

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ESTUDO DE HAPLÓTIPOS DO DNA MITOCONDRIAL DE  
COLHEREIROS (AVES, ORDEM CICONIIFORMES, *PLATALEA*  
*AJAJA*).**

**Mateus Henrique Santos**

**SÃO CARLOS  
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ESTUDO DE HAPLÓTIPOS DO DNA MITOCONDRIAL DE  
COLHEREIROS (AVES, ORDEM CICONIIFORMES, *PLATALEA*  
*AJAJA*).

**Mateus Henrique Santos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução. (Campo de pesquisa: Genética de populações e conservação de aves aquáticas).

SÃO CARLOS  
2006

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

S237eh

Santos, Mateus Henrique.

Estudo de Haplótipos do DNA mitocondrial de colhereiros  
(Aves, Ordem Ciconiiformes, *Platalea ajaja*) / Mateus  
Henrique Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2006.  
79 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2005.

1. Genética de populações. 2. *Platalea ajaja*. 3. DNA  
mitocondrial. 4. Conservação de espécies. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

**Mateus Henrique Santos**

**ESTUDO DE HAPLÓTIPOS DO DNA MITOCONDRIAL DE  
COLHEREIROS (AVES, ORDEM CICONIIFORMES, *PLATALEA  
AJAJA*).**

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

Aprovado em 02 de Dezembro de 2005

**BANCA EXAMINADORA**

Presidente \_\_\_\_\_  
(Professora Doutora Silvia Nassif Del Lama)

1ºExaminador \_\_\_\_\_  
(Universidade Federal de São Carlos)

2ºExaminador \_\_\_\_\_  
(Pontifício Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Dedico este trabalho à memória de  
meu pai Gilberto Santos

## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama, amiga e orientadora, pela oportunidade não só de desenvolver meu trabalho, mas também pela agradável companhia, ensinamentos, orientação e paciência, tanto no laboratório quanto nas coletas em campo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPG-GEV) e seus funcionários, pelo auxílio na realização deste estudo.

Ao Prof. Marco Antônio Del Lama, por toda ajuda e suporte tanto no laboratório quanto em campo.

Ao Senhor Sherer Shererezino, pelas amostras da região do Taim, no Rio Grande do Sul.

Aos colegas Iara Freitas Lopes, Carolina Isabel Miño, Priscila Gonçalves, Rá Cavalcante, Alessandra Tomazulo-Seccomandi, Aislan Seccomandi, Cristiano Rocha, Isabel Cristina de Godoy, Thais Collet, Rogério Oliveira Souza, Margarita Maria López Uribe, Iderval Sobrinho Junior e todos os demais companheiros que me ajudaram de alguma maneira, seja com conversas nos bastidores ou simplesmente me apoiando e incentivando.

Aos meus pais Gilberto Santos e Maria Antonieta Marangon Santos, pelo incentivo e apoio, desde o princípio.

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Distribuição geográfica e ocorrência dos 16 haplótipos determinados para o fragmento de 483 pb da região controladora do DNAMit nas populações de *P. ajaja* do Pantanal (Porto da Fazenda, PF; Fazenda Retirinho, FR; Fazenda Ipiranga, FI e Baía de Gaíva, BG) e do Rio Grande do Sul (Banhado do Taim, TA). Os números na vertical indicam a posição da variação. Espaços em branco indicam igualdade com o haplótipo A. Os hífen indicam deleções e inserções (Gap).....44
- TABELA 2.** Probabilidade de ancestralidade gerada pelo programa TCS.....50
- TABELA 3.** Tamanho amostral, número de haplótipos, número de haplótipos privados, diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica, D de Tajima e  $F_s$  de Fu obtidos para dados de seqüências da região controladora do DNAMit em *P. ajaja*.....51
- TABELA 4.** Valores dos testes de neutralidade obtidos utilizando os agrupamentos “Pantanal e Rio Grande do Sul” e “Pantanal”.....51
- TABELA 5.** Parâmetros de expansão populacional segundo o modelo de diferenças pareadas ( $t$  expresso em anos,  $N_0$  e  $N_1$  em fêmeas), dados referentes às colônias do Pantanal e Taim.....51
- TABELA 6.** Parâmetros de expansão populacional segundo o modelo de diferenças pareadas ( $t$  expresso em anos,  $N_0$  e  $N_1$  em fêmeas), dados referentes às colônias do Pantanal.....52
- TABELA 7.** Índices de diversidade nucleotídica, baseados nos dados da região controladora do DNA mitocondrial, em seis espécies pertencentes a três ordens de aves aquáticas.....58

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fotografia demonstrando padrão de plumagem característica do Colhereiro (*Platalea ajaja*) durante o período reprodutivo. Foto: G. Lasley.....06
- FIGURA 2.** Fotografia de filhotes de colhereiro, demonstrando o padrão da coloração e formato do bico. Foto: R. Cavalcante.....07
- FIGURA 3.** Pais alimentando os filhotes. Foto: F. Truslow.....09
- FIGURA 4.** Distribuição da espécie *Platalea ajaja* no continente americano. Modificado de: <[www.natureserve.org/getData/animalData.jsp](http://www.natureserve.org/getData/animalData.jsp)>.....12
- FIGURA 5.** Figura demonstrando o padrão do DNAmít nas aves (Fig. a representa o DNAmít dos vertebrados, não pertencentes ao grupo das aves; Fig. b representa o DNAmít comum a maioria das espécies de aves, sendo esse modelo o adotado neste estudo; Fig c representa uma nova ordem dos genes mitocondriais, propostos por Mindell *et al.*, 1998). Modificado de Mindell *et al.*, 1998.....18
- FIGURA 6.** Fotografia de satélite com a localização das colônias reprodutivas amostradas. Modificado de “Google Earth” .....28
- FIGURA 7.** Procedimentos de captura e coleta de material biológico de colhereiros, na região do Pantanal, Baía de Gaíva em 2003. Em “A” captura dos filhotes, em “B” manipulação dos filhotes e em “C” e “D”, respectivamente, coleta de sangue e penas em crescimento. Foto: S. Del Lama.....30
- FIGURA 8.** Figura com a localização dos oligonucleotídeos iniciadores em uma representação do DNA mitocondrial. A localização e organização das regiões do DNA mitocondrial é representativa da disposição encontrada para a maioria das famílias de aves. Setas em vermelho representam o sentido da extensão dos produtos nas reações de PCR. Modificado de Mindell, 1998.....34
- FIGURA 9.** Árvore de haplótipos construída pelo método de máxima parcimônia considerando as deleções. O suporte estatístico dos nós é dado pelo valor de bootstrap utilizando 1000 replicações. A espécie *M. americana* foi utilizada como grupo externo.....47



- FIGURA 10.** A rede de parcimônia estatística do TCS e análise aninhada dos haplótipos da região controladora do DNAmít estudada. O retângulo representa o haplótipo mais freqüente (A). As elipses possuem tamanhos diferentes e representam proporcionalmente a freqüência dos haplótipos. A linha em laranja representa uma ligação alternativa.....49
- FIGURA 11.** Histograma das freqüências relativas das diferenças pareadas (Mismatch distribution) referentes aos dados de seqüências obtidas para indivíduos coletados no Pantanal. Em ambos os gráficos, a linha descontínua representa os valores observados e a linha contínua representa a curva esperada quando a população apresenta tamanho constante (A) ou expansão populacional (B)....52
- FIGURA 12.** Relação filogenética tradicional entre aves aquáticas, baseadas em estudos morfológicos (Cracraft, 1981). Mais recentemente, as garças foram recolocadas mais próximas dos maçaricos e os grou, pombos e os urubus do novo mundo foram reposicionados mais próximos das cegonhas (Cracraft, 1988). Os Pelecaniformes incluem os pelicanos, fragatas, mergulhões e cormorões. Modificado de Van Tuinen, 2001.....57

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	01
<b>Abstract</b> .....	02
<b>1. Introdução</b> .....	04
<b>1.1 Aspectos da biologia da espécie <i>Platalea ajaja</i></b> .....	04
<b>1.1.1 Classificação</b> .....	04
<b>1.1.2 Descrição morfológica</b> .....	05
<b>1.1.3 Alimentação</b> .....	07
<b>1.1.4 Reprodução e desenvolvimento</b> .....	08
<b>1.1.6 Habitat e Distribuição geográfica</b> .....	09
<b>1.1.7 Dispersão pós-reprodutiva e migração</b> .....	13
<b>1.2 Estrutura genética de populações de aves e suas implicações</b> .....	14
<b>1.3 DNA mitocondrial, características estruturais e seu uso como marcador nos estudos populacionais</b> .....	15
<b>2. A proposta do trabalho</b> .....	20
<b>3. Objetivos</b> .....	23
<b>4. Material e Métodos</b> .....	25
<b>4.1 Área de estudo</b> .....	25
<b>4.1.1 Pantanal</b> .....	25
<b>4.1.2 Banhados do Rio Grande do Sul</b> .....	26
<b>4.2 Amostras</b> .....	27
<b>4.3 Extração e quantificação do DNA</b> .....	30
<b>4.4 Amplificação dos fragmentos da região controladora e purificação do DNA molde para reações de sequenciamento</b> .....	31
<b>4.5 Análise das seqüências</b> .....	34
<b>4.5.1 Alinhamento das seqüências</b> .....	34

4.5.2 Variabilidade da região controladora.....	35
4.5.3 Análise de máxima parcimônia.....	35
4.5.4 Rede haplotípica e Análise de clados aninhados (NCA, “Nested Clade Analysis”).	36
4.5.5 Estruturação populacional.....	36
4.5.5.1 Análise de variância molecular (AMOVA).....	36
4.5.6 Testes de Neutralidade e Expansão populacional.....	37
<b>5. Resultados.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Amplificação e sequenciamento de um fragmento de 483pb da região controladora na espécie <i>Platalea ajaja</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Análise da variabilidade genética.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Diferenciação genética entre as populações das colônias reprodutivas de <i>P. ajaja</i>....</b>	<b>45</b>
<b>5.3.1 AMOVA.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3.2 Fst.....</b>	<b>45</b>
<b>5.4. Análise de máxima parcimônia.....</b>	<b>46</b>
<b>5.5 Histórico Populacional e inferências Demográficas.....</b>	<b>47</b>
<b>5.5.1 Análise de clados aninhados.....</b>	<b>47</b>
<b>5.5.2 Testes de neutralidade e estimativas de parâmetros demográficos.....</b>	<b>50</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1 Amplificação e sequenciamento.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2 Variabilidade genética.....</b>	<b>58</b>
<b>6.3 Diferenciação genética e história demográfica das populações de <i>P. ajaja</i> no Brasil.</b>	<b>61</b>
<b>6.5 Implicações para a conservação.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>69</b>

## Resumo

O colhereiro (*Platalea ajaja*) é uma ave aquática neotropical, com distribuição ampla por áreas costeiras e intracontinentais. As populações são morfologicamente indistinguíveis, sem diferenciação aparente entre as populações do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Esse estudo visou à determinação da variabilidade e estruturação genética de algumas colônias reprodutivas brasileiras dessa espécie. A análise foi baseada na variação de um fragmento de 483 pares de bases do primeiro domínio da região controladora do DNA mitocondrial. Foram coletadas 50 amostras provenientes de cinco colônias reprodutivas em duas importantes áreas úmidas do Brasil, o Pantanal (quatro colônias  $n = 39$ ) e o Banhado do Taim (uma colônia,  $n = 11$ ). O nível de variabilidade para a região do Pantanal foi estimado usando a diversidade genética ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica ( $H$ ) e foram mais altas ( $\pi = 0,004$ ,  $H = 0,753$ ) do que o encontrado para o Taim ( $\pi = 0,0004$ ,  $H = 0,182$ ). Não foi encontrada diferenciação genética entre as colônias do Pantanal (Fst e AMOVA, valores não significativos) e entre o Pantanal e Taim (Fst e AMOVA, valores não significativos). A distribuição unimodal do histograma de frequências relativas das diferenças pareadas e os testes de neutralidade (Tajima = -1,942, Fu = -23,271 e  $R_2 = 0,055$ ) sugerem uma expansão recente para as colônias da região do Pantanal. O tempo desde a expansão foi estimado em 30242 anos atrás e o  $N_e = 14556$  fêmeas. Os resultados foram discutidos supondo que a população contemporânea de colhereiro no Pantanal é originária de uma população fundadora geograficamente mais limitada e a população atual da região representa cerca de 10 a 30% de toda a população do continente.

### **Abstract**

Roseate spoonbill (*Platalea ajaja*) is a neotropical bird with wide geographic distribution in intercontinental and coastal wetland habitats. Populations are morphologically indistinguishable, with no apparent differentiation from the southern United States to northern Argentina. In this study we aim to determine the genetic diversity and to delineate the Brazilian population structure of this specie, using genetic data of a 483 base-pair fragment of the first domain of the mitochondrial DNA control region. Samples of 50 individuals were collected from five breeding colonies in two important Brazilian wetland areas, the Pantanal (four colonies, n = 39) and the Banhado do Taim (one colony, n = 11). The levels of variability estimated using nucleotide ( $\pi$ ) and haplotipic (H) diversities were higher in the Pantanal ( $\pi = 0.004$  and  $H = 0.753$ ) than in Taim ( $\pi = 0,0004$  and  $H = 0,182$ ). No significant levels of genetic differentiation among Pantanal colonies (Fst and AMOVA values are not significant) and between Pantanal and Taim colonies (Fst and AMOVA values are not significant) were found. The unimodal pattern of the mismatch distribution and the neutrality tests results (Tajima's  $D = -1,942$ ,  $F_u = -23,271$  and  $R_2 = 0,055$ ) pointed a recent expansion in the Pantanal population. The time since the expansion was estimated to be 30242 years before present and the  $N_e$  was estimated as 14556 females. Our results were discuss considering that the present Pantanal population was originated from a geographically limited founder population. The  $N_e$  estimates indicates that the Pantanal population represents around 10-30% of Roseate Spoonbill continental population.

# **Introdução**

## **1. Introdução**

### **1.1 Aspectos da biologia da espécie *Platalea ajaja***

#### **1.1.1 Classificação**

A espécie *Platalea ajaja* é pertencente ao grupo das aves (Vertebrata, Aves) da família Threskiornithidae, ordem Ciconiiformes, (Sick, 1997). Três famílias dessa ordem de aves aquáticas que ocorrem no Brasil, sendo a Threskiornithidae a mais aparentada a Ciconidae do que a Ardeidae (Sick, 1997). As relações filogenéticas entre as espécies de colhereiros não estão ainda bem esclarecidas. O colhereiro americano tem sido classificado em dois gêneros, *Platalea ajaja* (Sick, 1997) e *Ajaia ajaja* (Hancock *et al.*, 1992). Segundo Hancock (1992) essa espécie não está relacionada aos táxons do velho mundo, incluindo o colhereiro euro-asiático (*Platalea leucorodia*), o colhereiro real (*Platalea regia*), o colhereiro de face-negra (*Platalea minor*) e o colhereiro africano (*Platalea alba*), mas está próximo ao colhereiro amarelo (*Platibis flavipes*) da Austrália. Adotou-se nesse estudo a classificação proposta por Sick (1997) que classifica a espécie no gênero *Platalea*.

Os colhereiros são aparentados aos íbis e apresentam mais similaridades do que a diferença do bico sugere. Cada um desses grupos de espécies está classificado numa subfamília – os íbis na Threskiornithinae e os colhereiros na Plataleinae (Hancock *et al.*, 1992). As evidências para agrupar as espécies da família Threskiornithidae estão baseadas em caracteres morfológicos, hibridação de DNA e comparações das proteínas dos ovos (Sibley, 1960; Hancock *et al.*, 1992).

Foram identificados fósseis de *Platalea ajaja* em sítios datados do Pleistoceno (1,8 milhão a 11000 anos atrás) na Flórida, Califórnia e Peru (Howard, 1930; Woolfende, 1957; Campbell, 1979, todos citados de Emslie, 1995). Somente um fóssil foi encontrado

antes desse período na Flórida e este é representante de uma outra espécie, *Ajaia chione*, do Irvingtoniano, possível ancestral de *Platalea ajaja* (Emslie, 1995).

### 1.1.2 Descrição morfológica

O colhereiro é uma ave pernalta de porte médio, alcançando cerca de 75-80 cm de altura, com peso de aproximadamente 1,2-1,8 kg e envergadura de asas oscilando entre 120-133 cm (Hancock *et al.*, 1992; Howell, 1932; Palmer, 1962; Lewis, 1983; Bjork e Powell, 1996). São aves com bicos bastante característicos, estreitos na base, com forma espatulada, textura rugosa nos indivíduos maduros e comprimento de 15-18 cm (Howell, 1932; Palmer, 1962; Lewis, 1983; Bjork e Powell, 1996).

Durante a estação reprodutiva os adultos adquirem uma coloração rosa brilhante, com a cabeça sem penas e coloração esverdeada, pele negra ao redor dos olhos e nuca, o saco gular pode apresentar coloração alaranjado brilhante e os olhos vermelhos. O pescoço, o topo das costas e peito são brancos, mas o restante da plumagem do corpo é rosa brilhante. Há um acentuado rosa carmim nas coberteiras das asas e nas coberteiras da cauda com pequenas áreas amareladas nas laterais próximas ao encontro das asas e um tom laranja na cauda. Possui longas pernas avermelhadas (Figura 1). Não há dimorfismo sexual quanto à coloração, mas os machos são levemente maiores do que as fêmeas. Durante a estação não reprodutiva, a coloração é semelhante à do período reprodutivo, mas os detalhes das asas e cauda desaparecem.





**Figura 1. Fotografia demonstrando padrão de plumagem característica do Colhereiro (*Platalea ajaja*) durante o período reprodutivo. Foto: G. Lasley.**

Os jovens possuem plumagem rosa claro, com a cabeça completamente coberta de penas e as pontas das coberteiras e penas primárias são escuras. A coloração rósea mais intensa é adquirida no corpo e asas após a primeira muda pré-básica. A cabeça perde as penas e a coloração rosada da plumagem do corpo intensifica-se; como consequência, a plumagem imatura torna-se mais semelhante à dos adultos. O bico é inicialmente tubular e com o desenvolvimento ele acaba por adquirir a forma típica, semelhante ao de uma colher, daí o nome atribuído à ave (Figura 2).



