1990) e por Tomasulo-Seccomandi *et al.* (*in prep*), respectivamente, utilizando alozimas ($F_{st} = 0.019$, $P < 0.05$) e microssatélites ($F_{st} = 0.041$, $P = 0.000$). A estruturação genética entre as colônias do sudeste dos EUA evidenciada pelos dados de microssatélites foi explicada pelo efeito da deriva na fragmentação das colônias nos EUA.

Tendo em vista a homogeneidade genética entre as colônias dos EUA e entre as colônias do Pantanal, nas análises posteriores essas colônias foram agrupadas em dois grandes grupos: o Pantanal e o EUA. As análises populacionais subsequentes revelaram resultados significativos de diferenciação genética ($F_{st} = 0.059$, $P = 0.004$), indicando subdivisão populacional entre Pantanal e EUA. Esses dados são corroborados por estudos prévios realizados nessa espécie, utilizando quatro loci de microssatélites ($F_{st} = 0.044$, $P < 0.0001$), microssatélites e alozimas ($F_{st} = 0.023$, $P < 0.0001$) (Rocha *et al.*, 2004) e no estudo com dez loci de microssatélites ($F_{st} = 0.036$, $P = 0.000$) (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, *in prep*). O fluxo gênico restrito pela distância foi um dos eventos apontados pela NCA para explicar a estrutura genética da população de cabeças-secas no Pantanal, utilizando seqüências do domínio III da região controladora do DNAmít (Lopes *et al.*, 2006). Baseando-se nas inferências de isolamento pela distância, obtidas nas análises restritas ao Pantanal, e a localização das populações do Pantanal e dos EUA nos extremos de distribuição da espécie, pode-se hipotetizar que a distância geográfica seja o principal fator limitante do fluxo gênico contemporâneo entre essas populações.

História demográfica

A ocorrência de processos histórico-populacionais comuns, envolvendo a população dos EUA e do Pantanal, foi anteriormente hipotetizada por Rocha *et al.* (2004), como uma das possíveis causas da baixa diferenciação genética entre essas populações. A NCA, denominada por Templeton (2004) como filogeografia estatística, foi aplicada à rede de haplótipos na tentativa de se obter resultados mais objetivos dos padrões filogeográficos observados. Entretanto, a NCA utilizando seqüências do fragmento CRI e incluindo ambas as populações não produziu resultados conclusivos (Tab. 4.3). A ausência de inferências conclusivas na NCA do cladograma envolvendo as duas regiões se deve essencialmente à ausência de amostras representantes das populações intermediárias entre os dois pontos geográficos extremos. Apesar de menos objetiva, a simples observação do cladograma e a análise da distribuição dos haplótipos permite-nos visualizar a presença de um haplótipo comum à todas as colônias (H1), proximamente relacionado aos haplótipos detectados em baixa frequência ou privados e geograficamente restritos à uma ou poucas colônias (Clado 3-1). Este padrão observado é típico da existência de baixo nível de fluxo gênico contemporâneo entre populações fortemente relacionadas num passado recente (Categoria

V designada por Avise, 2000). A teoria de coalescência prevê que os haplótipos posicionados no interior do cladograma são ancestrais dos haplótipos localizados nas pontas (originados mais recentemente) (Castelloe & Templeton, 1994). Logo, o compartilhamento de haplótipos (e.g., H1 e o H17) entre as populações do Pantanal e dos EUA provavelmente se deve mais à retenção de haplótipos ancestrais do que à ocorrência de fluxo gênico contemporâneo entre essas duas populações. Templeton (1998) alerta para o fato de que a existência de “gaps” na amostra geralmente impede a distinção entre os efeitos do fluxo gênico restrito, devido ao isolamento pela distância (evento recorrente), e da fragmentação (evento histórico). A amostragem e análise de colônias intermediárias entre o Pantanal e o sudeste dos EUA poderão vir a esclarecer o padrão filogeográfico vigente.

Hipotetizamos, no entanto, que uma intensa troca gênica entre o Pantanal e EUA aconteceu provavelmente num período em que estas populações se encontravam mais próximas geograficamente, condição essa que propiciou o estabelecimento da relação genética atual. Mudanças no clima e na vegetação, ocorridas no passado em consequência dos ciclos glaciais (Bennett, 1990; Burnham & Graham, 1999), podem ter sido os fatores responsáveis pelo cenário atual. Durante o último período glacial do Pleistoceno (entre 25.000 e 12.000 anos atrás), o clima do planeta se modificou devido principalmente à diminuição da temperatura e precipitação. No hemisfério norte, a expansão e retração das geleiras parece ser responsável por grande parte dos padrões filogeográficos e da distribuição da fauna e da flora observada atualmente nesta região (Pielou, 1991). Na região tropical, os padrões são menos claros, mas estima-se que a temperatura na região tropical diminuiu entre 4 e 12°C (Stute *et al.*, 1995; Colinvaux, 1998) e o clima esteve mais seco (Clapperton, 1993). A associação entre os períodos glaciais e a modificação na distribuição das espécies e os eventos de especiação é assunto controverso, mas Junk (2003) afirma que os eventos paleoclimáticos provocaram mudanças dramáticas nas áreas alagáveis e na biodiversidade desses ecossistemas. Por exemplo, a maioria das extensas áreas alagáveis existentes atualmente na América do Sul (e.g., Alto Araguaia e Pantanal) depende da acumulação das águas das chuvas e, devido à predominância do clima mais seco, estas áreas permaneceram secas na última glaciação (Junk, 2003). Por outro lado, a bacia do Rio Amazonas, apesar de apresentar temperatura média 5°C mais baixa e clima mais seco do que o atual, continuou possuindo áreas periodicamente inundáveis durante o

último período glacial (Haffer & Prance, 2001; Junk, 2003). Embora as mudanças climáticas ocorridas durante no final do Pleistoceno possam não ter atingido todas as espécies na mesma intensidade, é provável que essas alterações tenham ocasionado um profundo impacto na distribuição de espécies de aves aquáticas, altamente dependentes de faixas de águas rasas para forragear. Hipotetizamos que, durante o último período glacial, essas aves se deslocaram para regiões próximas do equador onde as mudanças climáticas não foram tão extremas e onde áreas de forrageamento permaneceram disponíveis (Colinvaux *et al.*, 2000; Colinvaux & de Oliveira, 2001; Junk, 2003). Futuras análises de colônias localizadas no norte da América do Sul e/ou na América Central auxiliarão na confirmação ou rejeição dessa hipótese.

