

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

THAÍS CAMILO CORRÊA

**HISTÓRICO DEMOGRÁFICO E FILOGEOGRAFIA EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Ardea alba egretta***

**São Carlos
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

THAÍS CAMILO CORRÊA

**HISTÓRICO DEMOGRÁFICO E FILOGEOGRAFIA EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Ardea alba egretta***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.
Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama

**São Carlos
2009**

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

C824hd

Corrêa, Thaís Camilo.
Histórico demográfico e filogeografia em populações
brasileiras de *Ardea alba egretta* / Thaís Camilo Corrêa. --
São Carlos : UFSCar, 2009.
92 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2009.

1. Genética de populações. 2. DNA mitocondrial. 3.
Garça-branca-grande. 4. Estruturação genética. 5.
Expansão demográfica. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

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

**HISTÓRICO DEMOGRÁFICO E FILOGEOGRAFIA EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE ARDEA ALBA EGRETTA**

Dissertação de Mestrado de Thaís Camilo Corrêa

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama

Sílvia Nassif Del Lama

Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Reinaldo Alves de Brito

Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

Cristina Yumi Miyaki

**Este trabalho é dedicado a minha mãe e minhas irmãs,
Maria, Valéria e Juliana por todo apoio e amor,
e ao meu pai Alcides (*in memorium*) pelo exemplo de caráter.**

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original

Albert Einstein

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama pela orientação, amizade, mas principalmente pelo acolhimento e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Deus, Nossa Senhora das Graças e Santo Expedito por me ajudarem nos momentos difíceis, me dando força e coragem para seguir em frente nas minhas conquistas.

À minha mãe por sua dedicação, amor, amizade, incentivo e principalmente por sua força, que sustenta nossa família. Às minhas irmãs, Valéria e Juliana, que sempre estiveram comigo e me apoiaram na realização desse sonho. Sem vocês três minha vida não teria sentido e nem rumo. Desculpas por não dizer isso mais vezes, mas nunca é tarde, Amo vocês!!!

Ao Wellington, meu namorado e amigo, que me fez acreditar que realmente a distância não seria um problema nós, pois cada reencontro ele fez com que me apaixonasse ainda mais por ele.

À Rosângela (Cabeção) por todo apoio, amizade, as inúmeras horas de “divã” e as muitas risadas que demos nestes anos de DGE.

Ao Mercival, grande pesquisador, por toda amizade e incentivo para continuar seguindo meu caminho na área acadêmica.

Aos meus amigos do LGA da configuração passada: Érika, Juliana, Luiza, Rafael e Ricardo pela amizade, o saudável ambiente de trabalho, as gostosas conversas durante o chá da tarde, as risadas e os choros, a sincronia feminina... Vocês foram muito importantes durante este período da minha vida. Saudades!!

Aos meus amigos da configuração atual: Andiará, Cynthia, Emmanuel, Emeline, Jorge, Regiane pela amizade espontânea, paciência com minhas “manias laboratoriais” pra não falar esquizofrenia, pelas muitas risadas e ajuda durante esta etapa final do meu trabalho.

À Iara e Carol, pela ajuda durante as correções e pelo exemplo na realização de suas pesquisas, Carol por sua organização e dedicação, Iara pelo entusiasmo e encanto.

Aos amigos do laboratório do Prof. Marco, não vou citá-los, pois são tantos nomes que tenho medo de esquecer algum, mas sintam se todos agradecidos. Muitos conhecimentos trocados, as mais diversas histórias contadas e discutidas durante nossos almoços no RU, ah não posso esquecer as meninas do Lab. de Imunogenética, que também fizeram parte daqueles bons momentos...

Aos amigos que apesar da distância estavam sempre acompanhando meu trabalho: Suéllen, Maria Fernanda, Laura, Karina, Haroldo, entre muitos outros que no momento me falha a memória, mas que torceram por minhas conquistas.

À Profa. Maria Inês T. Ferro da UNESP – Jaboticabal por possibilitar os seqüenciamentos destas amostras. Gostaria de agradecer em especial sua aluna Agda, por toda atenção, profissionalismo, cuidado com nossas amostras, mas principalmente pela amizade.

Ao IBAMA pelas autorizações para a coleta e transporte das amostras utilizadas nesse estudo e ao CEMAVE – ICMBio pela disponibilização das anilhas utilizadas. Ao Escritório do ICMBio pelo suporte durante a coleta na cidade de Cáceres.

Aos donos das fazendas no Rio Grande do Sul, no Pantanal e Amapá que nos permitiram nossa entrada em suas propriedades e a todos os colaboradores que possibilitaram o acesso aos ninhais, em especial ao Sr. Sherer pela assistência durante a coleta no Rio Grande do Sul.

À minha equipe de coleta no Pantanal: a Profa. Sílvia pela paciência durante o trabalho de campo, o Galo com sua celebre frase “só sei que quem procura acha e se acha é garça”, por toda ajuda e cuidado durante a realização do trabalho. Ao Rodrigo (Genja) pela descontração com suas piadas sem graça e aos muitos “acorda, força Rodrigo!” às quatro horas da manhã e ao André (Baiano) pelo profissionalismo, amizade e conversas durante as muitas estradas que percorremos de um ninhal a outro.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e Evolução e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pela agradável convivência durante estes anos.

A todos que eu não citei, mas que fizeram direta ou indiretamente parte desta etapa da minha vida. Obrigada!