**Figura 2.** Fotografia de filhotes de colhereiro, demonstrando o padrão da coloração e formato do bico. Foto: R. Cavalcante.

### **1.1.3 Alimentação**

Essas aves se alimentam principalmente de peixes pequenos, o item principal de sua dieta alimentar (42-90%), crustáceos (principalmente camarões e pitus) (5-55%), insetos aquáticos (besouros e percevejos aquáticos) (Howell, 1932; Cottam e Knappen, 1939; Allen, 1942; Powell e Bjork, 1990; Hancock *et al.*, 1992) e “cracas” (Balamus) (Sick, 1997). Todos esses itens são capturados na água, numa profundidade inferior ou igual a 12 cm, podendo chegar ao máximo de 20 cm (Powell, 1987). Durante o forrageamento, as aves mergulham o bico vasculhando o fundo das áreas submersas e quando encontram o alimento levantam a cabeça para engolir (Hancock *et al.*, 1992).

Forrageiam durante o dia e noite (Allen, 1947; Friedmann e Smith, 1950; Powell, 1987). Os adultos freqüentemente voam longas distâncias para se alimentar, de 30 – 65 km (Sprunt e Robertson, 1983 citados de Lewis, 1983; Bjork e Powell, 1996). Realizam

pescarias coletivas em grupos de dez a vinte indivíduos, andando lado a lado e mariscando na água rasa (Sick, 1997).

#### **1.1.4 Reprodução e desenvolvimento.**

O colhereiro (*P. ajaja*) nidifica em colônias por toda a região neotropical. Seus ninhos são construídos em árvores, arbustos ou sobre juncos. Os filhotes atingem a maturidade sexual aos 2-3 anos de vida (Allen, 1942). Essas aves reúnem-se nas proximidades das colônias 1-2 meses antes de acasalarem-se (Allen, 1942; White *et al.*, 1982). O período em que as colônias reprodutivas permanecem ativas é de aproximadamente cinco meses por ano. Os acasalamentos ocorrem juntamente com o período de seca, em regiões alagadas, e os filhotes nascem quando a disponibilidade de alimento é maior, isto é, quando a concentração de peixes e crustáceos na água é alta. Os pares geralmente constroem seus ninhos durante o inverno (estação seca) no Pantanal (julho/agosto) e na primavera, no Rio Grande do Sul (outubro/novembro). Eles podem se agrupar em grandes colônias reprodutivas, juntamente com outras espécies como o cabeça-seca (*Mycteria americana*) e a garça branca grande (*Ardea alba*) (Dumas, 2000; Yamashita e Valle, 1990), ou nidificar em colônias menores, específicas da espécie.

Allen (1942) descreveu, a partir da observação de um único casal, que o ninho é construído basicamente pela fêmea que recebe o material recolhido pelo macho. Após sua construção, a fêmea copula diversas vezes com o macho e deposita de 2 a 3 ovos. O período de incubação é de 22 dias (White *et al.*, 1982) e se inicia logo após a postura do primeiro ovo. Ambos os sexos incubam os ovos (Allen, 1942).

Os filhotes nascem com aproximadamente 50g e ganham cerca de 9g nos três primeiros dias após o nascimento (White *et al.*, 1982). A massa aumenta rapidamente e no 16°

dia os filhotes já atingiram metade do peso de um adulto (filhotes pesam aproximadamente 800-900g). Após o 14º dia de idade, os jovens são capazes de andar e podem explorar os arredores do ninho (Bjork e Powell, 1994).

Ambos os pais alimentam os filhotes através da regurgitação, os jovens introduzem o bico na lateral do bico dos pais até atingir a garganta dos adultos, alimentando-se do alimento trazido por esses (Figura 3).



**Figura 3. Pais alimentando os filhotes. Foto: F. Truslow.**

Com aproximadamente seis semanas de vida os filhotes são capazes de voar (White *et al.*, 1982), mas permanecem até aproximadamente dois meses na colônia e proximidades, podendo ser alimentados pelos pais nesse período (Powell e Bjork, 1990).

### **1.1.6 Habitat e Distribuição geográfica**

Byers (1995) estimou que o número de indivíduos nos neotrópicos está entre 100000 e 250000 indivíduos.

Os colhereiros são encontrados em ambientes aquáticos rasos, como brejos, margens de rios, lagoas marginais, lagos e veredas. Também são encontrados em baías, estuários, enseadas e praias e em local onde a água é rasa. A composição da água varia da condição hipersalina marinha até a água doce. Nesses locais, essa ave encontra a maior parte de seus itens alimentares.

Nos EUA procriam ao longo das costas dos estados do Texas, Louisiana e sul da Flórida e, em menor proporção, no interior da Flórida e Louisiana. No México e América Central sua presença varia de bastante comum a incomum, em algumas áreas é considerado residente local durante o ano ao longo das costas (Howell e Webb, 1995). Na costa do Pacífico é considerado nidificante local ao sul de Sonora, México e sul de Honduras (Howell e Webb, 1995; Palacios e Mellink, 1995). Não existem registros de nidificações na Guatemala, El Salvador, oeste de Honduras e oeste da Nicarágua (Monroe, 1968; Land, 1970; Thurber et al., 1987). Na costa do Atlântico, os locais de nidificação encontram-se ao sul de Tamaulipas e no sul do México até norte da Nicarágua (Howell e Webb, 1995; Frederick et al., 1997). Na Costa Rica é considerada de comum a abundante durante a estação seca (na bacia do Tempisque e no Golfo de Nicoya) com pequeno número de indivíduos em outras áreas ao longo da costa do Pacífico e uma colônia grande na Ilha Pajaros no rio Tempisque e na Ilha de San Pablo (Slud, 1964; Luthin, 1984; Stiles e Skutch, 1989). No Panamá são considerados incomuns ao longo da costa do pacífico e foi documentada apenas uma colônia localizada em Cocoli, em 1930 (Wetmore, 1981; Ridgely e Gwynne, 1989).

No Caribe, são incomuns e residentes locais apenas em parte do ano. Ocorrem colônias em Cuba (Hancock et al., 1992), Hispaniola, Grande Inagua, Andros e nas Bahamas. A classificação mais geral adotada para a distribuição da espécie nesse conjunto de ilhas é: raro ou vagando pela região (Bond 1993; Baltz, 1997; Raffaele et al., 1998; White 1998).

Na América do Sul a distribuição está pouco documentada. Existem registros de grandes concentrações a leste dos Andes, na porção sul, próximo ao norte da Argentina. Na América do Sul, a espécie é mais comum nidificando no interior, diferentemente da América do Norte, onde a maioria das colônias localiza-se nas regiões costeiras. Colônias ao longo da costa Atlântica já foram identificadas na Colômbia e Venezuela. Na Colômbia, são considerados comuns somente a leste de Cartagena e indivíduos não nidificantes já foram vistos no interior dos llanos, Cauca e Vale Magdalena a 1000 m de altitude (Hilty e Brown, 1986). Na Venezuela, a maioria nidifica no interior do país, nos llanos, mas apresenta-se ao longo do Rio Orinoco e no delta Amacuro (Meyer de Schauensee e Phelps, 1978). Ao longo da costa do Atlântico é comum no Suriname, com uma colônia documentada em 1967 próximo a Gandu, no leste do Rio Suriname (Haverschmidt e Mees, 1994). Raro na Guiana Francesa (Tostain et al., 1992). No Brasil, são muito comuns durante o ciclo reprodutivo na região do Pantanal nos estados de Mato-Grosso e Mato-Grosso-do-Sul (Yamashita e Valle 1990, Dubs, 1992). Colônias reprodutivas também foram localizadas no estado do Rio Grande do Sul (Belton, 1984). No Brasil algumas colônias reprodutivas localizadas na região costeira norte, como na ilha do Cajual e no delta do Rio Paranaguá no estado do Maranhão. Na Argentina nidifica ao sul de Córdoba e Buenos Aires, leste do Uruguai (Blake, 1977; Burger, 1978; Narosky e Yzurieta, 1989). É raro na costa do Pacífico na Colômbia e casualmente aparece no Chile (Hilty e Brown, 1986; Araya e Chester, 1993).

Registros da distribuição da espécie fora da época reprodutiva são comuns apenas para populações dos Estados Unidos. Nos demais países esses relatos são escassos ou inexistentes. No Brasil, fora da época reprodutiva, são observados indivíduos em diversas regiões do sul e sudeste do país.

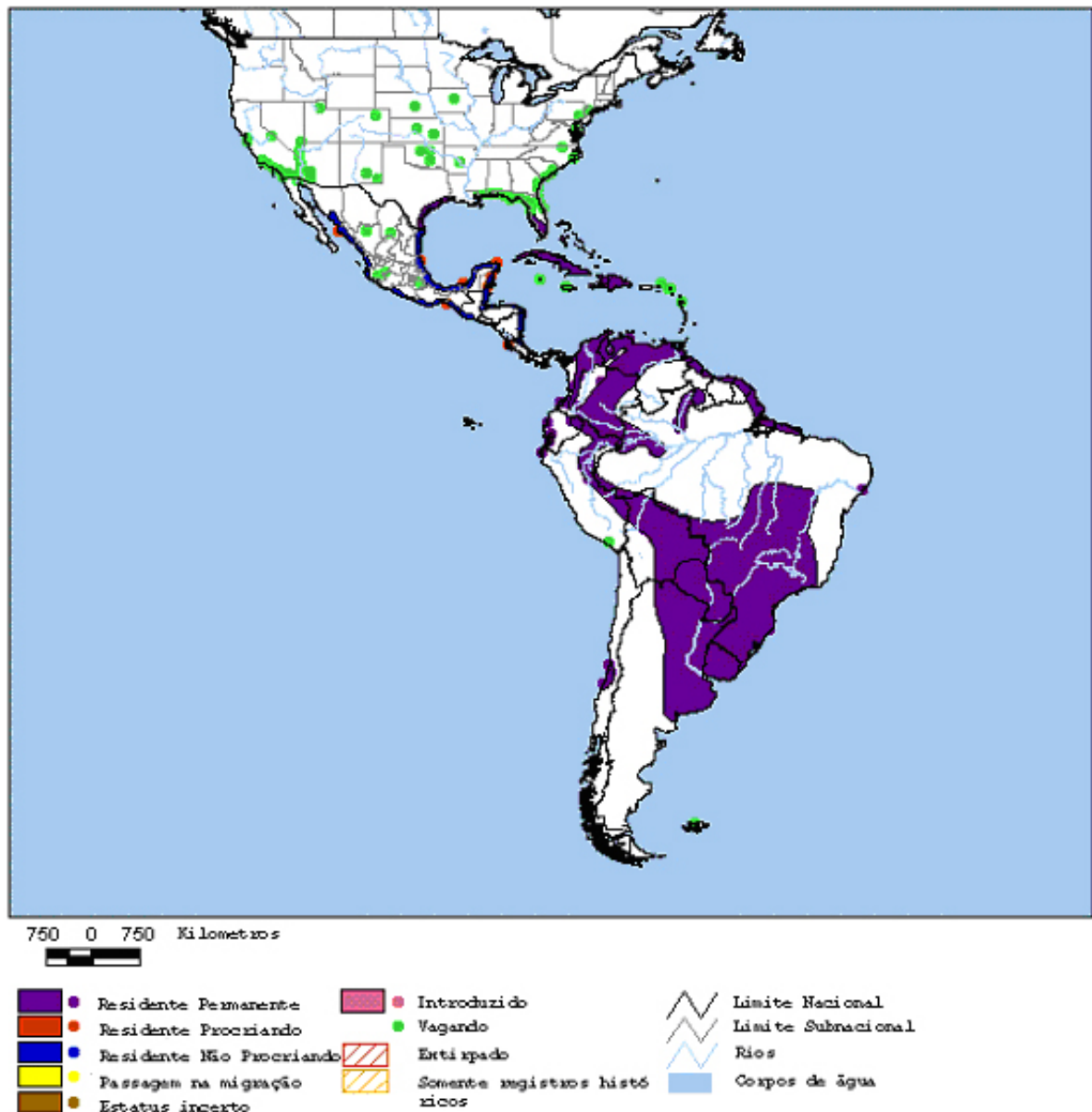


Figura 4. Distribuição da espécie *Platalea ajaja* no continente americano. Modificado de: <[www.natureserve.org/getData/animalData.jsp](http://www.natureserve.org/getData/animalData.jsp)>.

### 1.1.7 Dispersão pós-reprodutiva e migração

As populações de *P. ajaja* dispersam após ciclo reprodutivo ao longo da sua distribuição geográfica (Figura 4). A dispersão pós-reprodutiva está relacionada aos ciclos de seca e inundação, como também à disponibilidade alimentar das áreas ocupadas. Na Costa Rica e na Península de Yucatán, as populações se movem para o interior quando pântanos costeiros e manguezais estão secos e a estação chuvosa está na fase inicial (Stiles e Skutch, 1989; Ornat-Lopez e Ramo, 1992). Na Flórida, a dispersão dos juvenis após a época reprodutiva dos pântanos interiores do continente varia de ano para ano (Robertson *et al.*, 1983). No estado da Louisiana, depois da reprodução, indivíduos dispersam para o interior em resposta à diminuição da concentração de alimento. No Brasil os adultos após ciclos reprodutivos na região do Pantanal e dos banhados do Rio Grande do Sul migram para outras regiões, mas em direções ainda não esclarecidas.

A presença de representantes da espécie o ano todo nos Estados Unidos dificulta a caracterização de seus movimentos. Um pequeno número de recuperações de indivíduos anilhados (recuperados após o primeiro ano de vida) indica que o movimento dos filhotes é errático (Robertson *et al.*, 1983; Telfair e Swepston, 1987; Powell e Bjork, 1990). Dados obtidos por Silva & Bello Fallavena (1995), na região sul do Brasil, indicam que os filhotes de colhereiro após a época reprodutiva dispersam em várias direções.



## 1.2 Estrutura genética de populações de aves e suas implicações

Nas populações naturais geralmente não se observa panmixia completa, ou seja, a probabilidade de um indivíduo qualquer da população cruzar com outro não é igual para todos os indivíduos, existindo, portanto, uma preferência na escolha do parceiro reprodutivo. Essa escolha pode ser influenciada por diversos fatores os quais limitam a panmixia como: a pouca mobilidade dos indivíduos, a preferência por um determinado local para a reprodução (fidelidade ao sítio natal) e a ocorrência de cruzamentos preferenciais. Quando as populações de uma espécie não alcançam o estado de panmixia, suas sub-populações tendem a se apresentar de forma mais estruturada geneticamente. Nesta condição, as mutações que surgem em algumas sub-populações vão levar um tempo para se espalhar por toda a população. Além disso, o endocruzamento em cada sub-população tende a diminuir a sua variabilidade genética. A deriva e a seleção podem levar a uma maior divergência entre as várias sub-populações, mas também podem contribuir para uma diminuição da variabilidade.

As recomendações para o manejo de uma espécie variam significativamente com o nível de estruturação de suas populações. Estratégias conservacionistas diversas são adotadas dependendo se as unidades populacionais estão totalmente isoladas, parcialmente isoladas, se pertencem a uma única população ou se constituem uma metapopulação (Frankham *et al.*, 2002). Por exemplo, se as unidades populacionais estão isoladas e apresentam diferenciação genética, medidas precisam ser tomadas no sentido de garantir a manutenção de todas as unidades populacionais para que adaptações locais sejam mantidas; por outro lado um enfoque menos abrangente poderá ser adotado caso haja fluxo intenso e homogeneizador entre essas unidades (Sole-Cava, 2001).

A combinação de processos históricos e contemporâneos determina a estrutura genética e a distribuição da diversidade genética entre populações (Templeton *et al.*, 1995). A estrutura genética atual pode ser, portanto, resultante do efeito de fatores atuais como o fluxo gênico atual ou ocorrido no passado histórico dessas populações.

Em termos de fluxo gênico, as populações de aves, quando comparadas às populações de outras espécies animais (peixes, mamíferos, répteis e anfíbios) co-distribuídas, apresentam uma composição menos estruturada geneticamente. As aves são capazes de voar, e esse fator favorece a dispersão gênica e a homogeneização das populações (Avice, 1996).

O histórico populacional pode também determinar os padrões de distribuição da variação genética. Processos como os movimentos de retração e expansão das populações, a reunião de populações em refúgios durante os períodos de glaciação no Pleistoceno podem explicar a distribuição da variação genética contemporânea (Hewitt, 2000).

O delineamento da estrutura genética populacional só é possível com o uso de dados genéticos. Marcadores genéticos mitocondriais podem ser usados para traçar a distribuição da variação genética das populações assim como para desvendar seu passado histórico (Templeton *et al.*, 1995).

### **1.3 DNA mitocondrial, características estruturais e seu uso como marcador nos estudos populacionais**

O DNA mitocondrial (DNAmit) começou a ser utilizado na década de 80 e sua aplicação mostrou-se muito boa nos estudos das relações filogenéticas entre espécies e da

estruturação genética das populações (Quinn, 1997). O DNA mitocondrial é um marcador indicado para esse tipo de estudo pelas seguintes características (Awise, 2000; Hillis *et al.*, 1996): 1) Possui herança materna e, com pouquíssimas exceções (William *et al.*, 2004), não sofre recombinação, assim, informações históricas são acumuladas ao longo do tempo na molécula. 2) Pode apresentar um alto polimorfismo intra e inter específico, pois apresenta uma alta taxa de mutação média, se comparado à das seqüências nucleares de cópia única. 3) Grande parte da sua variabilidade é devida às substituições, algumas inserções e deleções. 4) O número de mitocôndrias pode variar muito, dependendo do tecido a ser utilizado, uma vantagem prática na obtenção do material para a análise, determinado pela escolha do tecido.