A subsequente colonização (ou recolonização) do Pantanal e do sul dos EUA pelos cabeças-secas após o término do último período glacial pode explicar os indícios de expansão demográfica detectados no teste de neutralidade de F_s e na “mismatch distribution”. Ramos-Onsins e Rozas (2002) apontam o teste de F_s de F_u como um dos mais poderosos nas inferências de crescimento populacional. Este tipo de teste gera valores de F_s significativos ($P < 0.02$) em decorrência do excesso de mutações características de expansão populacional. O teste foi aplicado considerando a população total de cada região, dado que tamanhos amostrais maiores permitem uma maior precisão nas estimativas de F_s (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Apesar dos gráficos da “mismatch distribution” não terem apresentado distribuição unimodal, como esperado nos casos de expansão populacional, os valores de SSD significativos (Pantanal, SSD = 0.055, $P = 0.327$; EUA, SSD = 0.043, $P = 0.083$) indicaram que as curvas não diferiram do modelo esperado de expansão demográfica.

A NCA dos haplótipos observados somente na população dos EUA não produziu nenhum resultado significativo. A falha na produção de resultados significativos na NCA pode ter acontecido devido aos fatores biológicos, como alto fluxo gênico contemporâneo ou associação histórica entre as colônias, ou devido ao poder estatístico insuficiente em decorrência do pequeno tamanho amostral ou amostragem geográfica inadequada. A observação da distribuição e frequência dos haplótipos detectados, no entanto, evidencia a ocorrência de um haplótipo amplamente distribuído acompanhado de haplótipos geograficamente localizados em baixa frequência que é um padrão indicativo tanto de fluxo gênico intenso como de expansão populacional (Larson, 1984). A ocorrência da

expansão demográfica nessa população também foi evidenciada pelo teste de neutralidade de Fu ($F_s = -5.536$, $P = 0.004$). Resultados menos conclusivos de expansão populacional detectados na amostra dos EUA podem ter sido influenciados pelo declínio recente sofrido por esta população, entre as décadas de 30 e 70. A inclusão de amostras obtidas antes do gargalo poderia elucidar esse padrão.

A NCA realizada separadamente para os haplótipos identificados somente na população do Pantanal, indicou ocorrência de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância e expansão demográfica na região. Estes mesmos eventos foram detectados na NCA dessa população utilizando seqüências do domínio III da região controladora do DNAmít (Lopes *et al.*, 2006). Resultados indicativos de expansão populacional foram também evidenciados no teste de neutralidade de Fu. As análises realizadas neste estudo, em concordância com análises prévias (Lopes *et al.*, 2006), indicaram que as mudanças climáticas na região do Pantanal ocorridas durante o Pleistoceno provavelmente impediram o estabelecimento das colônias reprodutivas na área. Autores como Ab'Saber (1977) e Clapperton (1993) propuseram que a região do Pantanal apresentava um clima árido, enquanto que, Boggiani e Coimbra (1995) sugeriram a ocorrência de um clima semi-árido com chuvas ocasionais. Estudos realizados nas áreas vizinhas ao Pantanal identificaram um clima mais úmido do que o previamente sugerido para a América do Sul (de Oliveira, 1992; Ledru *et al.*, 1996; Ferraz-Vicentini & Salgado-Laboriau, 1996; Assine & Soares, 2004). Apesar desse debate acerca do grau de umidade existente no último período glacial, estima-se que a formação da planície alagável, observada atualmente na região do Pantanal, tenha ocorrido na transição do Pleistoceno/Holoceno (10.200-5.190) (Bezerra, 1999; Assine & Soares, 2004) período em que também se estabeleceu a vegetação do sudeste e do centro-oeste brasileiro (de Oliveira, 1992; Barbieri *et al.*, 2000; Behling, 2002; Assine & Soares, 2004). Dado à necessidade da existência não somente de umidade, mas também de lagoas rasas com alta concentração de peixes para forrageamento e de vegetação adequada para a construção de ninhos, a expansão da população de cabeças-secas na região do Pantanal está provavelmente associada à recente formação desta planície alagável.