Resumo

Foram estudadas populações de *Ardea alba egretta* (garça-branca-grande) da família Ardeidae (Aves), amostradas em quatro regiões brasileiras, com latitudes diferentes (Rio Grande do Sul, Pantanal, São Paulo e Amapá). Oligonucleotídeos espécie-específicos desenvolvidos nesse estudo possibilitaram o seqüenciamento de um fragmento de 586 pb do Domínio I da região controladora do DNA mitocondrial em 194 indivíduos. Cinquenta e oito sítios polimórficos foram encontrados, definindo 74 haplótipos. O haplótipo de maior frequência foi o Hap9 e a maioria dos demais haplótipos apresentaram frequências baixas. A diversidade nucleotídica média foi de 0,006 e a diversidade haplotípica média 0,908. A distribuição da diversidade nucleotídica seguiu ordem decrescente do Amapá > Pantanal > São Paulo > Rio Grande do Sul e as diferenças entre Amapá e as demais populações foram estatisticamente significativas. Os resultados da análise AMOVA indicaram que há diferenciação genética entre as populações das quatro regiões ($F_{ct} = 0,02145$; $p = 0,03324$). Valores de F_{st} par-a-par revelaram baixa estruturação entre as colônias dentro de cada região, mas estruturação entre as quatro regiões foi detectada. Ficou evidente pelas análises de estruturação que a composição genética do Amapá difere das demais regiões estudadas. Significantes desvios nos testes de F_s de Fu, D de Tajima, R_2 e as análises da distribuição das diferenças par-a-par (“*mismatch distribution*”) e redes haplotípicas em formato de estrela apontam para sinais de expansão demográfica nas populações do Rio Grande do Sul e do Pantanal. Para o Amapá apenas os desvios de F_s de Fu foram significativos e as curvas de “*mismatch distribution*” podem ser explicadas pelo padrão unimodal. A estimativa do tempo de expansão (τ) para o Rio Grande do Sul foi de 7.195 anos antes do presente, para o Pantanal foi de 32.009 e para o Amapá foi de 68.674, anos antes do presente. Os resultados obtidos foram concordantes com a hipótese de que a região equatorial possivelmente foi o refúgio para as populações dessa espécie durante glaciações ocorridas no Pleistoceno.

Palavras chaves: DNA mitocondrial, garça-branca-grande, estruturação, expansão demográfica, Pleistoceno.

Abstract

The present work studied populations of *Ardea alba egretta* (Great Egret) family Ardeidae (Aves), sampled from four Brazilian regions situated at different latitudes (Rio Grande do Sul, Pantanal, São Paulo and Amapá). Species-specific primers developed in this study allowed the sequencing of 194 individuals in the Domain I of mitochondrial DNA control region (fragment of 586 bp). Fifty-eight polymorphic sites were found, defining 74 haplotypes. Haplotype Hap9 was the most frequent and the majority of the remaining haplotypes occurred in low frequencies. Average nucleotide diversity was 0.006 and average haplotype diversity 0.908. Distribution of nucleotide diversity followed a descending order: Amapá > Pantanal > São Paulo > Rio Grande do Sul, and the differences between Amapá and the other populations were statistically significant. Results of AMOVA analysis indicated that there is genetic differentiation among populations of the four regions ($F_{ct} = 0.02145$, $p = 0.03324$). Values of the pairwise F -statistics showed low genetic structuring among the colonies within each region, but significant structuring among the four regions. It was evident by the analysis of structuring that the genetic composition of Amapá is different from other regions. Significant differences revealed by the tests of Fu's F_s , Tajima's D , R_2 and analyses of mismatch distribution, together with star-shaped haplotype networks, indicated signals of demographic expansion in the populations of Rio Grande do Sul and Pantanal. For the Amapá population only biases of Fu's F_s were significant and the curves of "mismatch distribution" can be explained by the unimodal standard distribution. The estimated time of expansion (τ) for Rio Grande do Sul population was 7,195 years before present, for Pantanal population was 32,009 and for Amapá population was 68,674. Obtained results are consistent with the hypothesis that the equatorial region likely was a refuge for populations of this species during the Pleistocene glaciations.

Key words: Great Egret, mitochondrial DNA, structuring, Pleistocene, population expansion.

Listas de Tabelas

Tabela 1.	Localização geográfica dos locais nos quais se encontram as colônias reprodutivas acessadas, as siglas, número de indivíduos analisados e tipo de amostra para cada colônia.....	27
Tabela 2.	Sexagem realizada nos indivíduos de <i>A. alba egretta</i>	41
Tabela 3.	Proporções de bases nitrogenadas no fragmento da região controle (Domínio I).....	48
Tabela 4.	Haplótipos encontrados no fragmento de 586 pb da região controladora, evidenciados pelos 58 sítios polimórficos.....	50
Tabela 5.	Distribuição dos haplótipos nas colônias amostradas das quatro regiões do Brasil.....	53
Tabela 6.	Diversidade genética nas colônias de <i>A. alba egretta</i> em quatro regiões brasileiras.....	55
Tabela 7.	Resultados da AMOVA global.....	57
Tabela 8.	Matriz de significância do <i>Fst</i> par-a-par. Diagonal inferior valores do <i>Fst</i> ; diagonal superior valores de p significativos.....	59
Tabela 9.	Matriz de significância do <i>Fst</i> par-a-par para as quatro regiões. Diagonal inferior valores do <i>Fst</i> ; diagonal superior valores de p significativos.....	60
Tabela 10.	Resultados da AMOVA.....	60
Tabela 11.	Matriz de significância do <i>Fst</i> par-a-par duas populações. Diagonal inferior valor do <i>Fst</i> ; diagonal superior valore de p significativo.....	61
Tabela 12.	Testes de Classe I e II para as quatro regiões.....	61
Tabela 13.	Testes de Classe III: valores de <i>SSD</i> e <i>Raggedness (r)</i> para as regiões do Rio Grande do Sul e Pantanal.....	63
Tabela 14.	Parâmetros demográficos.....	63
Tabela 15.	Teste exato de contingência do NCPA. Interpretação dos resultados significativos obtidos na NCPA dos dados apresentados na figura 25.....	67