O tamanho do DNA mitocondrial pode variar de 6 a 2000 kb, dependendo da espécie estudada. Essa estrutura codifica duas espécies de rRNAs, um conjunto mais ou menos completo (tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> e tRNA<sup>Val</sup>) de RNAs transportadores e um número limitado de RNA mensageiros (Nahum, 2001). Nos vertebrados, possui cerca de 15-20 kb, com um número médio de 37 genes, além da região controladora que é uma seqüência implicada no início da replicação do genoma mitocondrial, mas não é codificadora.

No que se refere a sua organização, sua diversidade entre os organismos é reflexo principalmente das histórias evolutivas das espécies (Saccone *et al.*, 1999; Boore, 1999). Alguns grupos como aves, alguns répteis e marsupiais apresentam variação quanto ao número de genes e organização do DNAmít (Figura 5).

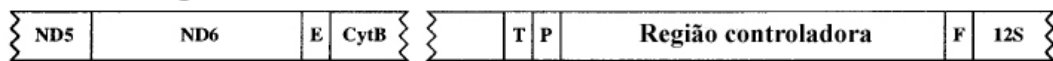
O primeiro genoma mitocondrial totalmente seqüenciado para uma espécie de ave foi o da galinha doméstica (*Gallus gallus*) (Desjardins e Morais, 1990). Como a proporção de guanina (G) nas fitas do DNA mitocondrial é assimétrica, a cadeia rica em G foi denominada de cadeia pesada (H) e a outra cadeia de leve (L). No grupo das aves foram caracterizados dois tipos de ordens gênicos no DNA mitocondrial. A maioria das ordens das aves apresenta parte do seu genoma constituída por genes na seguinte seqüência: citocromo b

(cyt b)/ tRNA<sup>Thr</sup>/ tRNA<sup>Pro</sup>/ NADH desidrogenase 6 (ND6)/ tRNA<sup>Phe</sup>/ Região controladora (RC)/ tRNA<sup>Glu</sup>/ rRNA12S/ tRNA<sup>Val</sup> (Ordens: Galliformes, Struthioniformes, Procellariiformes, Ciconiiformes, Anseriformes, Gruiformes, Charadriiformes, Cuculiformes (Família Musophagidae), Strigiformes, Coraciiformes, Piciformes (Família Bucerotidae) e Passeriformes (Subordem Oscines). Mindell *et al.*(1998) encontraram uma ordem alternativa para esses genes, nas ordens Falconiiformes, Cuculiformes (Família Cuculidae), Piciformes (Família Picidae) e Passeriformes (Subordem Suboscines). Nesses grupos a ordem é: NADH desidrogenase 5 (ND5)/ cyt b/ tRNA<sup>Thr</sup>/ RC/ tRNA<sup>Pro</sup>/ ND6/ tRNA<sup>Glu</sup>/ seqüência não codificante (NC)/ tRNA<sup>Phe</sup>/ rRNA12S. O Gênero *Phylloscopus* de Oscines também possui essa ordem. Esse fato associado à distribuição nos outros grupos de aves sugere uma origem múltipla e independente deste arranjo gênico (Mindell *et al.*, 1998).

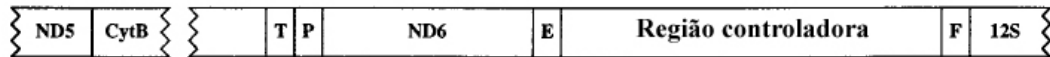
Entre os vertebrados, a região controladora varia em comprimento de 0,73 kb (esturjão branco; Buroker *et al.*, 1990) a 2.1 kb (*Xenopus*; Saccone, Attimonelli, e Sbisà 1987), e é flanqueado pelos genes para a tRNA<sup>Pro</sup> (tRNA<sup>Glu</sup> em aves) e tRNA<sup>Phe</sup>. Essa região está subdividida em uma seqüência central conservada entre duas seqüências muito variáveis. Essa variação se deve a substituições, grandes deleções ou substituições e ainda variações no número de repetições em tandem (Brown *et al.*, 1986). Esses domínios são caracterizados por diferenças na composição de suas bases e pela presença de motivos particulares, conservados e por supostas estruturas secundárias. O domínio central apresenta baixa quantidade de adenina na porção da fita-L, sendo responsável pela formação de uma fita-tripla deslocada (D-), a estrutura do D-loop (Clayton 1991). O domínio mais próximo ao gene da tRNA<sup>Pro</sup> (tRNA<sup>Glu</sup> nas aves) é caracterizado pela grande concentração de adenina, baixa concentração de guanina e seqüências associadas curtas de terminações (Doda, Wright, e Clayton 1981) semelhante a uma estrutura em forma de trevo na porção final 3' do D-loop. O domínio adjacente ao gene tRNA<sup>Phe</sup> contém uma região conservada (CSB-1) associada à outra

estrutura em forma de trevo na porção 5' do D-loop, como também a origem de replicação da fita pesada (OH) e do promotor de transcrição leve (LSP) e pesado (HSP) (Walberg e Clayton 1981; Clayton 1982, 1984). O domínio mais variável tende a ser rico em adenina e apresentar variação de comprimento devido a repetições em tandem. Essa é a maior variação de comprimento encontrada no DNA mitocondrial (Brown *et al.*, 1986; Saccone, Attimonelli, e Sbisa 1987).

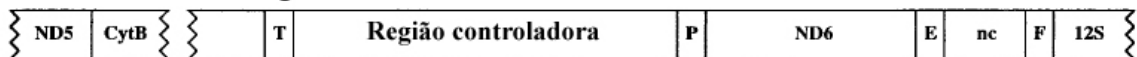
**a** Ordem dos genes mitocondriais em vertebrados não-aves



**b** Ordem comum a maioria das espécies de aves



**c** Nova ordem dos genes em aves



**Figura 5.** Figura demonstrando o padrão do DNAmít nas aves (Fig. a representa o DNAmít dos vertebrados, não pertencentes ao grupo das aves; Fig. b representa o DNAmít comum a maioria das espécies de aves, sendo esse modelo o adotado neste estudo; Fig c representa uma nova ordem dos genes mitocondriais, propostos por Mindell *et al.*, 1998). Modificado de Mindell *et al.*, 1998.

## **Proposta do trabalho e Objetivos**

## 2. A proposta do trabalho

Estudos de genética de populações de *P. ajaja* ainda são restritos (Dumas, 2000). Um baixo nível de variabilidade genética foi encontrado na população do Pantanal através de uma abordagem alozímica, pois dos 20 locos estudados apenas três se mostraram polimórficos (Santos, 2003). Sawyer (2002) isolou 32 locos de microssatélites na espécie, mas apenas cinco apresentaram polimorfismo em uma amostra de 51 indivíduos provenientes de zoológicos norte-americanos.

Segundo o último censo de aves aquáticas as populações da espécie não têm apresentado declínio no tamanho e a espécie não está listada como ameaçada de extinção em nenhuma região do continente americano.

Quando há distúrbios graves nas áreas úmidas, envolvendo perda do habitat, as espécies de aves aquáticas podem se tornar ameaçadas de extinção. Na ordem dos Ciconiiformes temos dois exemplos: a espécie *Mycteria americana* ameaçada no sudeste dos Estados Unidos (EUA; USFWS, 1984) após descaracterização da região dos Everglades e a espécie *Jabiru mycteria*, ameaçada na América Central onde seu habitat foi destruído principalmente pelas atividades agrícolas (Luthin, 1987).

Yamashita e Valle (1990) denunciaram o turismo predatório no Pantanal e suas conseqüências como a perda de ovos ou filhotes nas colônias reprodutivas dessa espécie, devido ao abandono dos ninhos pelos pais e a ação dos predadores. Esses autores relatam ainda o abandono definitivo das colônias em duas ocasiões e atribuem esse fato à presença de turistas e equipes de filmagem os quais utilizaram armas de fogo e rojões para provocar a revoadas dos pais e jovens ninhegos. A ação antrópica tem influenciado o regime das águas na

região dos banhados do Rio Grande do Sul, mais especificamente na região do Taim (Marques *et al.*, 2000). Não se sabe se esses distúrbios têm afetado essas populações de aves aquáticas, mas se continuado, poderá vir a causar o abandono dos sítios reprodutivos e o não estabelecimento futuro das colônias de *P. ajaja*. Considerando a vulnerabilidade dessas regiões úmidas e a possibilidade da ocorrência de distúrbios num futuro próximo, justifica-se a caracterização de populações de *P. ajaja* brasileiras antes que seus habitats sejam degradados e as populações sejam dizimadas.

Diversos fatores influenciam a distribuição da variabilidade genética entre as populações de uma espécie. Fatores como padrões comportamentais e de dispersão podem estar agindo no presente assim como o passado histórico dessas populações e também pode explicar essa distribuição.

Os padrões de dispersão de *P. ajaja* não foram ainda determinados, com exceção dos padrões de migração pós-reprodutiva. Os movimentos de dispersão que contribuem para a estruturação genética das populações são aqueles que envolvem a troca gênica entre integrantes de colônias reprodutivas diferentes e esse movimento pode ser diferente nos dois sexos. Melvin *et al.* (1999), estudaram padrões de dispersão de várias espécies de Ciconiiformes (cinco ardeídeos e três tresquiornitídeos) pelo método de captura e recaptura. Esses autores demonstraram que das sete espécies estudadas apenas *Eudocimus albus*, pertencente à família Threskiornithidae, a mesma família de *P. ajaja* apresentou distâncias menores entre o local de anilhamento e da recuperação. Comparando-se as duas famílias estudadas, observa-se que as três espécies de tresquiornitídeos tendem a dispersar menos que o grupo dos ardeídeos.

O grau de filopatria natal de *P. ajaja* não foi ainda estudado, porém, um estudo realizado em uma espécie europeia do mesmo gênero (*Platalea leucorodia*) indicou que o grau de filopatria natal é alto observando-se, entretanto, alguns deslocamentos das colônias



para outros locais não usuais (De le Court, 1997). Relatos de mudanças na localização das colônias reprodutivas do colhereiro, semelhante aos reportados para *P. leucorodia*, também foram observados na região do Pantanal.

Se esses padrões de dispersão observados para os tresquiornítídeos e o alto grau de filopatria natal na espécie *P. leucorodia* são indicativos da capacidade de troca entre integrantes de colônias reprodutivas desse grupo pode-se supor que o fluxo gênico na espécie *P. ajaja* seja menor do que o proposto para outras espécies da ordem Ciconiiformes.

Com relação ao histórico populacional, as populações de *P. ajaja* podem ter sofrido deslocamentos semelhantes aos supostos para *M. americana*, durante a última glaciação (Rocha *et al.*, 2004). Mudanças climáticas nesse período podem ter modificado a disponibilidade alimentar no centro-oeste e sul da América do Sul. A diminuição do nível do mar (aproximadamente 120m) parece ter comprometido muitos corpos d'água, mudando a paisagem de muitas localidades (Clapperton, 1993a). O clima tornou-se em geral mais seco e houve uma diminuição na temperatura média de cerca de 4-12° C, comparadas às médias atuais. Na região do Pantanal, um dos prováveis quadros é que este tenha se tornado um semi-árido (Ab'Saber, 1977) ou uma região de savanas e cerrado com porções apresentando dunas de areia (Clapperton, 1993a). Já a região do Rio Grande do Sul parece ter se tornado uma região muito seca e fria neste mesmo período. Os dados para essa região são mais precisos que os encontrados para a região Centro-Oeste do Brasil. Supõe-se que a região do Banhado do Taim e grande parte do Rio Grande do Sul tornaram-se desértica nesse período de glaciação (Ab'Saber, 1977; Clapperton, 1993a). Essas mudanças climáticas podem ter forçado as populações de *P. ajaja* a procurar novas regiões para forrageamento e reprodução. Pode-se supor que as aves se deslocaram nesse período para regiões localizadas mais ao norte da América do Sul, onde foram menores as alterações climáticas. Com o fim da glaciação, supõe-se que essas aves tenham começado um processo de re-colonização do continente

americano, ocupando gradativamente as regiões abandonadas, localizadas no centro-sul da América do Sul. Como o pico da última glaciação ocorreu em tempos diferentes na região centro-oeste (27000 anos atrás) e no sul do país (20000-18000 anos atrás), hipotetiza-se que a região do Pantanal tenha sido primeiramente ocupada do que a região sul do país.

### **3. Objetivos**

Esse trabalho teve como objetivo determinar a estrutura genética/populacional de algumas colônias reprodutivas de *P. ajaja* em duas importantes regiões úmidas brasileiras: Pantanal e nos banhados do Rio Grande do Sul, baseando-se nos dados de seqüência de uma porção da região controladora do DNA mitocondrial.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Estimar a variabilidade genética das unidades populacionais amostradas na região do Pantanal.
- 2) Verificar se as unidades populacionais da região do Pantanal estão ou não estruturadas geneticamente.
- 3) Investigar o histórico populacional e diagnosticar se ocorreu variação no tamanho dessas unidades populacionais.

# **Material e métodos**

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Área de estudo**

#### **4.1.1 Pantanal**

O Pantanal é uma planície alagada com cerca de 137.000 km<sup>2</sup>, localizada no centro-oeste do Brasil. Parte desta área está na fronteira com a Bolívia e Paraguai. Esta região recebe a água proveniente das partes altas adjacentes, de bacia hidrográfica de 359.000 km<sup>2</sup> (Hamilton *et al.*, 1996). A área está dividida em Alto, Médio e Baixo Pantanal. As planícies são alagadas quando aproximadamente 20% dos córregos altos extravasam de seus leitos no Alto Pantanal, enquanto que, 80% destes córregos extravasam no Baixo Pantanal (Alho *et al.*, 1988).

O período chuvoso vai de outubro até março e a água pluvial é responsável por mais de 90% da água do alagamento da planície. As áreas com volumes de água abertos, isto é, lagoas e lagos que não são formados nas cheias, são mínimas (Hamilton *et al.*, 1996). A flutuação anual nas áreas alagadas é mais extrema no Alto Pantanal, onde a inundação é máxima em março-abril e mínima em outubro-novembro (Hamilton *et al.*, 1996). O Pantanal está na parte mais ao norte da Bacia do Rio Paraguai, incluindo o Rio Cuiabá (aproximadamente 15,5°-17,5° Sul e 55°-59° Oeste). Seus rios fluem para o sul e são separados dos da Bacia Amazônica, ao norte, pelas cadeias de montanhas das Serra dos Parecis e Serra Azul (Brasil, 1974).

Nesta região a temperatura média do mês mais frio (julho) é de 18°C, o inverno coincide com a estação seca e as temperaturas médias anuais variando entre 20 e 28°C (Köppen, 1948). A pluviosidade média anual é de 1500 mm e a região caracteriza-se ainda

por duas estações bem marcadas, um inverno seco e um verão chuvoso, sendo o verão influenciado pela massa Equatorial continental e o inverno pela massa Equatorial atlântica.

O Pantanal corresponde a um mosaico faunístico com componentes do Cerrado, Chaco, Mata Atlântica e Amazônica, em meio a campos sazonais inundáveis, denominado Complexo do Pantanal (Pádua, 1983). A concentração sazonal de chuvas é que determina a periodicidade da estação seca e chuvosa. A baixa declividade do terreno, além da configuração geológica que propicia a captação de grande quantidade de água nas cabeceiras dos rios de diversas regiões, resulta no alagamento e na lenta drenagem da região (SUDECO, 1979). A abundância de ambientes de águas rasas com grande biomassa de invertebrados e pequenos peixes sustenta a grande comunidade de aves, que se concentra na região durante seu período reprodutivo coincidente com o pico da estação seca (Yamashita e Valle, 1990).

#### **4.1.2 Banhados do Rio Grande do Sul**

O Rio Grande do Sul possui uma área de 282.062 km<sup>2</sup>, sendo o segundo estado do país em número de corpos de água. Na região centro-norte do litoral desse estado localiza-se a Lagoa dos Patos e no litoral sul, situam-se duas grandes lagoas: a Lagoa Mirim e a Lagoa Mangueira. Associada a essas lagoas estende-se um complexo sistema de banhados, áreas úmidas e pequenas lagoas isoladas, além de algumas matas de restinga. Considerando-se os arroios e rios, existem nesse estado cerca de 118 mil corpos de água diferentes. Somente em lagoas, são 12.908 km<sup>2</sup> tomados pela água (cerca de 4,57% da superfície do Rio Grande do Sul).

Esta região destaca-se pela importância dos banhados e áreas úmidas marginais, com uma macrofauna bastante diversificada, especialmente de aves aquáticas. Várias espécies de aves que ocorrem no Brasil são exclusivas do extremo sul, sendo encontradas nesta região as principais áreas de reprodução, alimentação e refúgio para muda (desasagem) de algumas espécies raras, ameaçadas, migratórias ou de grande interesse cinegético (Sick, 1997).

A estação ecológica do Taim apresenta uma área de 111.355 hectares. Está localizada no litoral sul do RS, mais a Ilha de Taquari, situada na Lagoa Mirim. O Banhado é o habitat provisório de uma infinidade de aves migratória e morada de centenas de espécies nativas que aproveitam a diversidade de ecossistemas ali existente para acasalar e reproduzir.

A região do Banhado sofre a influência antrópica de basicamente dois tipos de atividades humanas, o cultivo do arroz e a pecuária, nos períodos de repouso dos campos de arroz (Marques *et al.* 2005). A necessidade do alagamento dos campos de cultivo dos arrozais influencia na drenagem normal das águas da região. Outros fatores impactantes para o regime de águas da região são a BR 417 e as obras de drenagem e a construção da barragem eclusa do Canal de São Gonçalo.

## 4.2 Amostras

Foram coletadas 11 amostras de penas em crescimento e 39 de sangue de filhotes de *Platalea ajaja*. Foram visitadas quatro colônias reprodutivas do Pantanal (Fazenda Retirinho, FR (19°50'S, 56°02'O), 15 indivíduos; Porto da Fazenda, PF (16°27'S, 56°07'O), 6 indivíduos; Baía de Gaíva, BG (16°34'S, 57°14'O), 14 indivíduos e Fazenda Ipiranga, FI

(16°25'S, 56°36'O), 4 indivíduos) e 1 colônia no Rio Grande do Sul (Banhado do Taim, TA (32°29'S, 52°32'O), 11 indivíduos). As amostras obtidas no Rio Grande do Sul consistiam de penas em crescimento (Figura 6).