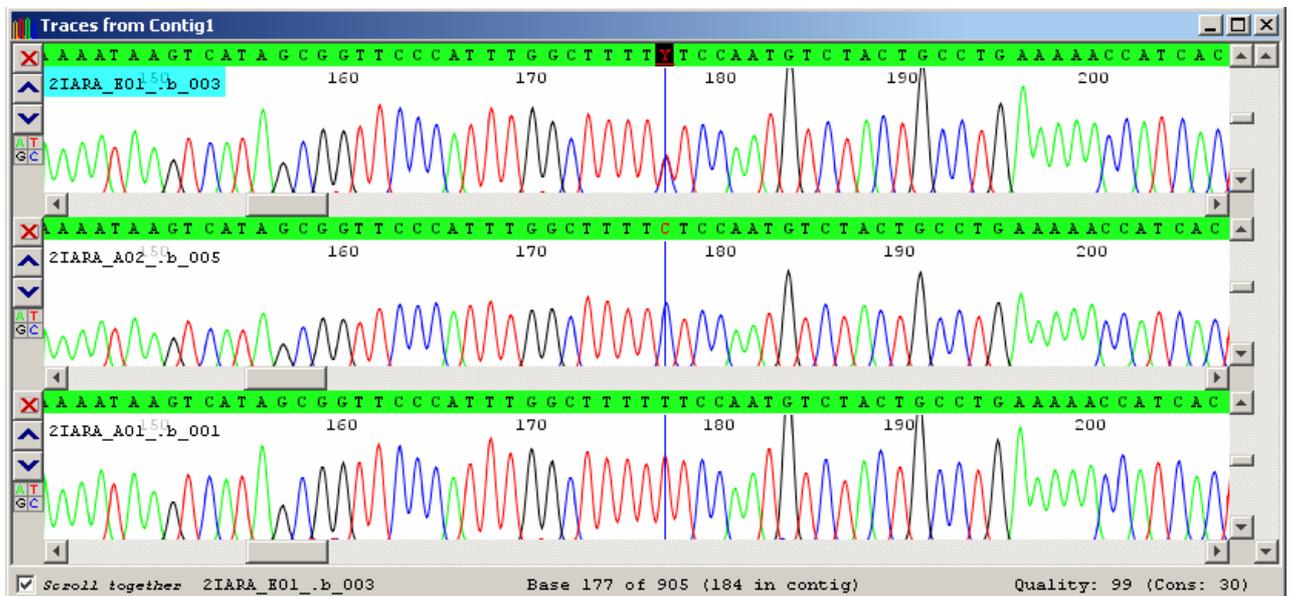
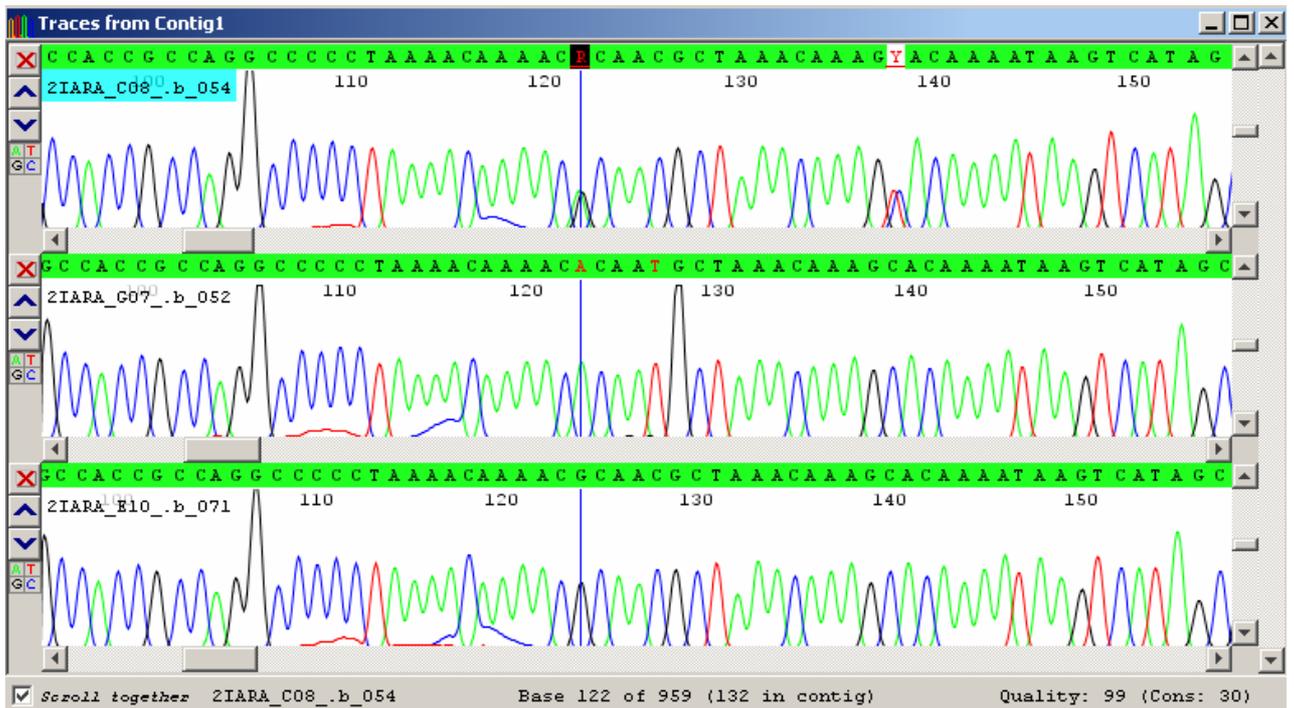
Resultados indicativos de expansão populacional foram também evidenciados nas análises de seqüências da região controladora de tuiuiús (*Jabiru mycteria*) (Lopes *et al.*, *in prep*) e colhereiros (*Platalea ajaja*) (Santos, 2005), amostrados nas mesmas regiões do

Pantanal, como esperado para espécies com biologia e distribuição geográfica semelhantes. Os resultados obtidos no presente estudo, em conjunto com os resultados prévios levantados para os cabeças-secas (Lopes *et al.*, 2006) e para as outras espécies de aves aquáticas (Lopes *et al.*, *in prep*; Santos, 2005), podem contribuir para o melhor entendimento dos fenômenos paleoclimáticos que acometeram a região do Pantanal durante o última glaciação e dos processos evolutivos predominantes na diferenciação populacional nesse grupo de aves aquáticas neotropicais.

Implicações conservacionistas

Os resultados das nossas análises genéticas evidenciaram pela primeira vez um nível de diversidade genética menor na população de cabeças-secas dos EUA em comparação com a população do Pantanal. O nível reduzido de diversidade haplotípica detectado na população dos EUA pode ser o reflexo do intenso declínio sofrido por esta população no século passado, no entanto, investigações do nível de diversidade de amostras obtidas antes do gargalo são requeridas para avaliação da extensão da perda de variabilidade intrapopulacional. A ausência de diferenciação genética entre as colônias amostradas tanto no Pantanal como nos EUA indica que as colônias, como já evidenciado com marcadores nucleares, não representam unidades demográficas para a conservação. Embora nossa análise filogeográfica indique que essas populações apresentaram níveis de fluxo gênico mais altos no passado, a atual estruturação genética observada entre a população do Pantanal e a dos EUA é indicativa do limitado fluxo gênico contemporâneo entre essas populações que devem, portanto, ser tratadas como unidades de manejo distintas.

Apêndice I. Eletroferogramas dos padrões normais e heteroplásmicos.



Apêndice II. Distribuição dos haplótipos em cada colônia amostrada.

Haplótipos	Colônias																
	PF	TU	BG	BB	RV	FR	PQ	FI	CM	HN	TW	SS	DD	PI	HP	BW	
H1	2	2	1	3	2	4	2	2	2	5	4	5	4	4	2	1	
H2											1						
H3												1					
H4									1								
H5														1			
H6																1	
H7										1							
H8																1	
H9			1														
H10		1															
H11			1				1										
H12	2		2	1													
H13			1														
H14	1	3		1			1										
H15				1													
H16										1							
H17	1		1					1			1			1	1		
H18		1															
H19	1																
H20						1											
H21		1															
H22												1					
H23														1			
H24					1												
H25	1																
H26					1	1											
H27						1											

Colônias: Fazenda Ipiranga (FI), Porto da Fazenda (PF), Baía de Gaíva (BG), Baía Bonita (BB), Fazenda Retirinho (FR), Rio Vermelho (RV), Tucum (TU), Piquiri (PQ), Chew Mill Pond (CM), Harris Neck (HN), Heard's Pond (HP), Blackwater (BW), Dee Dot Ranch (DD), St. Simon (SS), Pelican Island (PI) e Tamiami West (TW).