Lista de Figuras

Figura 1.	Diagrama da Família Ardeidae. (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).....	1
Figura 2.	Distribuição global da espécie <i>Ardea alba</i> (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).....	4
Figura 3.	Adulto de <i>Ardea alba egretta</i> . Fica evidente o padrão da plumagem branca, o bico amarelo e as pernas pretas.....	5
Figura 4.	A- Colônia em arbustos (RS); B- Estrutura do ninho de <i>A. alba egretta</i> em árvores (MT); C- Ovos no ninho, verifica-se a coloração azul-claro; D- Ninhos em arvores (RS).....	7
Figura 5.	Distribuição da subespécie <i>Ardea alba egretta</i> no continente Americano (NatureServe:< http://www.natureserve.org/infonatura >. Acesso: Julho 2009).....	9
Figura 6.	Filogenia das 15 espécies da família Ardeidae estimada usando um fragmento do <i>Cit b</i> (retirada de SHELDON et al., 2000). *Espécies que não ocorrem no Brasil. A espécie <i>Casmerodius albus</i> corresponde a <i>Ardea alba</i>	12
Figura 7.	Disposição das regiões flanqueadoras da região controladora (CR) ou <i>D-loop</i> (modificado de GIBB et al., 2007).....	13
Figura 8.	Localização das colônias amostradas em quatro regiões do Brasil.....	25
Figura 9.	A- Acesso ao ninho com auxílio de escada; B- Coleta de amostra de sangue; C- Medida do cúlmen; D- Ninhego de <i>A. alba egretta</i> com anilha do CEMAVE.....	28
Figura 10.	Fotografia de um gel de agarose 1%, mostrando a quantificação do DNA extraído de sangue. M: Marcador de massa molecular (DNA Mass Ladder, Fermentas).....	40
Figura 11.	Fotografia de um gel de agarose 3%, mostrando os fragmentos de amplificação de marcadores sexo-específico. Linhas 1, 5, 7 e 9, fêmeas (F) e linhas 2, 3, 4, 7, 6, 8 e 10, machos (M).....	41
Figura 12.	Fotografia de dois géis de agarose, mostrando: A- Amplificação de três indivíduos de <i>A. alba egretta</i> utilizando os iniciadores L16525 e HCSB-1, B- Retirada do fragmento desejado de aproximadamente 1.000 pb. c = <i>Platalea ajaja</i> ; M: Marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas).....	43
Figura 13.	Janela de interfase do programa Gene Runner 3.05 (Copyright © 1994) mostrando uma das seqüências de <i>A. alba egretta</i> e os oligonucleotídeos espécie-específicos desenhados neste trabalho (destacados em lilás = H2, roxo = H1, azul = L1 e vermelho = L2).....	44

Figura 14.	Fotografia de um gel de agarose 2%, mostrando os fragmentos de amplificação de oito indivíduos de <i>A. alba egretta</i> . C: controle negativo, sem DNA; M: Marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas).....	45
Figura 15.	Ordem dos genes que ladeiam a região controladora do DNAmít em Ciconiiformes. Ilustração da localização dos novos oligonucleotídeos iniciadores desenhados, em relação aos iniciadores L16525 e HCSB-1 e os tamanhos esperados para os fragmentos obtidos por amplificação com o uso destes iniciadores. Modificado a partir de Mindell e cols. (1998), tamanhos ilustrativos.....	46
Figura 16.	Fotografia de um gel de agarose 2% mostrando o fragmento de 750 pb amplificado com o conjunto de iniciadores Ardea L3 e Ardea H1 em quatro indivíduos de <i>A. alba egretta</i> . C: controle negativo sem DNA; M: Marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas).....	47
Figura 17.	Alinhamento entre as seqüências do RNAt ^{Glu} de <i>A. alba egretta</i> (1) e de <i>A. novaehollandiae</i> (2), vermelho: forte homologia (acima de 90%), azul: fraca homologia (abaixo de 50%) e preto: diferenças entre as seqüências; Destaque para o códon de iniciação ATG (Met) do gene ND6. Fita do DNA molde para o gene ND6 (sentido 5'- 3', cadeia H). Para melhor visualização da figura, apenas um indivíduo de <i>A. alba egretta</i> foi utilizado no alinhamento.....	47
Figura 18.	Regressão linear da diversidade nucleotídica versos a latitude das colônias de <i>A. alba egretta</i> . F = 5,3503 (p = 0,0360); R2 = 23,71%.....	56
Figura 19.	Gráficos da “ <i>mismatch distribution</i> ” para Rio Grande do Sul, Pantanal, São Paulo e Amapá.....	62
Figura 20.	Rede de haplótipos completa incluindo as populações de <i>A. alba egretta</i> das quatro regiões brasileiras.....	64
Figura 21.	Rede de haplótipos observada para as amostras de <i>A. alba egretta</i> do Rio Grande do Sul.....	65
Figura 22.	Rede de haplótipos observada para as amostras de <i>A. alba egretta</i> do Pantanal.....	65
Figura 23.	Rede de haplótipos observada para as amostras de <i>A. alba egretta</i> de São Paulo.....	66
Figura 24.	Rede de haplótipos observada para as amostras de <i>A. alba egretta</i> do Amapá.....	66
Figura 25.	Rede de haplótipos e agrupamentos para a realização da NCA. Verde- Rio Grande do Sul; Vermelho- Pantanal; Amarelo- Santos-Cubatão; Azul- Amapá.....	68
Figura 26.	Árvore de Neighbour-joining de 586pb da região controladora de <i>A. alba egretta</i> .	