As amostras foram coletadas de filhotes com idade aproximada de três semanas, sendo amostrado um filhote por ninho. Foi escolhida essa idade a fim de minimizar o impacto da presença humana na colônia reprodutiva, pois os filhotes nessa faixa etária, já atingiram um tamanho que não os deixa vulneráveis ao ataque de predadores aéreos como o caracará (*Caracara plancus*) e os urubus (*Coragyps atratus*). Com essa idade, os indivíduos suportam mais o estresse da manipulação e retirada de sangue sem maiores danos aos filhotes.



Figura 6. Fotografia de satélite com a localização das colônias reprodutivas amostradas. Modificado de “Google Earth”.

Na região do Pantanal, nas proximidades da cidade de Poconé, foi observado que o colhereiro (*P. ajaja*) se reproduz em colônias mistas com as espécies de cabeça-seca (*M. americana*) e garça branca grande (*A. alba*). Os ninhos são construídos em matas ciliares,

capões e matas de cordilheira de alto porte, entre 12 a 25 m de altura (Yamashita e Valle, 1990). Colônias como as de Baía de Gaíva e Fazenda Ipiranga possuem ninhos a alturas menores, entre 7-10 metros (observação pessoal).

Foram utilizados dois tipos de equipamentos para a subida até o ninho e coleta dos filhotes, escadas de 7 metros de altura e equipamento de escalada (cordas estáticas, jumar, ascensor, fitas e mosquetões). Os filhotes foram capturados com uma vara com laço corrediço de nylon, preso à ponta de uma vara, construída com um cano plástico de PVC rígido, tendo a extremidade do laço recoberta com uma espuma para minimizar a agressão aos filhotes (Figura 7) (IBAMA, 2005). Após a captura os indivíduos foram colocados em sacos pretos de algodão e descidos por uma roldana até o chão e manipulados em uma mesa de campo onde foram feitas as medições, o anilhamento e a coleta de material biológico (penas e sangue) (Figura 7). Cada filhote manipulado foi levado de volta e recolocado novamente em seu ninho.

Na região do Taim (Rio Grande do Sul), as colônias na sua maioria estão localizadas em juncais e os ninhos são construídos numa altura baixa, dentro das lagoas, onde esse tipo de vegetação cresce. A coleta nessa região foi realizada com a ajuda de uma canoa. O filhote foi retirado do ninho com as mãos e depois realizado os procedimentos de coleta do material biológico dentro da canoa. Após a manipulação, os filhotes foram devolvidos aos seus respectivos ninhos.





**Figura 7.** Procedimentos de captura e coleta de material biológico de colhereiros, na região do Pantanal, Baía de Gaíva em 2003. Em “A” captura dos filhotes, em “B” manipulação dos filhotes e em “C” e “D”, respectivamente, coleta de sangue e penas em crescimento. Foto: S. Del Lama.

### 4.3 Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989).

A quantificação das amostras foi realizada, utilizando um espectrofotômetro (Beckman, DU 520, com lâmpada UV) nos comprimentos de onda de 260nm (verificar a quantidade de DNA presente) e de 280nm (verificar a quantidade de proteínas). Depois de quantificadas, as amostras foram diluídas em água destilada a fim de se obter uma concentração de DNA de 40ng/μl por amostra.

#### 4.4 Amplificação dos fragmentos da região controladora e purificação do DNA molde para reações de sequenciamento

Oligonucleotídeos iniciadores para a região controladora de *P. ajaja* não foram previamente descritos e seqüências dessa região não foram encontradas em nenhuma base de dados. Oligonucleotídeos desenhados para uma espécie próxima, o cabeça-seca (*Mycteria americana*, Aves: Ciconiiformes) foram utilizados nas reações em cadeia de polimerase (PCR). Alguns desses foram utilizados por Freitas (2002) e Tomasulo-Seccomandi (2004) na análise da região controladora do DNA mitocondrial de cabeça-seca:

HCSB-1 (5' TCCGACAAGCATTCACTAAAT 3')

L16525 (5' ACAAACACCACCARCATHCCHCC 3')

WS-L36 (5' TTCCTCCCAAATAAACCATA 3')

Para a realização das reações, utilizaram-se dois conjuntos HCSB-1+L16525 e HCSB-1+WS-L36.

A amplificação de algumas amostras foi testada com o conjunto HCSB-1+L16525 e todas foram testadas com HCSB-1+WS-L36. As amplificações foram realizadas, a um volume total de 12,5 µl. Para os conjuntos HCSB-1+WS-L36 e HCSB-1+L16525, continham: 3µl de DNA (40ng/µl), 1,25µl de tampão ( $Mg^{2+}Cl_2$  1,5mM), 1,25µl de dNTP (1,25µM de cada base), 0,5µl de cada oligonucleotídeo (10µM), 0,5µl de Taq polimerase (1U/µl, Biotools) e 5,5µl de água.

A mistura de reação foi submetida a uma desnaturação inicial de 96° C, 5 minutos, seguidos por 5 ciclos de 96° C 30'', 55° C -30'' e 72° C-1'; 21 ciclos de 96° C-30'',

55° C-30'' e 72° C-1', sendo a temperatura de 55°C diminuída 0,5° C a cada ciclo (touchdown), 10 ciclos de 96°C-30'', 44,5° C-30'' e 72°C-1', e finalizado com um passo de extensão à 72° C-10'.

Os produtos de PCR foram purificados diretamente de gel de agarose 2%, após eletroforese. Foi utilizado para a purificação, o kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences).

Após a purificação, os produtos de PCR foram seqüenciados em um MegaBace 1000 (Amersham Bioscience). O sequenciamento foi realizado segundo protocolo para MegaBace (Amersham Bioscience), utilizando DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser com Base Caller Cimarron 3.12 (Amersham Bioscience).

Sequenciamentos preliminares mostraram que o sequenciamento no sentido "reverse" (considerado aqui o da fita L) não apresentava boas seqüências para análise, assim sendo, cada amostra foi seqüenciada duas vezes, utilizando o oligonucleotídeo iniciador HCSB-1 como molde. No caso de discordância entre os pares das seqüências, a amostra foi seqüenciada uma terceira vez. Devido a resultados insatisfatórios dos testes com os oligonucleotídios iniciadores de cabeça-seca, foram utilizadas quatro amostras de colhereiros, sendo cada uma delas pertencente a uma colônia (FR, PF, BG e TA) para o seqüenciamento e desenho de um oligonucleotídeo iniciador (LPA-01) o qual seria utilizado em conjunto com HCSB-1 (desenvolvido para uma região mais conservada do genoma mitocondrial das aves). A qualidade das quatro seqüências foi checada manualmente, através da análise dos eletroferogramas. Após alinhamento com o programa Bioedit 7.0 (Hall, 1999), um oligonucleotídeo iniciador foi desenhado LPA-01: 5' TATGTCAGGCGAGCATTCAA 3'.

Todas as amostras foram amplificadas, num volume final de 150  $\mu$ l (3 reações de 50  $\mu$ l, realizadas ao mesmo tempo). As condições para a realização das reações de PCR, utilizando o conjunto HCSB-1+LPA-01 foram: 10 $\mu$ l de DNA (40ng/ $\mu$ l), ( $Mg^{2+}Cl_2$  1,5 mM), tampão padrão da Taq Biotools para reações de PCR, BSA (1g/ml), dNTP (1,25 $\mu$ M de cada base), cada oligonucleotídeo (10 $\mu$ M), 2 U de Taq polimerase (Biotools) .

A mistura de reação foi submetida a uma desnaturação inicial de 96° C, 5', seguidos por 45 ciclos de 96° C-45'', 60° C-1' e 72° C-1' 30'', finalizando com uma extensão de 72° C-10'.

Os produtos de PCR foram purificados diretamente do gel de agarose 2%, após eletroforese em TBE, utilizando o kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences) e seqüenciados duas vezes adotando HCSB-1 como molde. As reações foram realizadas em um MegaBace 1000 (Amersham Bioscience), como as amostras anteriores.

HCSB-1 localiza-se num ponto de divisão entre o segundo e terceiro domínios da região controladora do DNA mitocondrial, enquanto que WS-L36 e L16525 localizam-se na porção do DNA mitocondrial conhecida como ND6. Seqüências obtidas a partir dos oligonucleotídeos HCSB-1+L16525 e HCSB+WS-L36, referem-se ao primeiro domínio da região controladora. O oligonucleotídeo desenhado nesse trabalho, utilizado em conjunto com HCSB-1 levou a obtenção de seqüências de 483pb inserido no primeiro domínio da região controladora do DNA mitocondrial dessa espécie (Figura 8).

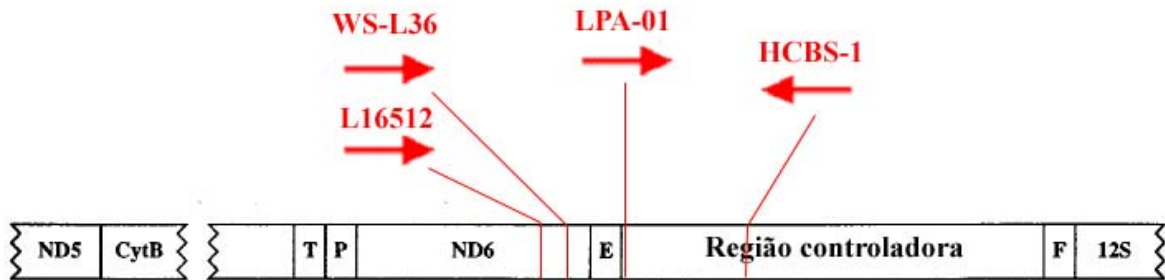


Figura 8. Figura com a localização dos oligonucleotídeos iniciadores em uma representação do DNA mitocondrial. A localização e organização das regiões do DNA mitocondrial é representativa da disposição encontrada para a maioria das famílias de aves. Setas em vermelho representam o sentido da extensão dos produtos nas reações de PCR. Modificado de Mindell, 1998.

## 4.5 Análise das seqüências

### 4.5.1 Alinhamento das seqüências

Utilizando o programa Bioedit v 7.0 (Hall, 1999), as seqüências obtidas do MegaBace 1000 foram alinhadas e os respectivos eletroferogramas checados. Cada resultado foi analisado individualmente e comparado ao seu respectivo eletroferograma pelo menos duas vezes. Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa Clustal W do pacote do Bioedit v. 7.0 (Hall, 1999). Os alinhamentos foram também checados manualmente, pelo menos duas vezes, e comparados aos seus eletroferogramas para a certificação da posição das bases nitrogenadas nas seqüências obtidas. Em caso de dúvida um terceiro sequenciamento foi realizado e novamente comparado com a amostra em questão. Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores.

#### **4.5.2 Variabilidade da região controladora**

Através do programa Arlequin v 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) foram calculados os índices de diversidade haplotípica (H) e diversidade nucleotídica ( $\pi_n$ ), além da composição percentual das bases, número de haplótipos, suas frequências e sua distribuição entre as colônias.

#### **4.5.3 Análise de máxima parcimônia**

A análise de máxima parcimônia foi utilizada como uma primeira maneira de se obter informações sobre agrupamentos entre as colônias amostradas. Para a análise de parcimônia foram considerados apenas os haplótipos distintos. A árvore de haplótipos foi construída pelo programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004), baseada no modelo de máxima parcimônia (Huelsenbeck e Crandall, 1997), incluindo como grupo externo a sequência consenso da espécie *M. americana* (Lopez e cols, 2006).

#### **4.5.4 Rede haplotípica e Análise de clados aninhados (NCA, “Nested Clade Analysis”)**

As seqüências foram transformadas manualmente em arquivos do tipo Phylip (Felsenstein, 2001) para os cálculos, e a rede de parcimônia estatística foi traçada pelo programa TCS (Clement *et al.*, 2000). Os clados foram aninhados, seguindo os passos publicados por Templeton (1987) para a utilização numa análise aninhada de clados (Nested Clade Analises). A estrutura montada foi utilizada na criação do arquivo de entrada do programa Geodis (Posada *et al.*, 2000), o qual leva em consideração a posição geográfica das amostras e testa à correlação entre as distâncias mutacionais e geográficas. O resultado obtido através do programa foi analisado segundo a chave de inferência descrita por Templeton (2004).

#### **4.5.5 Estruturação populacional**

##### **4.5.5.1 Análise de variância molecular (AMOVA)**

A análise de variância molecular utiliza as frequências haplotípicas e o número de mutações entre haplótipos para testar a significância dos componentes da variância molecular associada com diferentes níveis hierárquicos (entre as populações ( $\Phi_{ST}$ ), entre populações dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ ) e entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )) por meio de um procedimento permutacional não paramétrico. Os agrupamentos que maximizam as porcentagens da variação entre grupos, minimizando os valores entre populações dentro dos grupos. São

assumidos como refletindo a subdivisão geográfica mais provável (Excoffier e cols, 1992). O programa utilizado para esse cálculo foi o Arlequin v 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

O valor de  $F_{st}$  de Wright (1943) também foi calculado para verificar se as populações estão ou não estruturadas e para comparação com resultados de outros trabalhos.

A localização geográfica das colônias foi utilizada na definição dos agrupamentos necessários para os cálculos de AMOVA e também foram usadas no cálculo do  $F_{st}$ . Para a realização dessas análises, foram considerados os seguintes grupos:

1) **Pantanal**, cada colônia da região do Pantanal (PF, FR, FI e BG) foram consideradas uma sub-unidade populacional.

2) **Pantanal Norte**, Porto da Fazenda, Fazenda Ipiranga e Baía de Gaíva foram considerados pertencentes à região norte.

3) **Pantanal Sul**, Fazenda Retirinho foi à única população amostrada na região sul.

4) **Rio Grande do Sul**, Taim foi considerada uma sub-unidade populacional distinta do Pantanal.

#### 4.5.6 Testes de Neutralidade e Expansão populacional

O tamanho efetivo da população ( $N_e$ ), considerando apenas as colônias do Pantanal, foi calculado pela fórmula  $N_e = 10^6 * (p/s)/g$  (Wilson *et al.*, 1985) onde  $p$  é o número médio de diferenças pareadas entre as seqüências (ou diversidade nucleotídica (Nei e Li, 1979)) 0,004,  $s$  é a taxa de mutação e  $g$  o tempo de geração (3 anos). Devido à variação da taxa de mutação existente na região controladora, encontrada em diversas espécies de aves, foi utilizada uma comparação entre seqüências consenso do citocromo-b e da região



controladora entre duas espécies, *P. ajaja* e *M. americana* a fim de se obter a taxa de mutação da região controladora para a espécie *P. ajaja*. A taxa de mutação da região controladora de colhereiro foi estimada em 9,16%, baseado na divergência da região controladora e citocromo-b, respectivamente 61,4% e 13,4% (dados do citocromo-b não publicados) (Moum e Árnason, 2001).

Foram efetuadas por meio do programa Arlequin v 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) os testes de “Mismatch distribution”, o qual mede as diferenças entre os pares de seqüências e também os testes de neutralidade de  $F_s$  de  $F_u$  (Fu, 1997) e o  $D$  de Tajima (Tajima, 1989a). Também foi calculado o  $R_2$  de Rozas (Ramos e Rozas, 2002), pelo programa DnaSP (Rozas, 2003).

Caso fosse detectado processo de expansão populacional, o modelo de Rogers e Harpending (1992) seria utilizado para os cálculos do tempo desde a ocorrência da expansão. Segundo esse modelo a distribuição das diferenças pareadas apresenta uma distribuição multimodal em amostras de populações que estão em equilíbrio demográfico, mas normalmente é unimodal em amostras de populações que sofreram um processo de expansão demográfica recente (Rogers e Harpending, 1992; Schneider & Excoffier, 1999).

Nesta aproximação, os parâmetros estimados de expansão:  $\tau=2ut$ ,  $\theta_0=2N_0u$ ,  $\theta_1=2N_1u$  podem ser utilizados para uma simulação do processo de expansão.

O cálculo para se estimar o tempo absoluto da expansão depende de três parâmetros que devem ser assumidos: o tempo de geração, a taxa de mutação por milhão de anos da região do DNA em estudo e o tamanho da seqüência analisada. O tempo de geração assumido foi o de três anos, sendo esse o tempo médio em que o indivíduo jovem realiza o primeiro acasalamento (Dumas, 2000). O modelo utiliza uma taxa de mutação por seqüência por base por milhão de anos, assim, utilizamos para esse valor o tamanho da seqüência obtida vezes o tempo de geração vezes a taxa de mutação vezes  $10^{-6}$  anos, para estimar o valor de  $u$ .

Os valores de  $\tau$ ,  $\theta_0$  e  $\theta_1$  gerados pelo programa ARLEQUIN utilizando a opção “pairwise differentiation”, com 1000 replicações, seriam usados para estimar o tempo desde a expansão populacional detectada na região do Pantanal. Segundo Schneider e Excoffier (1999), quando  $\tau$ ,  $\theta_0$  e  $\theta_1$  apresentam valores como  $\tau > 0$  e  $\theta_1 > \theta_0$  a população passou por um processo de expansão, mas quando  $\tau = 0$  e  $\theta_1 = \theta_0$  a população não sofreu variação no seu tamanho populacional. Os parâmetros  $N_0$  e  $N_1$  que são respectivamente o tamanho efetivo da população antes e depois da expansão.

Este modelo está baseado na distribuição de diferenças pareadas, neutralidade e no número de sítios polimórficos (Roger e Harpending, 1992; Schneider e Excoffier, 1999; Wakeley e Hey, 1997).