Conclusões Finais

Variabilidade genética

Para a espécie *Jabiru mycteria* foram observados níveis de variabilidade similares entre as amostras contemporâneas coletadas na América do Sul, enquanto que, a população da América Central apresentou ausência de variabilidade nas análises envolvendo seqüências do DNAmít (CRI e ND2) e variabilidade mais baixa nas análises envolvendo os quatro loci de microssatélites heterólogos. As análises comparativas do fragmento CRI entre amostras contemporâneas (2000 - 2006) e históricas (1882 - 1966), coletadas na América Central e no norte da América do Sul, demonstraram redução, ainda que não significativa, da diversidade nos fragmento de DNAmít estudados.

A população de *Mycteria americana* amostrada no sudeste dos EUA apresentou nível de diversidade haplotípica significativamente menor quando comparada à população do Pantanal. Esta foi a primeira demonstração da ocorrência de níveis diferentes de variabilidade entre estas populações.

Os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica, estimados para o fragmento CRI do DNAmít, apresentou valores similares para ambas as espécies da família Ciconiidae amostradas na região do Pantanal brasileiro.

Estrutura genética da população

As análises de diferenciação genética, utilizando os três marcadores moleculares (CRI, ND2 e microssatélites), sugerem a existência de diferenciação genética entre as populações de tuiuiú coletadas contemporaneamente. Em contraste, os resultados obtidos nas estimativas de subdivisão populacional utilizando o fragmento CRI nas amostras dos museus não indicaram diferenciação genética entre as localidades investigadas.

As estimativas de estruturação populacional demonstraram não haver diferenciação genética significativa entre as colônias de nidificação de cabeças-secas tanto no sudeste dos EUA como no Pantanal. Resultados indicativos de diferenciação genética significativa entre a população do Pantanal e dos EUA sugerem que a ocorrência de fluxo gênico contemporâneo entre essas duas populações é limitado.

Padrões histórico-demográficos

Amostras de tuiuiús coletadas no norte da América do Sul e na América Central não apresentaram fortes indícios de expansão populacional, em concordância com o esperado para populações que permaneceram estáveis durante os períodos glaciais.

As análises dos haplótipos do fragmento CRI do DNAmít detectados nas populações de cabeças-secas do Pantanal e dos EUA evidenciaram a ocorrência de intenso fluxo gênico histórico entre essas populações. Com base nesses dados, hipotetizamos que durante os períodos glaciais, as populações do Pantanal e dos EUA se deslocaram para regiões próximas do equador, onde as mudanças climáticas não foram tão extremas, permitindo assim a ocorrência de trocas gênicas entre elas.

Os resultados indicativos de expansão demográfica das populações de tuiuiús e cabeças-secas na região do Pantanal estão de acordo com os estudos que apontam a recente formação desta planície alagável.

Implicação conservacionistas

Nossas análises indicaram que a população de tuiuiús da América Central apresenta atualmente nível diversidade haplotípica oito vezes menor do que o apresentado no início do século passado. Similarmente, a população de cabeças-secas do sudeste dos EUA apresentou nível de diversidade haplotípica significativamente menor quando comparada à população do Pantanal. Ambas as espécies estudadas são sensíveis à degradação ambiental e é provável que esses níveis de diversidade haplotípica reduzidos sejam reflexo do declínio demográfico sofrido por essas populações.

À luz dos nossos resultados e dos vários estudos ecológicos anteriores, está claro que para garantir a conservação dessas espécies, é de crucial importância a preservação das áreas alagáveis críticas para forrageamento e reprodução das mesmas. A utilização dessas espécies como “espécies-bandeiras” em campanhas de sensibilização da opinião pública para a preservação dos ecossistemas de áreas alagáveis, é uma das estratégias que deve ser melhor explorada podendo também auxiliar na proteção conjunta de outras espécies dependentes desse ecossistema.

Referências Bibliográficas

- AB'SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. **Boletim do Instituto de Geografia de São Paulo**, n. 52, p. 1-21, 1977.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. Units of Conservation. In: **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing, 2007.
- ANTAS, P.T.Z. Migration and other movements among the lower Paraná River valley wetland, Argentina, and the south Brazil/Pantanal wetlands. **Bird Conservation International**, v. 4, p.181-190, 1994.
- ANTAS, P.T.Z.; NASCIMENTO, I.L.S. **Sob os céus do Pantanal**: Brasil: biologia e conservação do Tuiuiú: *Jabiru mycteria*. SP: Empresa das Artes, 1996.
- ARBOGAST, B.S.; KENAGY G.J. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal of Biogeography**, n. 28, p. 819-825, 2001.
- ARNOLD, K.A. A Jabiru (*Jabiru mycteria*) specimen from Texas. **Auk**, n. 95, p. 611-612, 1977.
- ASSINE, M.L.; SOARES P.C. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. **Quaternary International**, n. 114, p. 23-34, 2004.
- AVISE, J.C. *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge. 447 pp., 2000.
- AVISE, J.C.; AQUADRO, C.F. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates - patterns and correlations. **Evolutionary Biology**, n. 15, p. 151-185, 1982.
- BARBERI, M.; SALGADO-LABOURIAU, M.L.; SUGUIO, K. Paleovegetation and paleoclimate of "Vereda de Águas Emendadas", central Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, n. 13, p. 241-254, 2000.
- BARNHILL, R.A. *et al.* Breeding biology of Jabirus (*Jabiru mycteria*) in Belize. **Wilson Bulletin**, n. 117, p. 142-153, 2005.
- BARROWCLOUGH, G.F. Biochemical studies of microevolutionary processes. In: BRUSH, A.H.; CLARK JR., G. A. (Ed.). **Perspectives in ornithology**. Cambridge: University of Cambridge Press, 1983.
- BEHLING, H. South and Southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology**, n. 177, p.19-27, 2002.