Grupo externo *Bubulcus ibis*, *Ardea novaehollandiae* e *Egretta eulophotes*. Valor dos ramos acima do *bootstrap* de 50%. Verde- Rio Grande do Sul; Vermelho- Pantanal; Amarelo- Santos-Cubatão; Azul- Amapá..... 70

Figura 27. Distribuição no continente Americano das espécies: *Jabiru mycteria* (A); *Mycteria americana* (B); *Platalea ajaja* (C) (NatureServe: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>. Acesso: Setembro 2009)..... 80

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
1.1 A família Ardeidae.....	1
1.2 A espécie <i>Ardea alba egretta</i> (garça-branca-grande).....	3
1.3 O uso do DNA mitocondrial como marcador molecular.....	10
1.4 Estudos filogeográficos e demográficos em Aves.....	13
1.5 A última glaciação na América do Sul.....	16
2 Justificativa.....	19
3 Objetivos.....	21
4 Material e Métodos.....	22
4.1 Material.....	22
4.1.1 Áreas de estudo: Rio Grande do Sul, Pantanal (MT), São Paulo e Amapá.	22
4.1.2 Amostras.....	25
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Extração de DNA.....	28
4.2.2 Sexagem molecular.....	30
4.2.3 Amplificação do fragmento do Domínio I.....	31
4.2.4 Seqüenciamento.....	33
4.2.5 Validação do fragmento da região controladora estudada.....	34
4.2.6 Análise das seqüências de DNA mitocondrial.....	35
5 Resultados.....	40
5.1 Extração de DNA.....	40
5.2 Sexagem molecular.....	40
5.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para o Domínio I da região controladora.....	42
5.4 Validação do uso do fragmento amplificado da região controladora.....	47
5.5 Diversidade Genética.....	48
5.6 Estruturação populacional.....	56
5.7 Histórico demográfico.....	61
5.7.1 Testes de Classe I e II.....	61
5.7.2 Testes Classe III.....	62
5.8 Rede haplotípica e <i>Nested Clade Phylogeographical Analyses</i> (NCPA).....	63
5.9 Análise filogenética por Neighbour-joining (NJ).....	69
6 Discussão.....	71
6.1 Uso do DNAmít nos estudos de filogeografia e histórico demográfico.....	71
6.2 Diversidade genética entre colônias e regiões.....	72
6.3 Estruturação populacional.....	74
6.4 Filogeografia.....	76
6.5 Histórico demográfico.....	77
6.6 Implicações conservacionistas e perspectivas futuras.....	81
7 Conclusão.....	82
8 Bibliografia.....	83

1 Introdução

1.1 A família Ardeidae

A família Ardeidae é uma das sete famílias de aves pertencentes à ordem Ciconiiformes e está amplamente distribuída pelo mundo. De acordo com a última proposta de classificação taxonômica, as 62 espécies descritas dessa família podem ser agrupadas em cinco subfamílias: Ardeinae, Botaurinae, Tigrisomatinae, Agamiinae e Cochleariinae (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) (Figura 1). A origem da família é bem antiga, datada do Eoceno há 60-38 milhões de anos atrás. Alguns dos gêneros presentes hoje são muito velhos, como por exemplo, o gênero *Ardea* que é conhecido desde o Mioceno tardio, há sete milhões de anos atrás (HOYO et al., 1992; KUSHLAN; HANCOCK, 2005). No Brasil, a família está representada por 25 espécies, sendo a maioria de aves aquáticas, com porte variado, ocorrendo desde as garças grandes até os socós de menor porte.

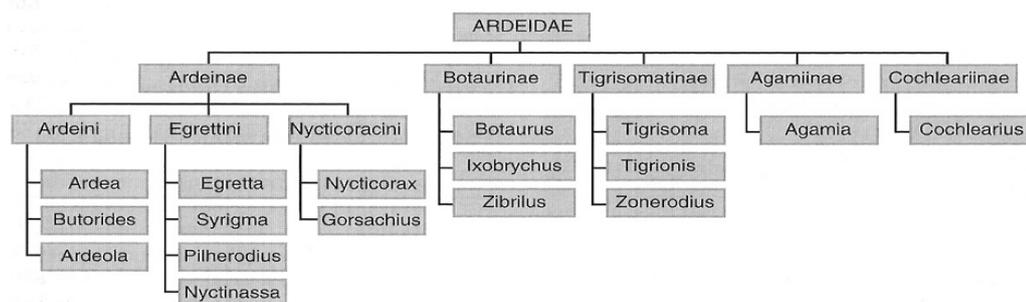


Figura 1: Diagrama da Família Ardeidae. (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

Os ardeídeos dessa família são reconhecidos por todo o mundo, sendo caracterizados pelas pernas e dedos compridos, bicos longos e pontiagudos e, na maioria das vezes, por pescoços finos e longos. Podem apresentar plumagens pretas, marrons, azuis, cinzas e brancas. Os adultos e jovens apresentam diferentes padrões de plumagem (SICK, 1997; SIGRIST, 2006). A cor da íris muda conforme o crescimento e o período reprodutivo, assim como o colorido das partes nuas que se intensifica durante este período e podem mudar de

coloração em questão de segundos ou minutos (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). A característica mais marcante e distinguível desta família é o seu pescoço em forma de “S” devido ao alongamento da sexta vértebra cervical. Essa característica permite retrain e estender o pescoço com grande facilidade, e ele fica geralmente contraído nas costas sobre o corpo durante o vôo (HOYO et al., 1992).