# Resultados

## 5. Resultados

### 5.1 Amplificação e sequenciamento de um fragmento de 483pb da região controladora na espécie *Platalea ajaja*

Dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores foram testados (HCSB-1+L16525 e HCSB-1+WS-L36), tendo ambos, resultado na amplificação de fragmentos de tamanho aproximado de 800pb. Na amplificação com o conjunto HCSB-1+L-16525, além do fragmento de tamanho esperado, obtido com baixo rendimento, observou-se à amplificação de outros fragmentos inespecíficos. Melhores resultados foram obtidos na amplificação com WS-L36 porque esse oligonucleotídeo iniciador foi desenhado a partir da seqüência da região controladora de *M. americana* enquanto que L16525 foi desenhado a partir da comparação entre seqüências de cinco espécies de aves (Sorenson e cols, 1999). Nas amplificações com o par HCSB-1+WS-L36 não foram observados fragmentos inespecíficos e o rendimento obtido foi considerado razoável para o sequenciamento. As reações de amplificação quando foram estendidas para o restante das amostras resultaram em não-amplificação de 17 indivíduos. Testes foram realizados modificando-se as condições de temperatura, concentração de magnésio e concentração de BSA além das temperaturas de anelamento, porém as reações de PCR continuaram não resultando na da amplificação do produto esperado.

O uso do par HCSB-1+WS-L36 não permitiu o estudo populacional e novos oligonucleotídios específicos foram desenhados a partir de seqüências obtidas utilizando fragmentos amplificados com o conjunto acima citado. Foram seqüenciadas duas vezes cada quatro indivíduos, representantes de quatro colônias reprodutivas, utilizando-se apenas o oligonucleotídeo HCSB-1 como molde. Esse marcador, desenhado para a espécie *M. americana*, possui a mesma seqüência de nucleotídeos observada também em *Gallus gallus* e

anela na região conservada CSB-1 (Desjardins e Moraes, 1990). O alinhamento desses fragmentos resultou numa seqüência consenso de 502 pb com uma região conservada na extremidade oposta ao do HCSB-1. A região compreendida entre as bases 470-498 apresentou uma condição ótima para o desenho de um novo oligonucleotídeo iniciador: temperatura de anelamento muito próxima a HCSB-1 (62°C), e seqüência não favorável à formação de dímeros entre os oligonucleotídeos. As amplificações utilizando o novo conjunto (HCSB-1+LPA-01) resultaram em seqüências, que alinhadas, apresentaram tamanho de 483pb. Apenas o produto esperado foi obtido nessa amplificação na temperatura de hibridação de 60°C e o rendimento obtido foi suficiente para o sequenciamento.

As 50 seqüências obtidas foram alinhadas e a seqüência consenso, utilizada pelo programa BLAST (McGinnis e Madden, 2004) para verificar a homologia entre essa seqüência e as das regiões controladoras dos demais grupos de aves. Esse programa apresentou uma similaridade que variou entre 56-32% não alinhando com nenhuma outra espécie fora do grupo das aves.

## **5.2 Análise da variabilidade genética**

A análise das seqüências dos fragmentos de 483pb da região controladora compreendeu um conjunto de 50 indivíduos provenientes de cinco colônias (quatro do Pantanal e uma da região do Taim no sul do país). Foram determinados 16 haplótipos (Tabela 1) gerados pela variação genética pontual detectada em 22 sítios sendo seis transições, uma transversão e oito deleções. A porcentagem das bases encontrada foi de: C: 21.12% T: 18.14% A: 32.90% G: 27.84%.

Analisando-se conjuntamente as colônias amostradas, verificou-se que dois haplótipos apresentaram frequências muito superiores aos demais: o haplótipo A (0,42) e o haplótipo J (0,26), presentes em todas as localidades. A colônia de Baía de Gaíva apresentou cinco haplótipos privados (B, C, I, N e P), Fazenda Retirinho quatro (D, F, M e O) e Porto da Fazenda dois (G e K); a colônia do Taim apresentou apenas um haplótipo privado (L). Na colônia de Fazenda Ipiranga não foi encontrado nenhum haplótipo privado.

Tabela 1. Distribuição geográfica e ocorrência dos 16 haplótipos determinados para o fragmento de 483 pb da região controladora do DNAmIt nas populações de *P. ajaja* do Pantanal (Porto da Fazenda, PF; Fazenda Retirinho, FR; Fazenda Ipiranga, FI e Baía de Gaíva, BG) e do Rio Grande do Sul (Banhado do Taim, TA). Os números na vertical indicam a posição da variação. Espaços em branco indicam igualdade com o haplótipo A. Os hífen indicam deleções e inserções (Gap).

Haplótipos	Sítios polimórficos																				Indivíduos por colônia reprodutiva							
	2 8	3 0	3 1	7 9	1 3 6	1 4 8	1 5 0	2 6 9	2 7 4	2 9 5	3 1 8	3 2 1	3 4 6	3 4 7	3 6 7	3 7 5	3 7 7	4 9 5	4 6 3	4 6 5	4 7 5	PF	FR	FI	BG	TA	Total	
A	T	A	-	-	C	A	G	G	A	C	-	A	-	G	-	-	C	-	-	T	G	-	2	6	2	5	6	21
B			-	-							-	-		-	-		-	-							1		1	
C			-	-							-		-		-		-	-	C						1		1	
D			-	-							-		-	-	-		-	-					1				1	
E	C		-	-							-		-		-	-		-					1		1		2	
F	C		-	-							C		-		-	C		-					1				1	
G			T	-							-		T		-	-		A	C			1					1	
H			-	-					G		-		-		-	-		-					1	1			2	
I			-	-	-	G	A			-		-		-	-		-	-							1		1	
J			-	-							A	-	-		-	-		-				2	3	1	3	4	13	
K			-	-				A			A	-	-		-	-		-				1					1	
L			-	-							A	-	-		-	-		-		C					1		1	
M		-	-	-							A	-	-		-	-		-				1					1	
N			-	-							A	-	-		-	-		-							1		1	
O			-	-							A	-	-		C	-	-	-				1					1	
P			-	T							A	T	-		-	-		-							1		1	
N																										50		

Foram calculados os índices de diversidade haplotípica (H) e da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), para as cinco colônias e para o conjunto de amostras do Pantanal (tabela 3). Os menores índices da variabilidade genética foram detectados para a colônia do Taim ( $H = 0,182$ ,  $\pi = 0,0004$ ). O maior valor de diversidade haplotípica foi encontrado na colônia de Baía de Gaíva ( $H = 0,824$ ), e a diversidade nucleotídica mais alta foi encontrada nas colônias de Porto da Fazenda e Baía de Gaíva ( $\pi = 0,005$ ).

### **5.3 Diferenciação genética entre as populações das colônias reprodutivas de *P. ajaja***

#### **5.3.1 AMOVA**

Três agrupamentos foram considerados nesse teste: A) Pantanal Norte x Pantanal Sul x Rio Grande do Sul, B) Pantanal x Rio Grande do Sul e C) Pantanal Norte x Pantanal Sul. Em nenhum desses tratamentos foram obtidos valores significativos de  $\Phi_{st}$ , demonstrando não haver diferenciação genética significativa entre as sub-unidades populacionais amostradas.

#### **5.3.2 Fst**

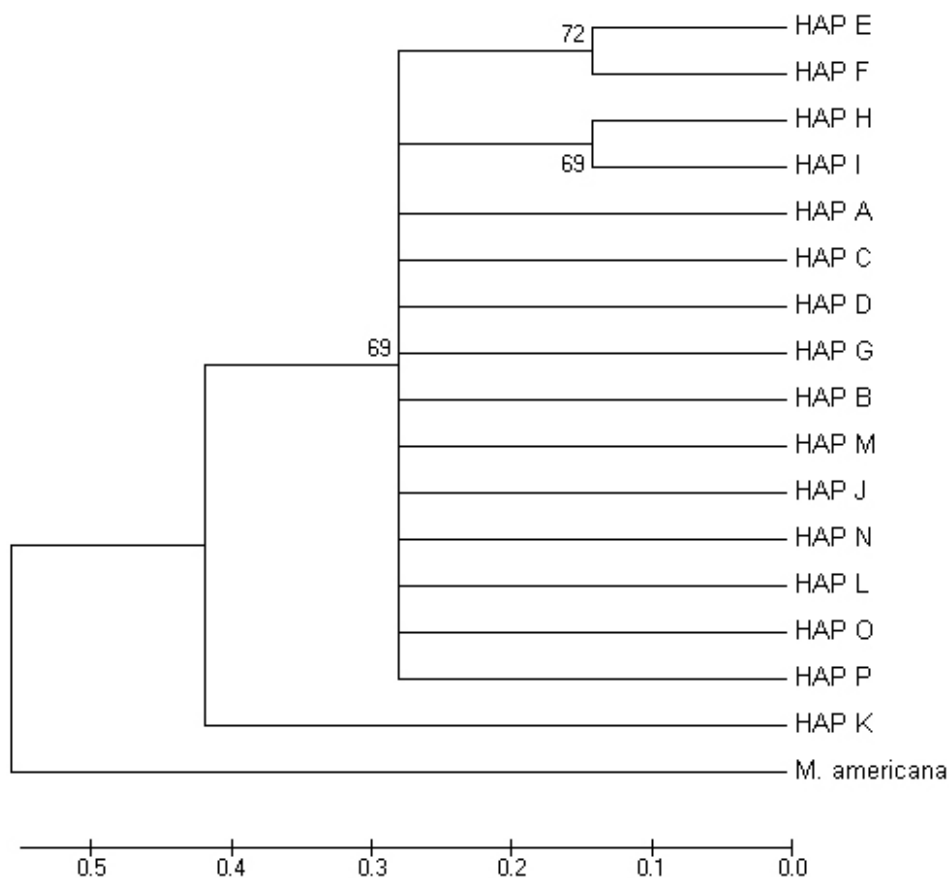
Os cálculos de Fst foram realizados utilizando-se os mesmos critérios de agrupamentos testados na AMOVA. Os valores de Fst para todos os agrupamentos mostraram-se



não significativos, indicando não haver diferenciação genética entre as sub-unidades populacionais.

#### **5.4. Análise de máxima parcimônia**

Na figura 9 é apresentada a árvore traçada a partir das seqüências do fragmento da região controladora de *P. ajaja*, pelo método de máxima parcimônia. A disposição geral dos haplótipos nessa árvore confirma a não diferenciação genética entre as colônias de colhereiro amostradas. A figura indica ainda a formação de um grupo onde estão incluídos todos os haplótipos de colhereiro, com exceção do haplótipo K e do grupo externo, representado pela seqüência-consenso de *M. americana*. O suporte estatístico para esse agrupamento foi considerado alto (69%). Segundo essa árvore, o haplótipo K seria o mais basal dentre todos os haplótipos. Dois agrupamentos internos com valores de bootstrap altos foram observados, unindo respectivamente os haplótipos E e F (bootstrap = 72%) e os haplótipos H e I (bootstrap = 69%).



**Figura 9.** Árvore de haplótipos construída pelo método de máxima parcimônia considerando as deleções. O suporte estatístico dos nós é dado pelo valor de bootstrap utilizando 1000 replicações. A espécie *M. americana* foi utilizada como grupo externo.

## 5.5 Histórico Populacional e inferências Demográficas

### 5.5.1 Análise de clados aninhados

Utilizando-se o programa TCS foi construída uma rede de haplótipos representada na figura 10. O aninhamento dos haplótipos foi realizado nessa rede segundo os princípios propostos por Templeton (1987). Essa rede apresentou os dois haplótipos mais frequentes (A =

0,42 e  $J = 26$ ) em posições centrais numa rede em formato de estrela. Os haplótipos mais freqüentes ( $A = 0,42$  e  $J = 0,26$ ) ocupando posições centrais e os haplótipos menos freqüentes ou privados ocupam posições terminais. Entre as terminações e os haplótipos centrais, foram localizados os haplótipos com freqüências intermediárias ( $E = 0,04$  e  $H = 0,04$ ) ou passos mutacionais, representativos de haplótipos não amostrados.

A partir do aninhamento dos haplótipos foi definido o arquivo de entrada para a análise no programa Geodis. Esse programa levou em conta as coordenadas geográficas e a distribuição aninhada dos haplótipos para verificar se há correlação entre a distância geográfica e a mutacional (Figura 10). O teste estatístico do programa, entretanto, não determinou nenhuma associação significativa, não permitindo utilização da chave de Templeton (2004) para interpretar filogeograficamente a distribuição dos haplótipos encontrados. A probabilidade da ancestralidade dos haplótipos está representada na tabela 2.

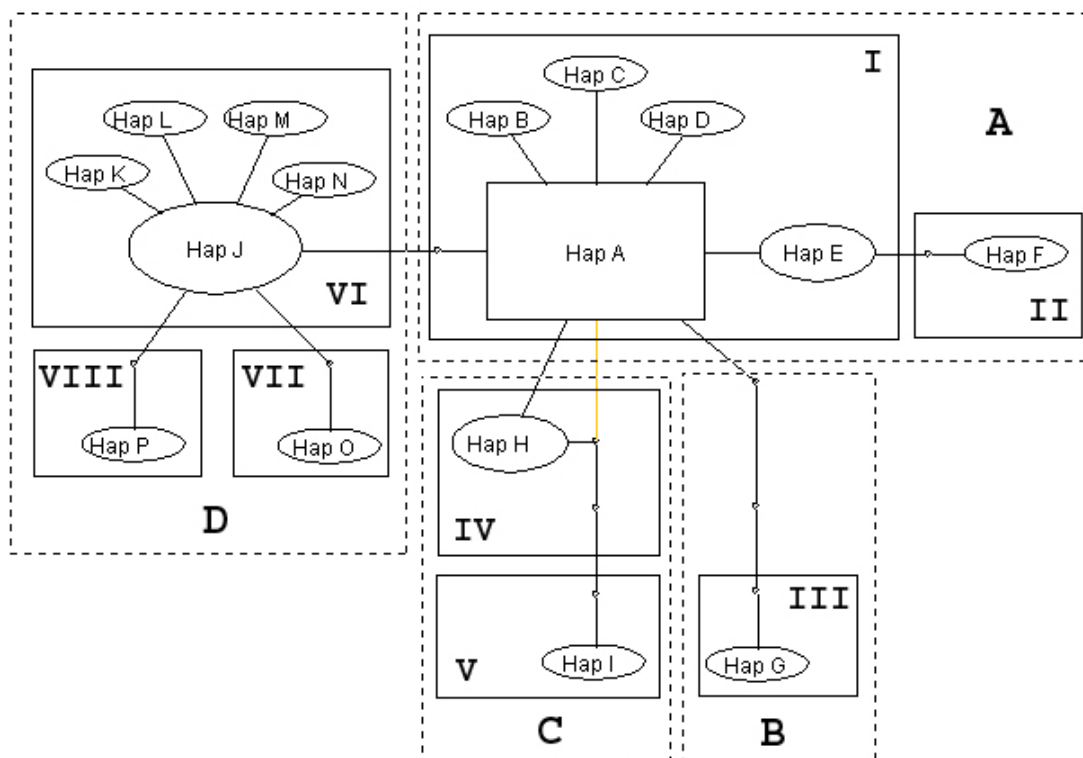


Figura 10. A rede de parcimônia estatística do TCS e análise aninhada dos haplótipos da região controladora do DNAmIt estudada. O retângulo representa o haplótipo mais freqüente (A). As elipses possuem tamanhos diferentes e representam proporcionalmente a freqüência dos haplótipos. A linha em laranja representa uma ligação alternativa.

Tabela 2. Probabilidade de ancestralidade gerada pelo programa TCS.

Haplótipo	Número de indivíduos	Localidade (s)	Probabilidade da ancestralidade
Haplótipo A	21	PF, FR, FI, BG e TA	29 %
Haplótipo B	1	BG	1 %
Haplótipo C	1	BG	1 %
Haplótipo D	1	FR	1 %
Haplótipo E	2	FR e BG	24 %
Haplótipo F	1	FR	1 %
Haplótipo G	1	PF	1 %
Haplótipo H	2	FR e FI	24 %
Haplótipo I	1	BG	1 %
Haplótipo J	13	PF, FR, FI, BG e TA	18 %
Haplótipo K	1	PF	1 %
Haplótipo L	1	TA	1 %
Haplótipo M	1	FR	1 %
Haplótipo N	1	BG	1 %
Haplótipo O	1	FR	1 %
Haplótipo P	1	BG	1 %

### 5.5.2 Testes de neutralidade e estimativas de parâmetros demográficos

Foram definidos dois agrupamentos nos testes de neutralidade: o primeiro reuniu todas as colônias amostradas num mesmo grupo denominado “Pantanal e Rio Grande do Sul” (PF, FR, FI, BG e TA) e o segundo agrupamento denominado “Pantanal”, reuniu as colônias amostradas na região do Pantanal (PF, FR, FI e BG). Foram obtidos para os dois agrupamentos valores negativos e significativos para os testes do D de Tajima e  $F_s$  de Fu.

O histograma das diferenças pareadas pelos sítios mutacionais apresentou distribuição unimodal (Figura 11). Os testes aplicados nesse histograma, entretanto, demonstraram que os gráficos de crescimento populacional gerados pelo programa DnaSP são diferentes dos esperados pelo modelo de população em equilíbrio. Os resultados obtidos através dos testes de neutralidade estão resumidos na tabela 4. O tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) estimado com os dados genéticos foi de aproximadamente 14556 fêmeas. Os valores de  $\tau$ ,  $\theta_0$  e  $\theta_1$  estão representados na tabela 5. O valor absoluto do tempo desde a expansão foi estimado em torno de 30242 anos atrás (valor referente aos dados do Pantanal e Taim), na tabela 6 estão apresentados apenas os valores referentes ao Pantanal.  $N_0$  e  $N_1$  indicam o número de fêmeas estimadas, como fundadoras e atuais, respectivamente.

Tabela 3. Tamanho amostral, número de haplótipos, número de haplótipos privados, diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica, D de Tajima e Fs de Fu obtidos para dados de seqüências da região controladora do DNAm em *P. ajaja*.