- BENNETT, K.D. Milankovitch cycles and their effects on species in ecological and evolutionary time. **Paleobiology**, n. 16, p. 11-21, 1990.
- BERG, T.; MOUM, T.; JOHANSEN, S. Variable numbers of simple tandem repeats make birds of the order Ciconiiformes heteroplasmic in their mitochondrial genomes. **Current Genetics**, n. 27, p. 257-262, 1995.
- BEZERRA, M.A.O. **O Uso de multi-traçadores na reconstrução do Holoceno no Pantanal Matogrossense, Corumbá**. 1999. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1999.
- BILDSTEIN, K.L. *et al.* Approaches to the conservation of wetlands in the western hemisphere. **Wilson Bulletin**, n. 103, p. 218-254, 1991.
- BLAKE, E.R. **Manual of neotropical birds**. Chicago: University of Chicago Press, 1977.
- BOUTON, S.N. **Ecoturismo nos ninhalis de ave pernalta no Pantanal brasileiro: implicações ecológicas e sócio-econômicas**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências). Florida: University of Florida, 1999.
- BOUTON, S.N.; FREDERICK, P.C. Stakeholders' perceptions of a wading bird colony as a community resource in the Brazilian Pantanal. **Conservation Biology**, n. 17, p. 297-306, 2003.
- BOWEN, B.W. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. **Molecular Ecology**, n. 8, p. S5-S10, 1999.
- BRYAN JR., A.L. *et al.* Tracking large-scale movements of wood storks from western gulf coast states by satellite telemetry. In: ANNUAL MEETING OF THE WATERBIRD SOCIETY. 27. 2005. **Proceedings ...**
- BRYAN JR., A.L. **Wood Stork conservation and management for landowners**. Georgia: U.S. Fish and Wildlife Service and University of Georgia, Savannah River Ecology Laboratory, 2001
- BURNHAM, R.J.; GRAHAM, A. The history of neotropical vegetation: new developments and status. **Annual Symposium of the Missouri Botanic Garden**, n. 86, p. 546-589, 1999
- CASTELLOE, J.; TEMPLETON, A.R. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 3, p. 102-113, 1994.
- CLAPPERTON, C.M. Nature of environmental changes in South America at the last glacial maximum. **Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology**, n. 101, p. 89-208, 1993
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, n. 9, p. 1657-1660, 2000
- CLEMENTS J.F. **Birds of the world: a checklist**. 5 ed. London: Pica Press, 2000.
- COLINVAUX, P.A. A new vicariance model for Amazonian endemics. **Global Ecology and Biogeography Letters**, n. 2, p. 95-96, 1998.

- COLINVAUX, P.A.; DE OLIVEIRA, P.E.; BUSH, M.B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypothesis. **Quaternary Science Reviews**, n. 19, p. 141-169, 2000.
- COLINVAUX, P.A.; DE OLIVEIRA, P.E. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. **Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology**, n. 166, p. 51-63, 2001.
- CONGDON, B.C. *et al.* Mechanisms of population differentiation in marbled murrelets: historical versus contemporary processes. **Evolution**, n. 54, p. 974-986, 2000.
- COULTER, M.C.; BRYAN JR., A.L. Factors affecting reproductive success of Wood Storks (*Mycteria americana*) in east-central Georgia. **Auk**, n. 112, p. 237-243, 1995.
- COULTER, M.C. *et al.* Wood Stork (*Mycteria americana*) In: The American Ornithologists' Union (Ed.) **The birds of North America**, n. 409, p. 1-28, 1999.
- COUTINHO, M.E. *et al.* Aspectos ecológicos dos vertebrados terrestres e semi-aquáticos no Pantanal. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos hídricos e da Amazônia Legal. **Plano de conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) – PCBAP diagnóstico dos meios físicos e bióticos meio biótico**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 183-322, 1997.
- CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, n. 134, p. 959-969, 1993
- CROCHET, P.A. Can measures of gene flow help to evaluate bird dispersal? **Acta Oecologica - Internacional Journal of Ecology**, n. 17, p. 459-474, 1996.
- CROCHET, P.A.; DESMARAIS, E. Slow rate of evolution in the mitochondrial control region of Gulls (Aves: Laridae). **Molecular Biology and Evolution**, n. 17, p. 1797-1806, 2000.
- DAVIS, L.M. *et al.* Genetic structure of six populations of American alligators: A microsatellite analysis. In: GRIGG G.C.; SEEBACHER F.; FRANKLIN C.E. (Ed.) **Crocodylian biology and evolution**. Australia: Surrey Beatty and Sons, p. 38-50, 2001.
- DAVIS, S.M.; OGDEN J.C. **Everglades, the ecosystem and its restoration**. Florida: St. Lucie Press. p. 357-378, 1994.
- DE JONG, B.H.J.; SPAANS, A.L. **Waterfowl and wetlands in Suriname**. Netherlands: Research Institute for Nature Management, 1984. Suriname Forest Forest Service Report No. 1984-1.
- DE OLIVEIRA, P.E. **A palynological record of late Quaternary vegetational and climatic change in southeastern Brazil**. 1992. Tese (Doutorado em Ciências). Ohio, The Ohio State University, 1992.
- DEL LAMA, S.N.; LOPES, I.F.; DEL LAMA, M.A. Genetic variability and level of differentiation among Brazilian wood stork populations. **Biochemical Genetics**, n. 40, p. 87-99, 2002.

- DEPKIN, F.C.; COULTER, M.C.; BRYAN JR., A.L. Food of nestling wood stork in east-central Georgia. **Colonial Waterbirds**, n. 15, p. 219-225, 1992.
- DIAMOND, J.M.; TERBORGH, J.W. Observations on bird distribution and feeding assemblages along rio Callaria Department of Loreto Peru. **Wilson Bulletin**, n. 79, p. 273-282, 1967.
- ELLIOTT, A. Family Ciconiidae (Storks). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL J. (Ed.). **Handbook of the birds of the world. Vol. 1. Ostrich to Ducks**. Barcelona: Lynx Edicions, p. 436-465, 1992.
- EVANS, P.G.H. Electrophoretic variability of gene products. In: COOKEA F.; BUCKLEY P.A. (Ed.) **Avian genetics: a populational and ecological approach**. Florida: Academic Press, p. 105-162, 1987.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial - DNA restriction data. **Genetics**, n. 131, p. 479-491, 1992.
- FARIA, P.J. **Estudo genético-populacional em trinta-réis (Sternidae, Charadriiformes) que se reproduzem na costa brasileira**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). São Paulo, Universidade de São Paulo, 2005.
- FERRAZ-VICENTINI, K.R.; SALGADO-LABOURIAU, M.L. Palynological analysis of a palm swam in central Brazil. **Journal of South American Earth Sciences** n. 9, p. 207-219, 1996.
- FIGUEROA, O.A. **Nesting habitat selection and habitat associations of juvenile jabiru storks (*Jabiru mycteria*) in Belize, Central America: implications for conservation**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências). Florida, University of Florida, 2005.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- FREDERICK, P.C. Wading birds in the marine environment. In: SCHREIBER, E.A.; BURGER, J. (Eds.) **Biology of marine birds**. Boca Raton: CRC Press, 2002.
- FREDERICK, P.C.; COLLOPY, M.W. Nesting success of five Ciconiiform species in relation to water conditions in the Florida Everglades. **Auk**, n. 106, p. 625-634, 1989.
- FREDERICK, P.C. *et al.* The importance of the Caribbean coastal wetlands of Nicaragua and Honduras to Central American populations of waterbirds and Jabiru Storks. **Journal of Field Ornithology**, n. 68, p. 287-295, 1997.
- FRIESEN, V.L. Population genetics and spatial scale of conservation of colonial waterbirds. **Colonial Waterbirds**, n. 20, p. 353-368, 1997.
- FU, Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, n. 147, p. 915-925, 1997.
- GAWLIK, D.E. The role of wildlife science in wetland ecosystem restoration: lessons from the Everglades. **Ecological Engineering**, n. 26, p. 70-83, 2006.