As espécies forrageiam usando ampla variedade de técnicas na captura de suas presas, pois possuem hábitos alimentares diferentes. O tamanho e a forma do bico são especialmente importantes, pois estão envolvidos no tipo de presa. O comprimento do pescoço e das pernas tem relação com a profundidade da água freqüentada pelas diferentes espécies (HOYO et al., 1992; McCRIMMON et al., 2001). A técnica de forrageamento mais usada pelos ardeídeos consiste no comportamento de espera: a ave fica parada ou faz pequenos movimentos na margem dos corpos d’água até que uma presa chegue perto e a ave com seu bico a capture. A dieta pode ser à base de peixes, anfíbios, serpentes aquáticas, pequenos mamíferos (ratos ou preás), moluscos e caranguejos. Todos os ardeídeos tendem a depender, em certo grau, de ambientes aquáticos durante seu ciclo anual (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

As garças apresentam “egretas” (penas de adorno no dorso) e “topetes” durante seu ciclo reprodutivo, período em que são realizadas as elaboradas cerimônias de acasalamento. No grupo de garças encontramos espécies que nidificam isoladamente enquanto outras se reproduzem em colônias. E mesmo dentro do mesmo gênero como *Ardea* há diversidade de padrões, por exemplo, *Ardea sumatrana* faz ninho isolado, *Ardea cocoi*, se reproduz em colônias ou isoladamente e *Ardea alba* se reproduz em colônias na maioria das vezes, podendo também ser encontrada isoladamente. Em regiões temperadas, o período reprodutivo ocorre durante a primavera e o verão, quando as condições ambientais são mais propícias. Nas regiões tropicais a reprodução coincide com o período de estiagem, pois é quando os rios e

lagos se tornam mais rasos, facilitando a captura de presas pelas espécies aquáticas (KUSHLAN; HANCOCK, 2005; SIGRIST, 2006).

Ao longo da história, as civilizações humanas têm se desenvolvido próximas de rios, lagos e oceanos, onde os seres humanos encontram fontes abundantes de alimentos. Estas áreas também são habitadas por integrantes da família Ardeidae e essa co-existência de humanos e ardeídeos têm gerado conflito, pois ambos dependem da água e estes habitats são facilmente susceptíveis a alterações (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Muitas são as pressões sofridas por aves desta família além da ocupação e modificações ambientais antrópicas. Por muito tempo as garças foram caçadas, na prática de esporte (Europa), foram servidas em pratos culinários (China, Madagascar, Índia e Europa), suas penas foram usadas nas decorações (chapéu) (América do Norte e Europa) e foram usadas também com propósitos medicinais (Índia) (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Todas estas ameaças fizeram com que algumas espécies e populações da família estivessem atualmente em situação de risco, por todo o mundo, como exemplo *Gorsachius magnificus*, a espécie de Ardeidae mais ameaçada (na categoria EN – Ameaçada, IUCN - International Union for Conservation of Nature), e *Egretta eulophotes* (na categoria VU – Vulnerável, IUCN) (IUCN, 2009). Apenas uma espécie da família está ameaçada de extinção no Brasil: a espécie *Tigrisoma fasciatum* (socó-boi-escuro) presente no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção 2008 (na categoria EN – Em Perigo) (MACHADO et al., 2008) e na Lista Vermelha da IUCN (na categoria LC - Pouco preocupante) (IUCN, 2009).

1.2 A espécie estudada: *Ardea alba egretta* (garça-branca-grande)

A espécie *Ardea alba* (LINNAEUS, 1758) está representada por três subespécies, com distribuições geográficas distintas: Europa ocidental (*Ardea alba alba*, LINNAEUS, 1758), Américas (*Ardea alba egretta*, GMELIN, 1789) e África (*Ardea alba melanorhynchos*,

WEGLER, 1827) (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) (Figura 2). O presente estudo tem como interesse a garça-branca-grande (*Ardea alba egretta*) representante do continente americano. A posição taxonômica dessa espécie tem sido debatida. Classificada anteriormente no gênero *Casmerodius*, recebeu a denominação *Casmerodius albus* (e.g., HELLMAYR; CONOVER, 1948; MEYER DE SCHAUENSEE, 1970; PINTO, 1938; PHELPS; PHELPS 1958), foi em seguida classificada no gênero *Egretta*. Payne e Risley (1976) propuseram o uso de *Ardea alba* com base em resultados da análise de caracteres osteológicos sendo que estudos comportamentais, bioquímicos e moleculares posteriores deram subsídio a essa classificação (CHANG et al., 2003; KUSHLAN; HANCOCK, 2005; McCracken; Sheldon, 1998; Sibley; Ahlquist, 1990; Sheldon et al., 1995; Sheldon, 1987). No Brasil, o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos adotou a denominação *Ardea alba* (Linnaeus, 1758), segundo Resolução nº 118 (10/10/2003) e tal nomenclatura passou a ser utilizada no país, sendo adotada ao longo deste trabalho.