Local de coleta	Indivíduos amostrados (n)	Haplótipos encontrados	Haplótipos privados	Diversidad e haplotípica (H)	Diversidad e nucleotídica ( $\pi$ )	D de Tajima	Fs de Fu
Porto da Fazenda	6	4	2	0.800 +/- 0.172	0.005 +/- 0.004	-0.933	-4.260*
Fazenda Retirinho	15	8	4	0.791 +/- 0.105	0.004 +/- 0.003	-1.409	-9.897*
Fazenda Ipiranga	4	3	0	0.500 +/- 0.265	0.001 +/- 0.001	-0.612	0.172
Baía de Gaíva	14	8	5	0.824 +/-0.098	0.005 +/- 0.003	-1.683*	-8.879*
<b>Total**</b>	39	15	12	0.7530 +/- 0.071	0.004 +/- 0.003	-1,942*	-23,271*
<b>Taim</b>	11	3	1	0.182 +/-0.144	0.0004 +/- 0.0006	0.000	3,402x10 <sup>38</sup>

\* Representa valores significativos

\*\* Valores relativos ao total da amostra do Pantanal excluindo-se a colônia Taim, da região do Rio Grande do Sul.

Tabela 4. Valores dos testes de neutralidade obtidos utilizando os agrupamentos “Pantanal e Rio Grande do Sul” e “Pantanal”.

Teste	Pantanal e Rio Grande do Sul	Valores de P ( $\alpha=0,05$ )	Pantanal	Valores de P ( $\alpha=0,05$ )
<b>D de Tajima</b>	-1,981	0,012	-1,942	0,015
<b>Fs de Fu</b>	-29,469	0,000	-23,271	0,000
<b>R2 de Rozas</b>	0,049	0,015	0,055	0,011
<b>Soma dos quadrados das distâncias</b>	0,009	0,518	0,002	0,920

Tabela 5. Parâmetros de expansão populacional segundo o modelo de diferenças pareadas (t expresso em anos,  $N_0$  e  $N_1$  em fêmeas), dados referentes às colônias do Pantanal e Taim.

Parâmetros estimados da expansão	Intervalo de confiança $\alpha=0,05$			
		Menor valor	Maior valor	Média
$\tau = 2,672$	T	0,076	7,332	2.579
$\theta_0 = 0,002$	$\Theta_0$	0,000	2,002	0.075
$\theta_1 = 4,675$	$\Theta_1$	0,549	6644,675	768,006
<b>t = 30242 anos</b>	<b>T</b>	<b>858</b>	<b>82884</b>	<b>29145</b>
<b><math>N_0 = 7</math> Fêmeas</b>	$N_0$	0	15084	283
<b><math>N_1 = 17611</math> Fêmeas</b>	$N_1$	2068	25031097	2893148

Tabela 6. Parâmetros de expansão populacional segundo o modelo de diferenças pareadas (t expresso em anos,  $N_0$  e  $N_1$  em fêmeas), dados referentes às colônias do Pantanal.

Parâmetros estimados da expansão	Intervalo de confiança $\alpha=0,05$			
		Menor valor	Maior valor	Média
$\tau = 2,924$	$\tau$	0.020	7.733	2.828
$\theta_0 = 0,003$	$\theta_0$	0.000	1.793	0.060
$\theta_1 = 3,619$	$\theta_1$	0.323	5918.619	535.511
<b>t = 33044 anos</b>	<b>T</b>	<b>226</b>	<b>87392</b>	<b>31959</b>
<b><math>N_0 = 11</math> Fêmeas</b>	$N_0$	0.000	6754	226
<b><math>N_1 = 13633</math> Fêmeas</b>	$N_1$	1216	22295978	2017318

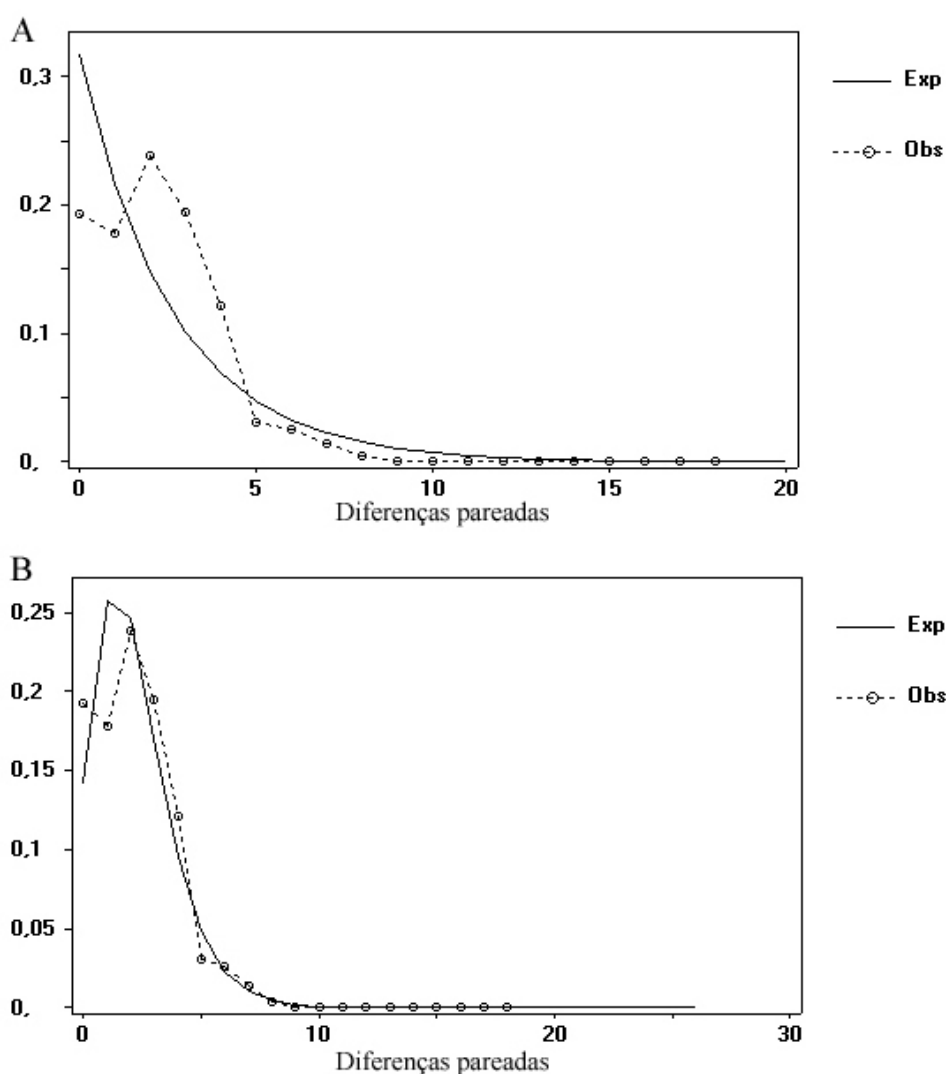


Figura 11. Histograma das freqüências relativas das diferenças pareadas (Mismatch distribution) referentes aos dados de seqüências obtidas para indivíduos coletados no Pantanal. Em ambos os gráficos, a linha descontínua representa os valores observados e a linha contínua representa a curva esperada quando a população apresenta tamanho constante (A) ou expansão populacional (B).

# Discussão



## 6. Discussão

### 6.1 Amplificação e sequenciamento

A utilização de oligonucleotídeos iniciadores heterólogos para amplificação de fragmentos em espécies para as quais não foram originalmente desenhados é de grande valia, pois nem sempre estão disponíveis nos bancos de dados, seqüências relativas à espécie alvo dos estudos. A utilização desta estratégia, entretanto, pode acarretar na não-amplificação do fragmento esperado, na sua amplificação com baixo rendimento ou ainda na amplificação de fragmentos inespecíficos, o que dificulta o trabalho e, em algumas vezes, inviabiliza as análises genéticas populacionais. O uso de oligonucleotídeos espécie-específico otimiza as amplificações e o desenho do iniciador LPA-01 nesse trabalho foi um passo importante. Esse oligonucleotídeo foi utilizado em conjunto com o HCSB-1, desenhado para a região conservada CSB-1 da região controladora de *M. americana* (Lopes, 2002) e resultou na amplificação de um fragmento de 483pb, do primeiro domínio da região controladora de *P. ajaja*. O primeiro domínio da região controladora na sua porção 5' adjacente à porção tRNA<sup>Phe</sup> contém a região conservada CSB-1 e também a origem de replicação da fita pesada (O<sub>H</sub>) (Walberg e Clayton, 1981; Clayton, 1982, 1984). Essa região é considerada muito variável, apresentando uma grande quantidade de bases Adenina (Brown *et al.*, 1986; Sacone, Attimonelli, e Sbisà, 1987). Um protocolo com uma temperatura alta de hibridização (60° C) garantiu a especificidade e um rendimento adequado do produto de PCR.

Uma das limitações dos estudos do DNA mitocondrial é a ocorrência de NUMTs (cópias de DNAmít inseridas no DNA nuclear). Esses segmentos de DNA nuclear com grande homologia com o DNA mitocondrial foram descritos pela primeira vez em 1983, por Farrelly e

Butow (1983) e sua ocorrência pode ser evidenciada quando: 1) a reação de amplificação do DNAmít resulta em bandas duplas ou muitas bandas espúrias, 2) as reações de sequenciamento apresentam baixa qualidade e são ambíguas e 3) na análise de homologia, a região estudada apresenta homologia com genes nucleares ou com genes de outros grupos taxonômicos (Zhang e Hewitt, 1996).

Os produtos de PCR obtidos com o conjunto HCSB-1 + L16525 apresentaram bandas espúrias e foram descartados dessa análise. As reações de PCR desenvolvidas com os demais conjuntos (HCSB-1 + WS-L36 e HCSB-1 + LPA-01) apresentaram uma banda simples e a qualidade das reações de sequenciamento foi boa. Na análise comparativa entre a seqüência consenso e as seqüências depositadas no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo programa BLAST (McGinnis e Madden, 2004), foi encontrada homologia apenas com DNAmít de espécies de aves. Quinn (1997) afirma que o sangue das aves é rico em DNA nuclear o que poderia gerar amplificações de seqüências provenientes de NUMTs. A utilização de mais de um tipo de tecido (fígado, penas e músculo) nas análises e a coerência entre os resultados obtidos com o DNA extraídos de diferentes tecidos pode confirmar que a região estudada pertence ao DNAmít. A porcentagem das bases nitrogenadas está coerente com o esperado para o primeiro domínio da região controladora (rica na base adenina). Todos os testes utilizando DNA extraído de sangue e penas em crescimento demonstraram não haver evidências que discordem do pressuposto de que a região estudada pertence à região controladora.

Dos 483 pb utilizados nas análises, foram obtidos 16 haplótipos, sendo que 12 são representantes de uma única colônia (haplótipos privados), dois foram encontrados em duas colônias e dois foram encontrados em todas as colônias, mas com freqüências diferentes (Haplótipos A e J, respectivamente 0,42 e 0,26). Os resultados encontrados para uma espécie próxima (*M. americana*) apresentaram resultados semelhantes, onde seqüências de 390/460 pb

resultaram em 19 haplótipos, sendo 15 haplótipos privados, três compartilhados por duas ou três colônias e um haplótipo, compartilhado por 38 indivíduos entre todas as colônias (Lopes *et al.*, 2006).

Existem poucas referências à região controladora no GENE BANK ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) relativos às espécies filogeneticamente mais próximas à *P. ajaja*, os valores encontrados pelo programa BLAST (McGinnis e Madden, 2004) foram de 56-32% de similaridade. A espécie que apresentou maior similaridade (56%) com os colhereiros foi *Pygoscelis adeliae*, da ordem Esfenisciformes (pingüins) e a de menor similaridade (32%) *Larus glaucescens*, da ordem Charadriiformes (quero-quero, mexeriqueira, grazinas e gaivotas). Esses graus de similaridade estão concordantes com a relação taxonômica dos Esfenisciformes, mais próximos filogeneticamente dos Threskiornithidae do que os Charadriiformes, como mostrado na figura 12 (Cracraft, 1981). O não alinhamento com nenhum outro táxon é esperado para uma região do DNAmít porém apenas pelo isolamento de mitocôndrias se obterá uma prova definitiva da origem mitocondrial desse fragmento.

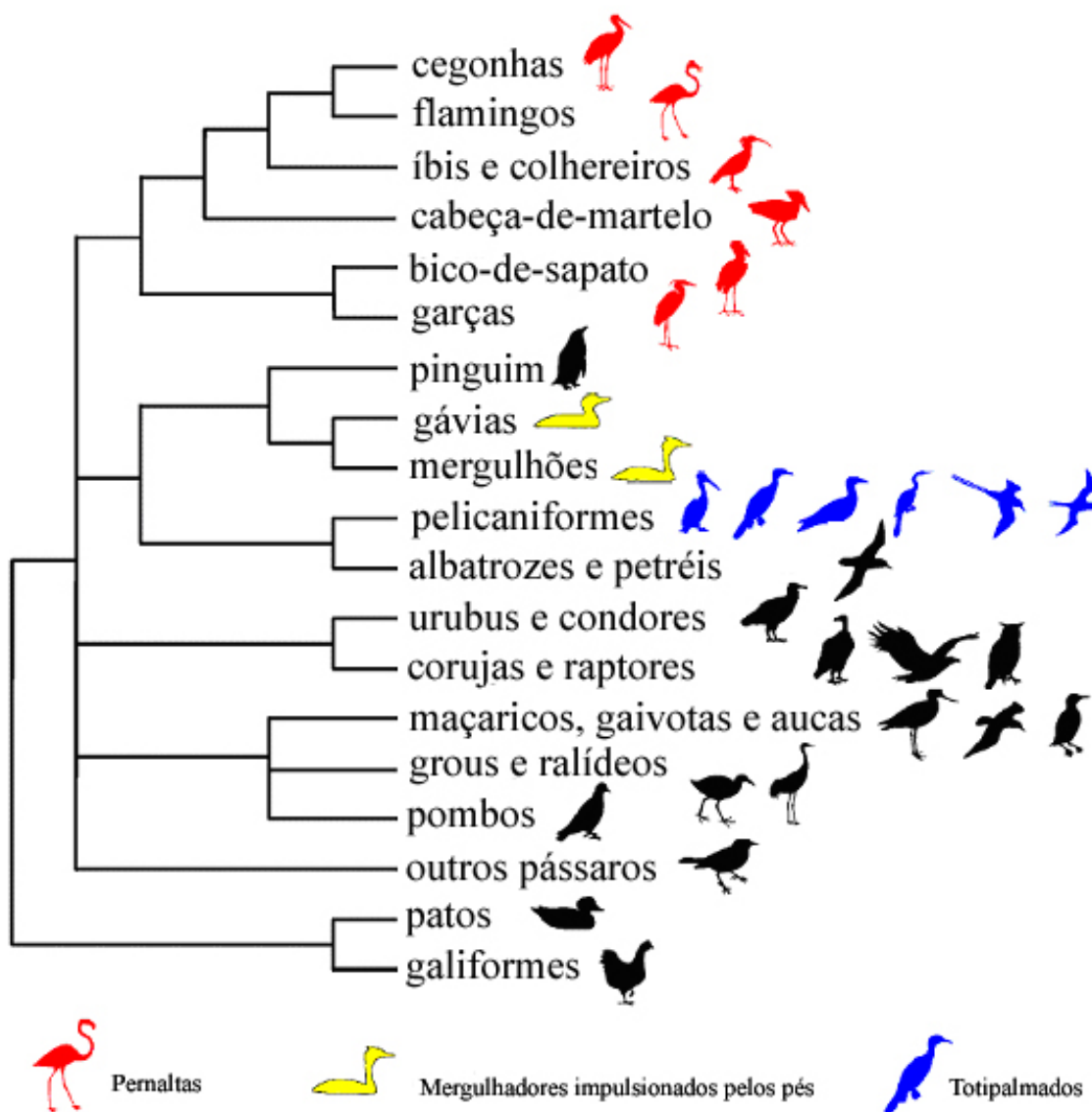


Figura 12. Relação filogenética tradicional entre aves aquáticas, baseadas em estudos morfológicos (Cracraft, 1981). Mais recentemente, as garças foram recolocadas mais próximas dos maçaricos e os grouse, pombos e os urubus do novo mundo foram reposicionados mais próximos das cegonhas (Cracraft, 1988). Os Pelecaniformes incluem os pelicanos, fragatas, mergulhões e cormorões. Modificado de Van Tuinen, 2001.

## 6.2 Variabilidade genética

Os níveis de diversidade genética de *P. ajaja* foram comparados com os de outras espécies de aves baseando-se nos índices de diversidade haplotípica e de diversidade nucleotídica. Essas espécies foram escolhidas por serem relatadas nos testes de similaridade resultantes do programa BLAST. A diversidade haplotípica é um índice que reflete a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso em uma população serem diferentes, enquanto que a diversidade nucleotídica reflete a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes em uma população (Nei e Li, 1979). Esses autores aconselham o uso da diversidade nucleotídica nas análises comparativas, quando se trabalha com DNAmít, pois a diversidade haplotípica é influenciada pelo tamanho amostral e em análises envolvendo muitos genes a diversidade haplotípica pode assumir valores próximos a 1,0. Na tabela 7 estão representados os valores de diversidade nucleotídica de algumas espécies de aves pertencentes a táxons próximos ao de *P. ajaja*.

**Tabela 7. Índices de diversidade nucleotídica, baseados nos dados da região controladora do DNA mitocondrial, em seis espécies pertencentes a três ordens de aves aquáticas.**

<b>Espécie</b>	<b>Ordem/Família</b>	<b>Diversidade nucleotídica</b>	<b>Pares de base analisados</b>	<b>Referência</b>
<i>Uria aalge</i>	Charadriiformes/ Alcidae	0,005	266 pb	Moun <i>et al.</i> , 2001
<i>Larus fuscus</i>	Charadriiformes/Laridae	0,003	430 pb	Liebes <i>et al.</i> , 2002
<i>Pygoscelis adeliae</i>	Sphenisciformes/ Spheniscidae	0,043	352 pb	Ritchie <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycteria americana</i>	Ciconiiformes/Ciconiidae	0.075	390/460 pb	Lopes <i>et al.</i> , 2006
<i>Nipponia nippon</i>	Ciconiiformes/ Threskiornithidae	0.00069	648 pb	Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>Platalea ajaja</i>	Ciconiiformes/ Threskiornithidae	0,004	483 pb	Este trabalho.