- GLENN, T.C.; STEPHAN, W.; BRAUN, M.J. Effects of a population bottleneck on Whooping Crane mitochondrial DNA variation. **Conservation Biology**, n.13, p. 1097-1107, 1999.
- GONZÁLEZ, J.A. Breeding biology of the Jabirus in the southern llanos of Venezuela. **Wilson Bulletin**, n. 108, 524-534, 1996a.
- GONZÁLEZ, J.A. Contribución al estudio de la ecología de las cigüeñas (Fam. Ciconiidae) en los Llanos de Venezuela. 1993. Tese (Doutorado em Ciências). Madrid, Universidad Complutense de Madrid, 1993.
- GONZÁLEZ, J.A. Densidad y dinámica espacio-temporal de las poblaciones de cigüeñas (Ciconiidae) en los Llanos inundables de Venezuela. **Ornitología Neotropical**, n. 7, p. 177-183, 1996b.
- GOUDET, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, n. 86, p. 485-486, 1995.
- GREENWOOD, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behavior**, n. 28, p. 1140-1162, 1980.
- HAFFER, J.; PRANCE, G.T. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. **Amazoniana**, n.16, p. 579-607, 2001.
- HAIG, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, n. 79, p. 413-425, 1998.
- HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.
- HANCOCK, J.A.; KUSHLAN, J.A.; KAHL, M.P. **Storks, ibises and spoonbills of the world**. San Diego: Academic Press, 1992.
- HARPENDING, H.C. Signature of ancient population-growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**, n. 66, p. 591-600, 1994
- HARRIS, M.B. *et al.* Challenges to safeguard the Pantanal wetlands, Brazil: threats and conservation initiatives. **Conservation Biology**, n. 19, p. 714-720, 2005.
- HARTMAN, F.A. Locomotor mechanisms of birds. **Smithsonian Miscellaneous Collection**, n. 143, p. 1-91, 1961.
- HEDRICK, P.W. Perspective: highly variable genetic loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, n. 53, p. 313-318, 1999.
- HENDRICKSON, S.L. *et al.* Low genetic variability in the geographically widespread Andean Condor. **Condor**, n. 105, p. 1-12, 2003.
- HOELZEL, A.R.; DOVER, G.A. **Molecular genetic ecology**. Oxford: IRL Press; Oxford University Press, 1991.
- HUDSON, R.R. Island models and the coalescent process. **Molecular Ecology**, n. 7, p. 413-418, 1998.

- INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE. **1996 IUCN Red List of Threatened Animals**. Gland, Switzerland: IUCN, 1996
- INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE. **Red List of Threatened Plants**. Gland, Switzerland: IUCN, 1997.
- IRIONDO, M. Large wetlands of South America: a model for quaternary humid environments. **Quaternary International**, n. 114, p. 3-9. 2004.
- JOHNSON, J.A.; BELLINGER, M.R.; TOEPFER, J.E.; DUNN, P. Temporal changes in allele frequencies and low effective population size in greater prairie-chickens. **Molecular Ecology**, n. 13, p. 2617-2630, 2004.
- JOHNSON, R.E. *et al.* Storks: Status, conservation and captive breeding. **Colonial Waterbirds**, n. 10, p. 236-241. 1987.
- JUNK, W.J. Tropical/subtropical wetland biodiversity: Status of knowledge, threats and sustainable management. In: BERNARD, T.; MOSPELE, K.; RAMBERG, L. (Org.). **Environmental monitoring of tropical and subtropical wetlands**. Maun: Harry Oppenheimer Okavango Research Centre & University of Botswana, n. 1, p. 45-69, 2003. Okavango Report Series.
- KAHL, M.P. A revision of the family Ciconiidae (Aves). **Journal of Zoology**, n. 167, p. 451-461, 1972a.
- KAHL, M.P. Comparative ethology of the Ciconiidae. Part 1. The marabou stork, *Leptoptilos crumeniferus* (Lesson). **Behavior**, n. 27, p. 76-106, 1966.
- KAHL, M.P. Comparative ethology of the Ciconiidae. part 6. The blacknecked, saddlebill, and jabiru storks (genera *Xenorhynchus*, *Ephippiorhynchus*, and *Jabiru*). **Condor**, n. 75, p. 17-27, 1973.
- KAHL, M.P. Comparative ethology of the Ciconiidae: the wood storks (genera *Mycteria* and *Ibis*). **Ibis**, n. 114, p. 15-29, 1972b.
- KAHL, M.P. Social behavior and taxonomic relationships of the storks. **Living Bird**, n. 10, p. 151-170, 1971.
- KIDD, M.G.; FRIESEN, N.L. Sequence variation in the Guillemot (Alcidae: *Cephus*) mitochondrial control region and its nuclear homology. **Molecular Biology and Evolution**, n. 15, p. 61-70, 1998.
- KINGMAN, J. F.C. The coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, n. 13, p. 235-248, 1982a.
- KINGMAN, J.F.C. **Mathematics of genetic diversity**. Philadelphia: SIAM, 1980.
- KINGMAN, J.F.C. On the genealogy of large populations. **Journal Applied Probability**., n. 19A, p. 27-43, 1982b.