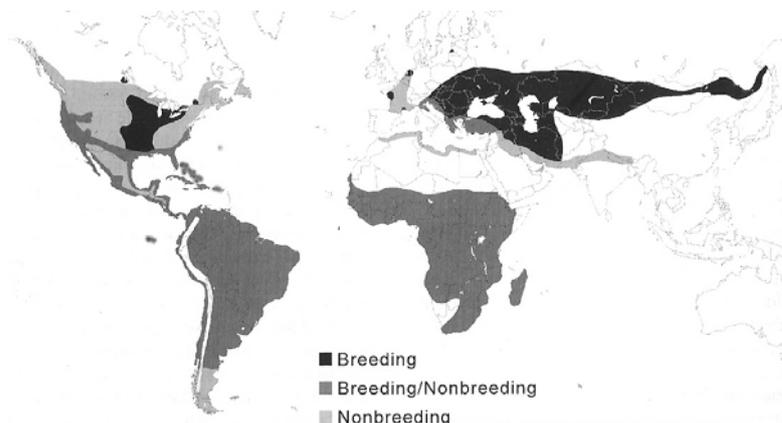


Figura 2: Distribuição global da espécie *Ardea alba* (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

A garça-branca-grande se caracteriza por ser grande e delgada, possuir corpo todo branco, pescoço longo, pernas pretas e longas plumas dorsais durante o período de reprodução. Os adultos possuem entre 85 e 102 cm de altura, a envergadura de suas asas pode chegar a 140 cm e pesam entre 930 e 1700g (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Não

apresentam dimorfismo sexual, mas os machos são geralmente maiores que as fêmeas. A plumagem totalmente branca é ligeiramente alongada, mas não forma cristas (“topetes”). Durante o período reprodutivo um número aproximado de 50 “egretas” (plumas dorsais) alcança o comprimento de 50 cm ou mais, ultrapassando os limites das penas da cauda em aproximadamente 10 cm. O grande bico é amarelo com a ponta preta, a íris dos olhos é amarela e a face (loro, parte sem penas) é verde-amarelada. As pernas e os dedos são pretos (Figura 3) (KUSHLAN; HANCOCK, 2005; McCRIMMON et al., 2001; SICK, 1997).

No período reprodutivo as colorações intensificam-se e mudanças ocorrem na coloração da íris que passa a ser vermelha, o bico apresenta uma coloração laranja e a face fica mais esverdeada. Foi observado que a intensidade dos padrões de coloração observada durante o período reprodutivo pode diferir geograficamente, como por exemplo, a parte superior do bico que pode apresentar a coloração vermelha e a ponta do bico preta. Os jovens são iguais aos adultos, mas não apresentam a plumagem ornamental (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).



Figura 3: Adulto de *Ardea alba egretta*. Fica evidente o padrão da plumagem branca, o bico amarelo e as pernas pretas.

As garças-branca-grande podem nidificar sozinhas ou, como ocorre mais comumente, em colônias, também chamadas de “ninhais”, “viveiros” ou “garçais”. As colônias são freqüentemente mistas, compostas por outras espécies de garças (*Ardea cocoi*, *Egretta thula* e *Bubulcus ibis*), e podem conter espécies de outras famílias de aves aquáticas: biguatinga (*Anhinga anhinga*), colhereiro (*Platalea ajaja*), cabeça-seca (*Mycteria americana*) (DE ARAUJO; NISHIDA, 2007; SOUZA, 2008; YAMASHITA; VALLE, 1990). Nas colônias mistas, a garça-branca-grande é geralmente a primeira a chegar aos locais de reprodução, induzindo a nidificação de outras espécies (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

Os adultos maduros se reúnem nas colônias que podem ter mais de 1.000 ninhos. As colônias permanecem ativas por cerca de 3 a 4 meses por ano. Os ninhos podem ser construídos bem próximos uns dos outros, ou mais distantes (espalhados) quando em colônias (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Colônias se formam sobre árvores com alturas diversas (de 2 a 20 metros de altura) ou em arbustos nos brejais (0,5 m a 1,0 m de altura), podendo ser observadas em matas, campos inundáveis de ambientes dulcícolas ou em manguezais sob influência das regiões costeiras (McCRIMMON et al., 2001). Os ninhos são construídos com gravetos e são forrados com materiais finos, possuindo dimensões que variam entre 80 e 1.20cm de diâmetro, e 20cm de altura (Figura 4 A, B e D) (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).

Os casais são considerados socialmente monogâmicos durante a estação reprodutiva, mas cópulas extra-par já foram registradas em estudos comportamentais (GLADSTONE, 1979; WIESE, 1976). Estudos genéticos com indivíduos de populações naturais estão sendo desenvolvidos no Laboratório Genética de Aves da UFSCar, para se verificar se há realmente ocorrência de fertilização extra-par (MIÑO, em preparação). Os ovos são azuis-claros, sendo encontrados em média de 2 a 3 por ninho. O período de incubação é de 23 a 27 dias (PALMER, 1962) (Figura 4 C). O filhote jovem começa a sair do ninho entre 21 e 30 dias de idade (KUSHLAN; HANCOCK, 2005), aos 34 dias sai por períodos maiores e de 45 a 60 dias

deixa a colônia (DWYER, 1988). Os jovens provavelmente começam a se acasalar no seu segundo ano de vida (KUSHLAN; HANCOCK, 2005).