Comparando-se os valores entre esses grupos de aves, verifica-se que o valor da diversidade nucleotídica encontrada para *P. ajaja* (0,004) está dentro do intervalo observado no grupo das aves aquáticas (0,0007 – 0,075). O valor mínimo encontrado para a espécie *N. nippon* (Zhang *et al.*, 2004) reflete a redução populacional por que passou essa espécie na natureza, mas pode ser resultante também da amostragem, restrita aos indivíduos em cativeiro. Os valores encontrados para *U. aalge* e *L. fuscus* também podem ser considerados valores baixos, se comparados aos encontrados para *M. americana* e *P. adeliae*. Para *U. aalge* o valor baixo de diversidade nucleotídica parece ser resultante do efeito da predação de ovos por seres humanos e do derramamento de petróleo, distúrbios que diminuíram o número dos indivíduos e promoveram um processo de gargalo populacional (Moun *et al.*, 2001). O valor relatado para *L. fuscus* foi explicado supondo constantes processos de recolonização de áreas, após confinamento em refúgios durante períodos adversos nas regiões norte-polares (Hewitt, 1996; Ibrahim *et al.*, 1996). As espécies *M. americana* e *P. adeliae* apresentaram valores de 10–18 vezes maiores do que as demais espécies. A diversidade nucleotídica de *P. ajaja* apresentou um valor muito próximo ao encontrado nas espécies de Charadriiformes, um grupo filogeneticamente mais distante, do que com as espécies mais próximas *M. americana* e *P. adeliae* e que passaram por processos de redução populacional. Não há registro de distúrbios graves nas regiões do Pantanal onde a espécie *P. ajaja* se reproduz. Apesar da ausência de dados demográficos relativos a essas populações a estabilidade e regularidade no estabelecimento das colônias não evidenciam processos recentes de gargalo populacional. Esse baixo nível de variabilidade pode ser, portanto, característico da espécie ou pode refletir um processo histórico de gargalo populacional. Esses resultados estão concordantes com os obtidos para 20 sistemas aloenzimáticos e uma heterozigotidade média de 0,053, com apenas três sistemas polimórficos e com os resultados de testes em locos de microssatélites heterólogos que não apresentaram variação (Santos, 2003). Os

resultados do presente trabalho também estão concordantes com Sawyer (2002) que isolou e testou 32 locos de microssatélites específicos para *P. ajaja* e detectou polimorfismo em apenas cinco loci. A avaliação comparativa da diversidade genética entre as colônias do Pantanal (tabela 2) demonstra um índice mais baixo na Fazenda Ipiranga, uma colônia com uma amostragem pequena (quatro indivíduos). Um valor ainda mais baixo foi detectado na colônia de Taim. Os dados de diversidade genética obtidos revelam que a variabilidade é maior no Pantanal do que na região do Taim. Entretanto a amostragem no Rio Grande do Sul foi baixa e restrita a apenas uma colônia. A ampliação da amostragem deve ser realizada para que se possa confirmar essa diferença na diversidade das duas regiões.

No último censo da Wetlands International (2002) foi estimada uma população neotropical com cerca de 100000 a 250000 indivíduos dessa espécie (Delany e Scott, 2002). Segundo as estimativas de Ne calculadas nesse estudo, a população de adultos do Pantanal e Rio Grande do Sul corresponderia a 29112 indivíduos, cerca de 10-30% do total de indivíduos neotropicais. Kushlan *et al.* (2002) estimaram 20500 adultos reproduzindo na América do Norte (30750 indivíduos). Esses dados demográficos são uma aproximação do número real de indivíduos, onde o número estimado é multiplicado por um fator de correção. Os dados de demografia foram obtidos no final do período reprodutivo, onde se estima que as populações da espécie estejam mais estáveis (Delany e Scott, 2002).

### 6.3 Diferenciação genética e história demográfica das populações de *P. ajaja* no Brasil

Os valores obtidos na AMOVA e de  $F_{st}$  não se mostraram significativos para nenhum dos agrupamentos entre as colônias reprodutivas nem para o grupo todo. Essa homogeneidade genética pode ser resultante de dois processos: 1) indivíduos das colônias estariam trocando genes entre si, gerando um fluxo gênico o qual estaria homogeneizando geneticamente as regiões (dentro do Pantanal e entre Pantanal e Rio Grande do Sul) e 2) o fluxo atual não é tão intenso, mas houve um passado histórico comum, reunindo indivíduos das colônias amostradas numa única população num passado recente, numa região onde as alterações climáticas não foram tão severas. Essa segunda hipótese pressupõe não ter decorrido tempo suficiente para que a diferenciação genética pudesse ser visualizada.

Pelos padrões de dispersão dos tresquiornítídeos em geral (Melvin, 1999) e a filopatria de *P. leucorodia* seria esperado certa diferenciação genética entre colônias posicionadas em regiões distantes como o Pantanal e Rio Grande do Sul. Os resultados obtidos revelam que essas duas populações são indistinguíveis geneticamente. Essa não diferenciação pode ser resultante da troca de integrantes, porém eventos de expansão populacional também explicam a ausência de estruturação genética observada entre as colônias amostradas. As análises realizadas nesse estudo evidenciam uma expansão demográfica na região do Pantanal. A rede de haplótipos apresentou configuração em formato de estrela, esperada para populações que passaram por um processo de expansão recente (Avise, 2001). Adicionalmente, o processo de expansão demográfica de *P. ajaja* no Pantanal foi inferido pelos valores significativamente negativos do  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu e o padrão unimodal dos gráficos de “mismatch distribution” (Tabela 7 e



figura 11). Resultados semelhantes foram obtidos nas análises da região controladora de *M. americana* amostrada em colônias reprodutivas na região do Pantanal (Lopes *et al.*, 2006).

Ramos e Rozas (2002) testaram o poder dos testes (D de Tajima, Fs de Fu e  $R_2$  de autoria dos próprios autores, agrupados numa classe estatística, chamada classe I e a “mismatch distribution”, agrupada em uma outra classe, denominada classe estatística III), para verificação a influencia do tamanho amostral e concluíram que o teste do D de Tajima (Tajima, 1989a) apresenta o menor poder e a menor sensibilidade na detecção de processos de expansão populacional. Na classe dos testes estatísticos que inclui o Fs de Fu (Fu, 1997), o  $R_2$  (Ramos e Rozas, 2002) e o D de Tajima (classe estatística I), o Fs de Fu apresentou maior sensibilidade na detecção de processos históricos de expansão populacional. A “mismatch distribution” por sua vez, foi considerado nesse estudo um teste pouco sensível para a detecção de processos históricos de expansão, dentro da categoria estatística III (Ramos e Rozas, 2002). Esses graus diferentes de sensibilidade dos testes podem ser atestados na tabela 2 onde populações que não apresentaram valores significativos para os testes, tiveram sua expansão detectada pelo Fs de Fu (Porto da Fazenda e Fazenda Retirinho). Uma outra explicação para esses valores significativos seria atribuir esses desvios ao efeito da seleção, porém o fato da região não ser uma região não codificadora diminui consideravelmente essa possibilidade.

Na região do Pantanal, ao se analisar separadamente cada colônia reprodutiva, pode-se observar que somente a colônia de Baía de Gaíva apresenta resultado significativo do teste do D de Tajima. Considerado por Ramos e Rozas (2002) um teste pouco sensível, o D de Tajima já indica sinais de expansão nesta colônia. Este resultado foi confirmado pelo teste do Fs de Fu considerado um teste com maior sensibilidade (Ramos e Rozas, 2002) e pode ser explicado pelo maior tamanho amostral.

Valores do tempo desde a expansão populacional, semelhante aos determinados neste trabalho, foram encontrados em populações do cervídeo *Blastocerus dichotomus*, o cervo-do-pantanal da região de Porto Primavera (Estado de São Paulo), Pantanal (Mato Grosso do Sul), Bolívia, Esteros de Iberá e Delta do Rio Paraná (28020 anos atrás) (Herney, 2002). É interessante considerar que há sobreposição das duas áreas estudadas e que essa espécie é também dependente de regiões alagadas para sua sobrevivência). Padrões filogeográficos concordantes em análises de seqüências para múltiplas espécies foram obtidos num estudo clássico no sudeste dos Estados Unidos (Avice, 2000). Essa concordância nos resultados para as duas espécies de táxons tão distantes, mas co-distribuídas na região do Pantanal pode estar refletindo os efeitos por que passaram essas populações quando seu habitat foi modificado pelas mudanças climáticas. Valores do tempo desde a expansão, calculados para a espécie *M. americana* demonstram que esse período foi de aproximadamente 18900 anos atrás, entretanto esse valor foi obtido através de uma análise diferente da utilizada neste trabalho (Lopes *et al.*, 2006).

O tempo desde a expansão da população de *P. ajaja* (30242 anos atrás) coincide com o final do Pleistoceno, um período que se estende de dois milhões de anos atrás até 12000 anos atrás. Este tempo de expansão estimado corresponde mais precisamente a um período conhecido como interestadial, no qual ocorreu um melhoramento nas condições climáticas do último período glacial. A extensão desse período variou de uma região para outra na América do Sul entre 60000 a 27000 anos atrás (Clapperton, 1993a; Iriondo, 1999). Mudanças climáticas como a temperatura e também o nível dos corpos d'água, podem ter influenciado a distribuição e a reprodução da espécie nessas duas regiões desde o pico da última glaciação. A hipótese que explicaria a expansão é de que as populações de *P. ajaja* se deslocaram do Pantanal durante os períodos de glaciação e retornariam a colonizar essa região após o final da última glaciação.

## 6.5 Implicações para a conservação

Ecossistemas de áreas alagadas estão entre os mais biodiversos e as aves aquáticas são importantes indicadores da riqueza desse tipo de habitat (Wetlands International, 2002). As regiões estudadas representam grandes refúgios para a reprodução de diversas espécies de aves. Infelizmente, em uma recente projeção do declínio global de aves, Sekercioglu *et al.* (2004) indicaram que espécies dependentes de áreas alagadas estão entre os grupos mais prováveis de experimentar extinção no próximo século. O colhereiro é uma espécie carismática e de grande interesse de observadores de aves e turistas. Devido a essa característica, essa espécie poderá ser utilizada com sucesso como espécie-bandeira servindo em campanhas de conservação de áreas alagadas e assim beneficiando tanto outras espécies como o ecossistema como um todo.

A conservação de populações de aves aquáticas migratórias implica na preservação de áreas importantes durante os períodos de invernada e reprodução. Definir tais áreas não é uma tarefa fácil, pois não existem dados demográficos relativos às populações brasileiras que possam subsidiar decisões de quais áreas seriam prioritariamente conservadas. Segundo Moritz (1994) essas áreas podem ser definidas como unidade de manejo genético (UM em inglês), um conjunto de populações demograficamente independentes e que diferem significativamente nas suas frequências alélicas, nucleares ou mitocondriais. Os marcadores genéticos são importantes ferramentas que auxiliam na identificação dessas unidades.

A aparente ausência de estruturação genética entre as colônias amostradas de colhereiro nas regiões do Pantanal e Rio Grande do Sul deve ser considerada com cautela, uma vez que as populações dessas duas regiões podem apresentar adaptações locais. Os indivíduos

que se reproduzem na região do Banhado do Taim, podem apresentar adaptações ao tipo de alimentos e condições locais, como por exemplo, a presença de água salobra e a fauna de peixes e crustáceos desse tipo de ambiente. A espécie, na região do Pantanal alimenta-se de uma fauna de animais de água doce. Essas diferenças e adaptações locais pode ser um fator de seleção dentro da espécie e deve ser considerado.

A amostragem estudada permitiu esclarecer algumas questões sobre a espécie nessas regiões, mas um aumento no tamanho amostral incluindo colônias de regiões não estudadas e um aprofundamento dos estudos genéticos poderá vir a confirmar os resultados obtidos neste trabalho e subsidiar estratégias para a conservação da espécie.

# **Conclusões**

## 7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A variabilidade genética encontrada para as colônias reprodutivas amostradas foi considerada baixa, comparada às populações de outras espécies de aves aquáticas, mas que esse resultado parece ser uma característica da espécie *Platalea ajaja* ou um reflexo de processos históricos.

2. O presente trabalho demonstra que a espécie não apresenta diferenciação genética entre as colônias reprodutivas amostradas. As causas que promovem tal homogeneidade podem ser o fluxo gênico atual, o fluxo ocorrido numa história recente dessas populações assim como a sobreposição dos dois efeitos.

3. Os resultados revelam um provável processo de expansão populacional na região do Pantanal, no Pleistoceno-recente. Esse processo foi discutido considerando as mudanças climáticas durante o último período glacial na região e os processos de recolonização dessas áreas.

## **Referências Bibliográficas**

## 8. Referências bibliográficas

- AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. In: \_\_\_\_\_. **Paleoclimas**. São Paulo: USP/Instituto de Geografia, 1997.
- ALHO, C. J. R.; LACHER, T. E.; GONÇALVES, H. C. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. **BioScience**, v. 38, n. 3, p. 164-171, 1988.
- ALLEN, R. P. **The flame bird**. New York: Dodd, Mead, 1947.
- ALLEN, R. P. **The Roseate Spoonbill**. New York: Dover Publ. Natl., 1942.
- ANTAS, P. T. Z. Migration and movements among the lower Paraná River valley wetlands, Argentina, and south Brazil/Pantanal wetlands. **Birds Conservation International**, v.4, p. 181-190, 1994.
- ANTAS, P. T. Z.; *et al.* Migração de *Netta peposaca* entre o sul do Brasil e a Argentina. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANILHADORES DE AVES, 6., 1990, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Universidade Católica de Pelotas, 1990.
- ARAYA, B.; CHESTER, S. The birds of Chile. **Santiago: Latour**, 1993.
- ASSINE, M. L.; SOARES, P. C. Quaternary of Pantanal, west-central Brazil. **Quaternary International**. n. 114, p. 23-34, 2004.
- AVISE, J. C. Phylogeography. The history and formation of especies. **Cambridge: Harvard University Press**. 2001.
- AVISE, J. C. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. **Ibis**. n. 138, p. 16-25, 1996.
- BALTZ, M. E. Observations of Roseate Spoonbills and evidence of breeding on North Andros Island, Bahamas. **Fla. Field Nat.** n. 25, p. 98-100, 1997.
- BELTON, W. Aves do Rio Grande do Sul: distribuição e biologia. **São Leopoldo: Ed da Unisinos**. 1994.
- BELTON, W. Birds of Rio Grande do Sul, Brazil. Part I: Rheidae through Furnariidae. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** v. 178, p. 369-636, 1984.
- BJORK, R. D.; POWELL, G. V. N. Relationships between hydrologic conditions and quality and quantity of foraging habitat for Roseate Spoonbills and other wading birds in the C-111 Basin. **South Florida Res. Center, Everglades Natl. Park, Natl. Park Serv., Final Rep.**, Homestead, Florida, 1994.



- BJORK, R.; POWELL, G. V. N. Roseate Spoonbill. In: RODGERS, J. A.; KALE, H. W.; SMITH, H. T. **Rare and endangered biota of Florida**. Univ. Press of Florida, Gainesville. v. 5, p. 295-308, 1996.
- BLAKE, E. R. Manual of neotropical birds. **Chicago: Univ. of Chicago**. 1997.
- BOGGIANI, P. C.; COIMBRA, A. M. Quaternary limestone of Pantanal area, Brazil. **Na. Acad. Bras. Cienc.** n. 67, p. 343-349, 1995.
- BOND, J. Birds of the Est Indies. **5 ed. New York: Houghton Mifflin**. 1993.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res.** v. 27, p. 1767-1780, 1999.
- BRASIL. Ministério do Interior. Departamento Nacional de Obras e Saneamento. **Estudos hidrológicos da Bacia do Alto Paraguai**. Departamento nacional de Obras e Saneamento. Brasil. v. 1.1974.
- BURGER, J. Pattern and mechanism of nesting in mixed-species heronries. SPRUNT I. V., A.; OGDEN, J. C.; WINCKLER, S. **Wading birds**. Natl. Audubon Soc., New York. v. 7, p. 45-58, 1978.
- BUROKER, N. E. *et al.* Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: An Illegitimates elongation model. **Genetics.** n. 124, p. 157-163, 1990.
- BYERS, O. Stork, Ibis and Spoonbill conservation assessment and management plan: working document. **Minnesota: Apple Valley**. 1998.
- CABANNE, G. S. **Estudo da diferenciação genética populacional do arapaçu rajado – *Xiphorhynchus fuscus fuscus* – no sudeste da Floresta Atlântica pela análise de seqüências da região controladora do DNA mitocondrial**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- CLAPPERTON, C. M. Nature of environmental changes in south America at Last Glacial Maximum. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.** n. 101, p. 189-208, 1993a.
- CLAPPERTON, C. Quaternary geology and geomorphology of South America. **Elsevier Science Publishers**. 1993.
- CLAYTON, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell.** n. 28, p. 693-705, 1982.
- CLAYTON, D. A. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Annu. Rev. Biochem.** n. 53, p. 573-594, 1984.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology.** v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.
- 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.