- KIRKBY, C.A. *et al.* **“Project Tambopata 1” tourism development and the status of Neotropical lowland wildlife in Tambopata, south-eastern Peru: recommendations for tourism and conservation.** Tombata: Tambopata Reserve Society/Research and Monitoring Studies, 2002.
- KUSHLAN, J.A.; FROGHING, P.C. The history of the southern Florida Wood Stork population. **Wilson Bulletin**, n. 98, p. 368-386, 1986.
- KVIST, L. *et al.* Paternal leakage of mitochondrial DNA in the Great Tit (*Parus major*). **Molecular Biology and Evolution**, n. 20, p. 243-247, 2003.
- LARSON, A. Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. **Evolutionary Biology**, n. 17, p. 119-217, 1984.
- LEDRU, M.P. *et al.* The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. **Paleogeography, Paleoclimatology and Palaeocology**, n. 123, p. 239-257, 1996.
- LEHNER, B.; DÖLL, P. **A global wetlands, lakes and reservoirs data set.** 2001. Disponível em: <<http://www.sage.wisc.edu/atlas/maps.php?datasetid=27includerelatedlinks=1&dataset=27>>. Acesso em 20 de maio de 2006.
- LOPES, I.F. **Diferenciação genética entre populações de cabeça-seca (*Mycteria americana*).** 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2002.
- LOPES, I.F. *et al.* Demographic history of wood stork (*Mycteria americana*) Brazilian Pantanal colonies revealed by mitochondrial DNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, n. 29, p. 241-250, 2006.
- LOPES, I.F.; ROCHA, C.D.; DEL LAMA, S.N. Genetical analysis of the Wood Stork (*Mycteria americana*) populations using nuclear and mitochondrial DNA markers. **Ornitologia Neotropical**, n. 15, p. 169-174, 2004.
- LUCK, W.G.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. Population diversity and ecosystem services. **Trends in Ecology and Evolution**, n. 18, p. 331-336, 2003.
- LUTHIN, C.S. Status of and conservation priorities for the world's stork species. **Colonial Waterbirds**, n. 10, p. 181-202, 1987.
- LUTHIN, C.S. **World working group on storks, ibises and spoonbills.** Walsrode: ICPB-Brehm Fonds, 1984. Report 2.
- MARSHALL, T.C. *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, n. 7, p. 639-655, 1998.
- MARTINEZ-CRUZ, B.; GODOY, J.A.; NEGRO, J.J. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). **Molecular Ecology**, n. 13, p. 2243-2255, 2004.

- MARUYAMA, T.; FUERST, P.A. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. **Genetics**, n. 111, p. 675-689, 1985.
- MCNEELY, J.A. *et al.* **Conserving the world's biological diversity**. Whashington DC: IUCN; World Resources Institute; Conservation International; WWF-US; World Bank, 1990.
- MCNEELY, J.A. How conservation strategies contribute to sustainable development. **Environmental Conservation**, n.17, p. 9-13, 1990.
- MEFFE, G.K.; CARROL, C.R. **Principles of conservation biology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997.
- MELVIN, S.L.; GAWLIK, D.E.; SCHARFF T. Long-term movement patterns for seven species of wading birds. **Waterbirds**, n. 22, p. 411-416, 1999.
- MITCHELL, W.A. **Species profile: Wood Stork (*Mycteria americana*) on military installations in the southeastern United States**. Vicksburg: U.S. Army Engineer Research and Development Center, 1999. Technical Report SERDP-99-2.
- MORALES, G. Conservation de las aves zancudas en los llanos de Venezuela. In: FREDERICK, F.E. *et al.* (Ed.). **The Scarlet Ibis (*Eudocimus ruber*): status, conservation and recent research**. Slimbridge, England: International Waterfowl and Wetlands Research Bureau, p. 77-84, 1990.
- MOUM, T.; ÁRNASON, E. Genetic diversity and population history of two related seabird species based on mitochondrial DNA control region sequences. **Molecular Ecology**, n. 10, p. 2463-2478, 2001.
- MUNDY, N.I.; UNITT, P.; WOODRUFF, D.S. Skin from feet of museum specimens as a non-destructive source of DNA for avian genotyping. **Auk**, n. 114, p. 126-129, 1997.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. Bottleneck effect and genetic-variability in populations. **Evolution**, n. 29, p. 1-10, 1975.
- NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, n. 19, p. 153-170, 1983.
- NEIFF J. Diversity in some tropical wetland systems of South America. In: GOPAL B.; JUNK W.; DAVIS J. (Ed.). **Biodiversity in wetlands: assesment, function and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, n. 2, p. 157-186, 2001.
- NETTO, L.E.S.; MENCK, C.F.M. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: MATIOLI S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Holos Editora, p. 40-51, 2001.
- NIEGEL, J.E. Is Fst obsolete? **Conservation Genetics**, n. 3, p. 167-173, 2002.
- OGDEN, J.C. *et al.* Breeding population of Wood Stork (*Mycteria americana*) in southeastern United States. **Condor**, n. 89, p. 752-759, 1987.

- OGDEN, J.C.; KALEII, H.W.; NESBITT, S.A. The influence of annual variation in rainfall and water levels on nesting by Florida populations of wading birds. **Transactions of the Linnaean Society of New York**, n. 9, p. 115-126, 1980.
- OGDEN, J.C.; KUSHLAN, J.A.; TILMANT, J.T. **The food habits and nesting success of Wood Storks in Everglades National Park in 1974**. National Park Service, 1978. Natural Resources Report Number 16.
- OGDEN, J.C.; PATTY, B.W. **The recent status of the wood stork in Florida and Georgia**. Georgia: Georgia Department of Natural Resources Game and Fisheries Services, 1981.
- OLIVEIRA, D.M.M. **Sucesso reprodutivo e conservação de Tuiuiú, *Jabiru mycteria* (Aves: Ciconiidae)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação da Diversidade) Cuiabá, Universidade Federal de Mato Grosso, 1997.
- OTA, T. **Dispan: Genetic distance and phylogenetic analysis**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1993.
- PALMER, R.S. **Handbook of North American birds**. Yale: Yale University Press, 1962.
- PAREDES, A.J. **Status, distribution, habitat requirements, and foraging ecology of the Jabiru stork (*Jabiru mycteria*) in northern and central Belize, Central America**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências). Florida, University of Florida, 2004.
- PIELOU, E.C. **After the ice age: The return of life to glaciated North America**. Chicago: University of Chicago Press, 1991.
- PIMM, S.L.; RAVEN, P. Biodiversity - Extinction by numbers. **Nature**, n. 403, p. 843-845, 2000.
- POSADA D.; CRANDALL K.A.; TEMPLETON A.R. Geodis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, n. 9, p. 487-488, 2000.
- POVEDA, M.G. El comportamiento de *Jabiru mycteria* durante la época reproductiva en humedales de la zona norte de Costa Rica. 2003. **Boletín Zeledonia**, San José, Costa Rica, v. 7, n. 1. Disponível em: <www.zeledonia.org/files/boletin.html>. Acesso em 14 de setembro de 2005).
- PRANCE, G.T. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. **Annual Meeting of the Botanical Garden**, n. 69, p. 594-624, 1982.
- PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide range survey of cross species microsatellite amplifications in bird. **Molecular Ecology**, n. 5, p. 365-378, 1996.
- PULLIN, A.S. **Conservation biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- RAMO, C.; BUSTO, B. Censo aereo de Corocoros (*Eudocimus ruber*) y otras aves acuáticas en Venezuela. **Boletín Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales**, n. 39, p. 65-88, 1984.
- RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular Biology and Evolution**, n. 19, p. 2092-2100, 2002.