Figura 4: A- Colônia em arbustos (RS); B- Estrutura do ninho de *A. alba egretta* em árvores (MT); C- Ovos no ninho, verifica-se a coloração azul-claro; D- Ninhos em árvores (RS).

Os ninhegos são cuidados e atendidos por ambos parentais, com frequência variável provavelmente regulada pela disponibilidade alimentar (HOYO et al., 1992). Os pais não interferem na competição dos filhotes e não alimentam preferencialmente nenhum deles, estando o sucesso no crescimento dos ninhegos associado à sua capacidade de competição pelo alimento. Os filhotes mais velhos apresentam maior sucesso devido ao seu porte maior, à sua eficiência na obtenção de maiores porções de alimento e por se alimentarem mais rapidamente (BONNIE; MEDEIROS, 2004). O fenômeno conhecido como redução da ninhada devido ao fratricídio é quase regra nessa espécie. Níveis elevados de agressões ocorrem entre os filhotes mais velhos e os mais novos, geralmente levando a morte do mais novo (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Esta agressividade é menor nos ninhos com apenas

dois filhotes e o fratricídio é mais observado quando há pouca disponibilidade alimentar (MOCK et al., 2005). Embora a agressão não esteja diretamente relacionada à disponibilidade alimentar, a sobrevivência dos ninhego está relacionada à quantidade de alimento e, talvez, ao tipo de alimento oferecido (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). A prevalência desse comportamento em espécies que alimentam seus filhos com pequenas presas, que podem ser mais facilmente monopolizadas, é maior do que nas espécies que alimentam sua ninhada com grandes presas que dificilmente serão monopolizadas. Um bom exemplo é dado em um trabalho realizado no Texas, onde ficou demonstrada agressão elevada (fratricídio) em garça-branca-grande, mas não em garça-azul-grande (*Ardea herodias*) (HOYO et al., 1992).

A distribuição geográfica das populações da garça-branca-grande é contínua por toda América do Sul (Figura 5). Na América do Norte, as populações se distribuem desde o sul do Canadá até o México, estando localizadas as regiões ocupadas durante o período reprodutivo no sul do Canadá, ao norte dos EUA e na costa do México (leste e oeste) (KUSHLAN; HANCOCK, 2005). Na América Central a espécie é considerada residente e apresenta sítios reprodutivos nas regiões úmidas intracontinentais e nas costeiras. As populações de regiões temperadas dispersam e migram de modo complexo, tendo sido propostos dois processos, ainda indistinguíveis, após o período reprodutivo dispersam em muitas direções e são regularmente reportadas ao norte das áreas de reprodução. As populações da América do Sul são reportadas no período pós-reprodutivo ao sul dos locais de nidificação. Na América do Sul são estimados de 246.000 a 915.000 indivíduos (MORALES, 2000), espalhados por toda a região até o sul do Chile, sendo as populações classificadas como residentes. No Brasil, colônias reprodutivas foram localizadas em diversas regiões do norte, centro-oeste e sudeste e sul do país (AOU, 1998; YAMASHITA; VALLE, 1990).

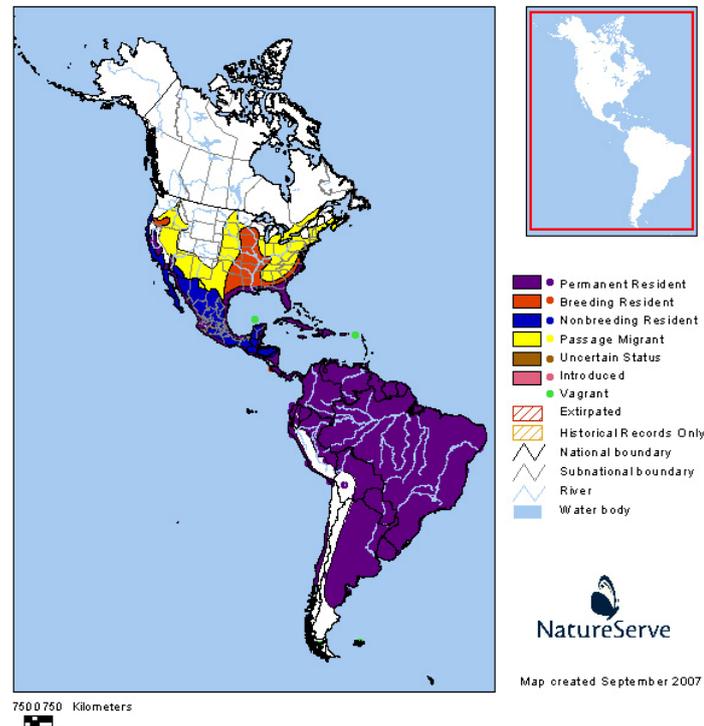


Figura 5: Distribuição da subespécie *Ardea alba egretta* no continente Americano (NatureServe: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>. Acesso: Julho 2009).

Poucos são os estudos ecológicos desta espécie na América do Sul. No entanto, esta espécie foi bastante estudada em conjunto com outras aves aquáticas na região de “*Everglades*” localizada na Flórida (EUA) e considerada uma das mais importantes áreas para forrageamento e reprodução de diversas aves aquáticas. Nestes estudos, foram observados que os padrões hidrológicos afetam muitos os aspectos da dinâmica populacional destas aves. A profundidade hidrológica é a variável que desempenha papel importante na determinação das áreas de forrageamento e no sucesso reprodutivo da garça-branca-grande, assim como de outras espécies estudadas (BANCROFT et al., 2002). O forrageamento da *A. alba egretta* ocorre em grupos ou, mais frequentemente, de forma solitária. As aves se alimentam quase o dia todo, mas são mais ativas durante o amanhecer e o entardecer. A profundidade da água comumente escolhida está entre 20 e 40 cm e as aves geralmente forrageiam em áreas de vegetação abertas (KUSHLAN; HANCOCK, 2005; McCRIMMON et al., 2001).