- COTTAM, C.; KNAPPEN, P. Food of some uncommon birds. **Auk**. n. 56, p. 138-169, 1939.
- CRACRAFT, J. The major clades of birds. In: BENTON, M. J. **The phylogeny and classification of the tetrapods**. Oxford, UK: Clarendon Press, 1988, p. 339-361.
- CRACRAFT, J. Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (class Aves). **Auk**. n. 98, p. 681-714, 1981.
- DE LE COURT, C.; AGUILERA, E. Dispersal and migration in Eurasian Spoonbills *Platalea leucorodia*. **Ardea**. n.85, p. 193-202, 1997.
- DELANY, S.; SCOTT, D. Waterbird population estimates. **3. Ed. Wetlands International**. 2002. Nota: **Global Series**, n. 12.
- DESJARDINS, P.; MORAES, R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. **J. Mol. Biol.** n. 212, p. 599-634, 1990.
- DODA, J. N.; WRIGHT, C. T.; CLAYTON, D. A. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested nearspecific template sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. n. 78, p. 6116-6120, 1981.
- DUBS, B. Birds of southwestern Brazil. **Switzerland: Betrona-Verlag**. 1992.
- DUMAS, J. V. Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*). In: POOLE, A.; GILL, F. **The Birds of North America, Philadelphia**: Philadelphia Inc. n. 490, 2000. Nota: disponível em <<http://bna.birds.cornell.edu/BNA/Login.do>> acesso em: junho de 2005.
- ESMILE, S. D. An early Irvingtonian avifauna from Leisey Shell pit, Florida. **Bull. Fla. Mus. Nat. Hist.** n. 37, p. 299-344, 1995.
- EXCOFIER, 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.
- FARRELLY, F.; BUTOW, R. A. Rearranged mitochondrial genes in the yeast nuclear genome. **Nature London**. n. 301, p. 296-301, 1983.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) *version 3.6a2.1*. Distributed by the author. **Seattle: Department of Genetics, University of Washington**. 2001.
- FERRAZ-VICENTINI, K. R.; SLAGADO-LABOURIAU, M. L. Palynological analysis of a palm swam in central Brazil. **Journal of South American Earth Science**. n. 9, p. 207-219, 1996.
- FLEDR, M. Climatic changes in the South American plains: records of a continental-scale oscillation. **Quaternary International**. n. 57/58, p. 93-112, 1999.
- FREDERICK, P. C.; OGDEN, J. C. Philopatry and nomadism: contrasting long-term movement behavior and population dynamics of White Ibises and Wood Storks. **Colonial Waterbirds**. n. 20, index 2, p. 316-323, 1997.

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 (*Jabiru mycteria*). **J. Field Ornithol.** n. 68, p. 287-295, 1997.

FRIEDMANN, H.; SMITH, F. D. J. A contribution to the ornithology of northeastern Venezuela. **Proc. U.S. Natl. Hist.** n. 100, p. 411-538, 1950.

FRIESEN, V. L. Population genetics and the spatial scale of conservation of colonial waterbirds. **Colonial Waterbirds.** v. 20, n. 2, 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.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.** n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMILTON, S. K.; SIPPEL, S. J.; MELACK, Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. **Arch. Hydrobiol.** n. 137, p. 1-23, 1996.

HANCOCK, J. A.; KUSHLANN, J. A. e KAHL, M. P. Storks, ibises and spoonbills of the world. **San Diego: Academic Press.** 1992.

HAVERSCHMIDT, F.; MESS, G. F. **Birds of Suriname.** Suriname: Vaco Press, Paramaribo. 1994.

HAYERS, F. E. Status, distribution and biogeography of the birds of Paraguay. In: ABLE, K. P. **Monographs in field ornithology.** Colorado: American Birding Assoc. 1995. v. 1.

HERNEY, C. A. M. **Filogeografia e história demográfica pleistocénica del ciervo de los pântanos *Blastocerus dichotomus* Gray, 1850.** 2002. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia e Zoologia) – Programa de Desenvolvimento de Ciências Básicas, Faculdade de Ciências, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2002.

HEWITT, G. M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. **Biol. J. Linn. Soc.** n. 58, p. 247-276, 1996.

HEWITT, G. M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature.** n. 405, p. 907-913, 2000.

HILLIS, M. H. *et al.* Nucleic Acid IV: sequencing and cloning. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B., K. **Molecular Systematics.** Sinauer: Sunderland. 1996.

HILTY, S. L.; BROWN, W. B. A guide to the birds of Colombia. **New Jersey: Princeton Univ. Press.** 1986.

HOULDEN, B. A.; ENGLAND, P.; SHERWIN, W. B. Paternity exclusion in koalas using hypervariable microsatellites. **J. Heredity.** n. 87, p. 149-152, 1996.

HOWELL, A. H. Bird life of Florida. **New York: Coward-McCann.** 1932.

- HOWELL, S. N.; WEBB, G. S. A guide to the birds of Mexico and northern Central America. **New York: Oxford Univ. Press.** 1995.
- HUELSENBECH, J. P.; CRANDALL, K. A. Phylogeny estimation and hypothesis reconstructing phylogenetic tree. **Mol. Biol. Evol.** n. 4, p. 406-425, 1987.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (**IBAMA**). Disponível em: <[www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br)> Acesso em: out. 2005.
- IBRAHIM, K. M.; NICHOLS, R. A.; HEWITT, G. M. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. **Heredity.** n. 77, p. 282-291, 1996.
- KÖPPEN, W. Climatologia. **México: Fondo de cultura econômica.** 1948.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics.** n. 5, p. 150-163, 2004.
- KUSHLAN, J. A. *et al.* **The north american waterbird conservation plan.** Washington: Waterbird conservation for the americas. 2002.
- LAND, H. C. Birds of Guatemala. **Pennsylvania: Livingston Publ.** 1970.
- LEWIS, J. C. Habitat suitability index models: Roseate Spoonbill. **Washington: U.S. Dept. Int. Fish Wildl. Serv.** 1983.
- LIEBERS, D.; HELBIG, A. J. Phylogeography and colonization history of Lesser Black-backed Gulls (*Larus fuscus*) as revealed by mtDNA sequences. **J. Evolution. Biol.** n. 15, p. 1021-1031, 2002.
- LOPES, I. F. *et al.* Demographic history of wood stork (*Mycteria americana*) Brazilian Pantanal colonies revealed by mitochondrial DNA **Genetics and Molecular Biology.** n. 29, p. 241-250. 2006.
- LOPES, I. F. **Diferenciação genética entre populações de cabeça-seca (*Mycteria americana*).** 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- LUTHIN, C. S. World working group on stork, ibises and spoonbills, report 2, 1984. **Germany: Int. Council for Bird Preservation, W. W. Brehm Found for Int. Bird Conservation; Vogelpark Walsrode, Walsrode.** 1984.
- LUTHIN, C. S. Status of and conservation priorities for the world's stork species. **Colonial Waterbirds.** v. 10, n. 2, p. 181-202, 1987.
- MARQUES, D. M. *et al.* O sistema hidrológico do Taim. Disponível em: <[http://www.icb.ufmg.br/~peld/port\\_site07.pdf](http://www.icb.ufmg.br/~peld/port_site07.pdf)> Acesso em: out. 2005.
- MCGINNIS, S.; MADDENM, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids.** n. 32, p. 20-25, 2004.

- MELVIN, S. L.; GAWLIK, D. E.; SCHARFF, T. Long-term Movement Patterns for Seven Species of Wading Birds. **Waterbirds**. v. 22, index 3, p. 411-416, 1999.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R.; PHELPS, JR., W. H. A guide to the birds of Venezuela. **New Jersey: Princeton Univ. Press**. 1978.
- MINDELL, D. P.; SORENSON, M. D.; DIMCHEFF, D. E. Multiple independent origin of mitochondrial gene order in birds. **Proc. Natl. Acad. Sci.** n. 95, p. 10693-10697, 1998.
- MONROE, B. L. A distributional survey of the birds of Honduras. **Ornithol. Monogra.** n. 7, 1968.
- MORITZ, C. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. **Molecular Ecology**. n. 3, p. 401-411, 1994.
- MOUM, T.; ARNASON, E. Genetic diversity and population history of two related seabird species based on mitochondrial DNA control region sequences. **Molecular Ecology**. n. 10, 2463-2478, 2001.
- NAHUM, L. A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto, São Paulo: Holos Editora, cap 8. 2001.
- NAROSKY, T.; YZURIETA, D. Birds of Argentina and Uruguay. **Buenos Aires: Vazquez Mazzini Editores**, 1989. Nota: Asociacion ornitológica del Plata.
- NASCIMENTO, J. L. X. *et al.* Movimentação de *Dendrocygna bicolor* entre o Rio Grande do Sul e Argentina. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANILHADORES DE AVES, 6., 1990, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Universidade Católica de Pelotas. 1990.
- NEI, M.; WEN-HSIUNG. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Genetics**. v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **New York: Columbia University Press**. 1987.
- OLROG, C. C. El anilhado de aves en la Argentina 2 do informe 1961-62. **Neotropica**. v. 8, n. 27, 1962.
- OLROG, C. C. El anilhado de aves en la Argentina Septimo informe. **Neotropica**. v. 17, n. 53, 1971.
- ORNAT-LOPEZ, A.; RAMO, C. Colonial waterbird population in the Sian Ka'an Biophere Reserve (Quintana Roo, Mexico). **Wilson Bull**. v. 104, p. 501-515, 1992.
- PÁDUA, M. T. J. Os parques nacionais e reservas biológicas do Brasil: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. **Brasília: Instituto Bras. de Desen. Florestal**. 1983.
- PALACIOS, E.; MELLINK, E. Breeding birds of Esteros Tobarí and San Jose, S. Sonora. **West. Birds**. v. 26, p. 99-103, 1995.
- PALMER, R. S. Handbook of North American birds. **New Haven: Yale Univ. Press**. v. 1, 1962.

- 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.
- POWELL, G. V. N. Habitat use by wading birds in a subtropical estuary: implications of hydrography. **Auk**. v. 104, p. 740-749, 1987.
- POWELL, G. V. N. e BJORK, R. D. Relationships between hydrologic conditions and quality and quantity of foraging habitat for Roseate Spoonbill and other wading birds in the C-111 Basin. **Florida: Second Annual Rep.** 1990.
- PRANCE, G. T. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. **Ann. Mo. Bot. Gard.** n. 69, p. 594-624, 1982.
- QUINN, T. W. Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: MINDEL, D. P. **Avian molecular evolution and systematics**. San Diego: Academic Press. p. 3-28 1997.
- QUINN, T. W. The genetic legacy of Mother Goose – phylogeographic patterns of Lesser Snow Goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. **Molecular Ecology**. n. 1, p. 105-117, 1992.
- RAFFAELE, H. *Et al.* A guide to the birds of the West Indies. **New Jersey: Princeton Univ. Press.** 1998.
- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Mol. Biol. Evol.** v. 19, n. 12, p. 2092–2100. 2002.
- RIDGELY, R. S.; GWYNNE, J. A. A guide to the birds of Panama with Costa Rica, Nicaragua and Honduras. **New Jersey: Princeton Univ. Press.** 1989.
- RITCHIE, P. A. *et al.* A ancient DNA enables timing of the pleistocene origin and holocene expansion of two Adelia Penguin lineages in Antarctica. **Mol. Biol. Evol.** v. 21, n. 2, p. 240-248. 2004.
- ROBERTSON, W. B.; BREEN, L. L.; PATTY, B. W. Movement of marked Roseate Spoonbill in Florida with a review of present distribution. **J. Field Ornithol.** v. 54, p. 225-236, 1983.
- ROCHA, C. D. **Variabilidade genética nas populações de cabeça-seca do Pantanal pelo estudo de microssatélites.** 2002. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Mol. Biol. Evol.** v. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.
- ROSE, P. M.; SCOTT, D. A. Waterfowl population estimates. **United Kingdom: Slimbridge.** 1994. Notas: IWRB Publ. 29.

ROZAS, J. *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. n. 19, p. 2496-2497, 2003.

SACCONE, C.; ATTIMONELLI, M.; SBISA, E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-Loop-containing region in the vertebrate mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.** n. 26, p. 205-211, 1987.

SACCONE, C. *Et al.* Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**. v. 238, p. 195-209, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: A new method for testing using maximum likelihood. **Annu. Rev. Ecol. Systematics**. n. 28, p. 437-466, 1997.

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. **Variabilidade genética na população pantaneira de colhereiros (*Platalea ajaja*)**. São Carlos: UFSCar/Programa de Ciências Biológicas e da Saúde, 2003. 30p. Trabalho de conclusão de curso.

SAWYER, G. M. **DNA profiling of captive roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*) populations as a mechanism of determining lineages in colonial nesting birds**. 2002. 372p. Tese de Doutorado (Doutorado em Filosofia) – Programa de Biologia Molecular pela Universidade do Norte do Texas, Dallas, Texas. 2002.

SCHNEIDER, S. D.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis. **Switzerland: University of Geneva**. 2000.

SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. Estimation of past 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.

SEBASTIAN, E.; RAMOS-ONSINS; ROZAS, J. Statistical properties of new Neutrality tests against population growth. **Mol. Biol. Evol.** v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.

SERKERCIOGLU, C. H.; GRETCHEN, C. D.; EHRLICH, P. R. Ecosystem consequences of birds declines. **Proc. Nat. Acad. Sci.** n. 101, p. 18042-18047, 2004.

SIBLEY, C. G. The electrophoretic pattern of avian egg-white proteins as taxonomic characters. **Ibis**. v. 102, p. 215-284, 1960.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. 1997.

SILVA, F. Movimentos de dispersão da Marreca Parda (*Anās georgica*). In: Encontro nacional de anilhadores de aves, 2, 1986, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1986.

- SILVA, F.; BELLO FALLAVENA, M. A. Movimentos de dispersão de *Platalea ajaja* (Aves, Threskiornithidae) detectados através de anilhamento. **Revista Ecologia Latino Americana**. v. 2, n. 1-3, p. 19-21, 1995.
- SLATIKIN, M. Gene flow in natural population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**. n. 139, p. 457-462, 1985.
- SLUD, P. Birds of Costa Rica: distribution and ecology. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** p. 1-430. 1964.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto, São Paulo: Editora Holos. 2001. p. 172-192.
- SORENSEN, M. D. *Et al.* Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. **Mol. Phyl. Evol.** n. 12, p. 105-114, 1999.
- STANGEL, P. W.; RODGERS, J. A.; BRYAN, L. Genetic variation and population structure of the Florida Wood Storks. **Auk**. n. 107, p. 614-619, 1990.
- STILES, F. G.; SKUTCH, A. F. A guide to the birds of Costa Rica. **New York: Cornell Univ. Press**. 1989.
- STUTE, M. *et al.* Cooling of tropical Brazil (5 degC) during last glacial maximum. **Science**. n. 269, p. 379-383, 1995.
- SUDECO. Superintendência do Desenvolvimento da Região Centro Oeste. **ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO INTEGRADO DA BACIA DO ALTO PARAGUAI (EDIBAP)**. Brasil. 1979.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**. n. 123, p. 585-595, 1989a.
- TELFAIR, R. C.; SWEPSTON, D. A. Analysis of banding and marking nestling Anhingas, Olivaceous Cormorants, Roseate Spoonbills, ibises, bitterns, herons and egrets in Texas (1923-1983). **Texas: Texas Parks and Wildl. Dept.** 1987. Notas: Fed. Aid. Proj. W-103-R.
- TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**. n. 13, p. 789-809, 2004.
- TEMPLETON, A. R. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonucleases mapping. I Basis theory and analysis of alcohol dehydrogenase activity in drosophila. **Genetics**. n. 117, p. 343-351, 2001.
- 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.
- THURBER, W. A. *et al.* **Status of uncommon and previously unreported birds of El Salvador**. Proc. West. Found. Vertebr. Zool. n. 3, 1987.



TOMASULO-SECCOMANDI, A. **Populações de *Mycteria americana* da América do Norte e do Pantanal: Estruturação genética, razão sexual e assimetria flutuante.** 2004. 139 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) Programa de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

TOSTAIN, O. *et al.* Oiseaux de Guyane. **France: Societe d'Estudes Ornithol.** 1992.

U. S. FISH WILDLIFE SERVICE. **U. S. Breeding populations of the wood stork determined to be endangered.** 1984. Notas: Federal Register. n. 40, p. 7332-7335.

VAN DEN BUSSCHE, R. A. *et al.* Low levels of genetic variability in North American populations of wood stork (*Mycteria Americana*). **Auk.** n. 116, index 4, p. 1083-1092. 1999.

VAN TUINEN, M. *et al.* Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. **Proc. R. Soc. Lond. B.** n. 268, p. 1345-1350, 2001.

VEIGA, L. A.; OLIVEIRA, A. T.; GASTAL, N. A. **Aves do Taim.** Brasil: Abrapa, Porto Alegre. 1995.

WAKELEY, J.; HEY, J. Estimating ancestral population parameters. **Genetics.** n. 145, p. 847-855, 1997.

WALBERG, M. W.; CLAYTON, D. A. Sequences and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Res.** n. 9, p. 5411-5421, 1981.

WETMORE, A. The birds of the Republic of Panama. **Washington: Smithsonian Inst.** 1981. Notas: Misc. Collect. n. 150, Part 1, 1981.

WHITE, A. W. A birder's guide to the Bahama island. Colorado: **Am. Birding Assoc.** 1998.

WHITE, D. H.; MITCHELL, C. A.; CROMARTIE, E. Nesting ecology of Roseate Spoonbill at Neuces Bay, Texas. **Auk.** n. 99, p. 275-284, 1982.

WILLIAM, J.; BALLARD, O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology.** n. 13, p. 729-744, 2004.

WILSON, A. C., CANN, R. L.; CARR, S. M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linne. Soc.** n. 26, p. 375-400, 1985.

WRIGHT, R. M.; CUMMINGS, D. J. Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in fungus. **Nature London.** n. 302, p. 86-88, 1983.

WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. **Chicago: Univ. Press.** 1978. v. 4.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetic.** n. 28, p. 114-138, 1943.

YAMASHITA, C.; VALLE, M. P. Sobre ninhais de aves do Pantanal do município de Poconé, Mato Grosso, Brasil. **Vida Silvestre Neotropical.** n. 2, p. 59-63, 1990.

ZHANG, D.; HEWITT, G. M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Tree**. n. 11, p. 247-251, 1996.

ZHANG, B. FANG, S.; YOUNG-MEI, X. I. Low genetic diversity in the Endangered Crested ibis *Nipponia Nippon* and implications for conservation. **Bird Conservation International**. n. 14, p. 183-190, 2004.