- RAMPAZZO, S.E. **Proposta conceitual de zoneamento ambiental para o município de Erechim (RS)**. 2003. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2003.
- RANDI, E. *et al.* Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). **Molecular Ecology**, n. 12, p. 2201-2214, 2003.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, n. 86, p. 248-249, 1995.
- RIDGLEY, R.S.; GWYNNE JR. J.A. **A guide to the birds of Panama with Costa Rica, Nicaragua and Honduras**. Princeton: Princeton University Press, 1989.
- ROCHA, C.D.; DEL LAMA, S.N.; REGITANO, L.A. Lack of genetic structuring among tropical Brazilian Wood Stork populations and low genetic differentiation from North American population. **Biotropica**, n. 36, p. 248-258, 2004.
- ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, n. 9, p. 552-569, 1992.
- ROZAS, J. *et al.* Dnasp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, n. 19, p. 2496-2497, 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, M.H. **Estudo de haplótipos do DNA mitocondrial de colhereiros (Aves, Ordem Ciconiiformes, *Platalea ajaja*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- SCHNEIDER, S. *et al.* **Arlequin ver. 2.000**: a software for population genetic analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.
- SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, n. 152, p. 1079-1089, 1999.
- SERKERCIOGLU, C.H.; GRETCHEN, C.D.; EHRLICH, P.R. Ecosystem consequences of bird declines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 101, p. 18042-18047, 2004.
- SHINE, C.; KLEMM, C. **Wetlands, water and the law. Using law to advance wetland conservation and wise use**. Switzerland: Ramsar Convention Bureau, 1999.
- SHORT, L.L. A zoogeographic analysis of the South American Chaco avifauna. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 154, p. 163-352, 1975.
- SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, n. 236, p. 787-792, 1987.
- SLATKIN, M. Inbreeding coefficients and coalescent times. **Genetic Research Cambridge**, n. 58, p. 167-175, 1991.
- SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, n. 43, p. 1349-1368, 1989.
- SLATKIN, M.A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, n. 139, p. 457-462, 1995.
- SNEATH, P.E.A.; SOKAL, R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973.
- SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Holos Editora. p. 171-192, 2001.
- SORENSEN, M.D. *et al.* Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 12, p.105-114, 1999.
- STANGEL, P.W.; RODGERS, J.A.; BRYAN JR., A.L. Genetic variation and population structure of the Florida Wood Storks. **Auk**, n. 107, p. 614-619, 1990.
- STOTZ, D.F. *et al.* **Neotropical birds: ecology and conservation**. Chicago: University of Chicago Press, 1996.
- STUTE, M. *et al.* Cooling of tropical Brazil (5 degC) during last glacial maximum. **Science**, n. 269, p. 379-383, 1995.
- SZCZYS, P.; HUGHES, C.R.; KESSELI, R.N. Novel microsatellite markers used to determine the population genetic structure of the endangered Roseate Tern, *Sterna dougallii*, in North America and Western Australia. **Conservation Genetics**, n. 6, p. 461-466, 2005.
- TEMPLETON, A.R. A cladistic-analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction-endonuclease mapping or DNA-sequencing .5. Analysis of case-control sampling designs - alzheimers-disease and the apoprotein-e locus. **Genetics**, n. 140, p. 403-409, 1995.
- TEMPLETON, A.R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, n. 7, p. 381-397, 1998.
- TEMPLETON, A.R. Statistical phylogeography: methods for evaluating and minimizing inference error. **Molecular Ecology**, n. 3, p. 789-809, 2004.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A Cladistic-Analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA-sequence data. 3. cladogram estimation. **Genetics**, n. 132, p. 619-633, 1992.
- TEMPLETON, A.R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C.A. Separating population structure from population history – A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial haplotypes in the Tiger Salamander *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, n. 140, p. 767-782, 1995.

- THOMAS, B.T. Maguari Stork nesting: juvenile growth and behavior. **Auk**, n. 101, p. 812-823, 1984.
- THOMAS, B.T. The behavior and breeding of adult Maguari Storks. **Condor**, n. 88, p. 26-34, 1986.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A.M. *et al.* Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). **Molecular Ecology Notes**, n. 3, p. 563-566, 2003.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A.M. **Populações de *Mycteria americana* da América do Norte e do Pantanal: estruturação genética, razão sexual e assimetria flutuante.** 2004. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2004.
- U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE. **U.S. Breeding population of the Wood Stork determined to be endangered.** 1984. Federal Register 40:7332-7335.
- U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE. **Wood Stork Report, A newsletter dedicated to sharing information about the wood stork.** n. 3, p. 1-22, 2004.
- USSAMI, N.; SHIRAIWA, S.; DOMINGUEZ, J.M.L. Basement reactivation in a sub-Andean foreland flexural bulge: The Pantanal Wetland, SW Brazil. **Tectonics**, n. 18, p. 25-39, 1999.
- VAN DEN BUSSCHE, R.A. *et al.* Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). **Auk**, n. 116, p. 1083-1092, 1999.
- WARD, R.D.; SKIBINSKI, D.O.F.; WOODWARK, M. Protein heterozygosity, protein-structure, and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, n. 26, p. 73-159, 1992.
- WETLANDS INTERNATIONAL. **Waterbird population estimates.** 3. ed. The Netherlands: Wageningen, 2002. Wetlands International Global Series No. 12.
- WETMORE, A. **The birds of the Republic of Panama - Part 1: TINAMIDAE (Tinamous) to RYNCHOPODIDAE (Skimmers).** Washington: Smithsonian Institution, 1965.
- WHITED, D.S. *et al.* The importance of local and regional factors in predicting effective conservation-Planning strategies for wetland bird communities in agricultural and urban landscapes. **Landscape and Urban Planning**, n. 49, p. 49-65, 2000.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, n. 28, p.114-138, 1943.
- WRIGHT, S. The interpretation of population-structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, n. 19, p. 395-420, 1965.
- YAMASHITA, C.; VALLE, M.P. Sobre ninhais de aves do Pantanal no município de Poconé, Mato Grosso, Brasil. **Vida Silvestre Neotropical**, n. 2, p. 59-63, 1990.
- ZINK, R.M. *et al.* Recent evolutionary history of the bluethroat (*Luscinia svecica*) cross Eurasia. **Molecular Ecology**, n. 12, p. 3069-3075, 2003.