Moreno e cols. (2004) investigaram se existia correlação entre a seleção da profundidade da água, a eficiência na captura de presas, tipos de itens alimentares, em duas espécies de garças (*A. alba egretta* e *Egretta thula*) na Lagoa Rodrigues de Freitas - RJ. Esses autores concluíram que não existe correlação significativa entre a eficiência de forrageamento e profundidade da água, mas as duas espécies diferiram significativamente em relação à profundidade da água e quanto aos itens alimentares. *A. alba egretta* capturou principalmente peixe em uma profundidade de 25 cm, enquanto que, *E. thula* forrageou a uma profundidade de 0 a 15 cm, capturando principalmente invertebrados.

A espécie, por depender essencialmente dos aspectos hidrológicos da região onde está distribuída, pode ser usada como bioindicadora das alterações nos ecossistemas aquáticos (GRÜLL; RANNER, 1998).

1.3 O uso do DNA mitocondrial como marcador molecular

As mitocôndrias são pequenas organelas com formato oval envoltas por duas membranas altamente especializadas. É nas mitocôndrias que acontece a respiração aeróbica das células, o maior centro produtor de energia nos eucariontes. O DNA mitocondrial (DNAMit) apresenta-se como uma molécula circular, de fita dupla com cerca de 16 kilo bases ocorrendo em múltiplas cópias dentro de cada organela. A molécula de DNAMit contem informações para a síntese de 13 proteínas, dois RNA ribossômicos (RNAr) e 22 RNA transportadores (RNAt), além de uma região não codificadora onde é iniciada a replicação do DNAMit, chamada região controladora (ou *D-loop*) (DESJARDINS; MORAIS, 1990). A replicação do DNAMit é assincrônica com a divisão celular e de centenas a milhares de cópias do DNAMit são encontradas no citoplasma de células somáticas e germinativas de um indivíduo (AVISE, 2009).

A região controladora é geralmente considerada a parte mais variável do DNAmít, em termos de substituição, inserções/deleções (indels) e também por possuir números variáveis de repetições em tandem (siglas em inglês, *VNTRs*). O Domínio I desta molécula, adjacente ao RNAt^{Glu}, contém a sequência associada com a terminação da replicação da fita "pesada" e freqüentemente inclui *VNTRs*, responsáveis principalmente pela variação no comprimento interespecífico e pela heteroplasmia (presença de mais de um tipo de DNAmít em um indivíduo) intraespecífica (RANDI; LUCCHINI, 1998). O Domínio central é em geral o mais conservado, já o Domínio III, adjacente ao RNAt^{Phc}, possui elevada variação devido a substituições nucleotídicas, a inserções e deleções e aos *VNTRs* (RANDI; LUCCHINI, 1998). Dentro da região controladora estão presentes blocos conservados denominados em inglês “*conserved sequence blocks*” (CSB).

Vários fatores contribuem para um ritmo rápido de evolução do DNAmít (AVISE, 2009). As altas taxas de mutação comumente observadas em vários genes mitocondriais podem ser explicadas pelos mecanismos ineficientes de reparo do DNAmít, pelo ambiente altamente oxidativo ao qual o DNAmít está exposto na organela mitocondrial e pelo fato do DNAmít não estar envolvido por histonas (AVISE, 2009).

No final da década de 70, o DNAmít passou a ser utilizado em análises genéticas, sendo inicialmente estudado pelo método de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). As primeiras publicações utilizando polimorfismo do DNAmít, que pode ser considerado hoje um explícito estudo filogeográfico, foram realizadas em 1979 por Avise e cols. e foram realizados com *Peromyscus* e *Geomys* (AVISE, 2000).

O DNAmít revelou-se um interessante marcador molecular por características como organização simples, herança uniparental (maternal) e, portanto haploidia, alta taxa de evolução e ausência de recombinação na maioria das espécies de aves (BERLIN et al., 2004). Atualmente, essa molécula vem sendo utilizada numa grande proporção de estudo cujas

questões a serem respondidas são diversas: estudos filogenéticos, estruturação populacional, histórico demográfico das populações e das espécies (AVISE, 2004; BALLARD; WHITLOCK, 2004). A grande maioria das publicações se referem às espécies do hemisfério Norte (e.g., FRIESEN et al., 2007; PAVLOVA et al., 2008; ZINK; BARROWCLOUGH, 2008), sendo poucos os estudos realizados com populações e espécies do hemisfério sul. Observa-se, entretanto, um recente e crescente número de trabalhos de filogeografia intraespecífica, onde o DNAmít foi usado como marcador no estudo da avifauna em populações da América do Sul (ALEIXO, 2006, CABANNE et al., 2008; CABANNE et al., 2007; CAPARROZ et al., 2009; LOPES et al., 2007).

Com relação à família Ardeidae, o DNAmít foi usado num estudo baseado no gene do citocromo *b*, uma das regiões mais conservadas do DNAmít, para determinar as relações filogenéticas entre 15 espécies (SHELDON et al., 2000). Nesse estudo ficou evidenciada a proximidade filogenética da *Ardea alba*, *Ardea herodias* e *Bubulcus ibis* (Figura 6).

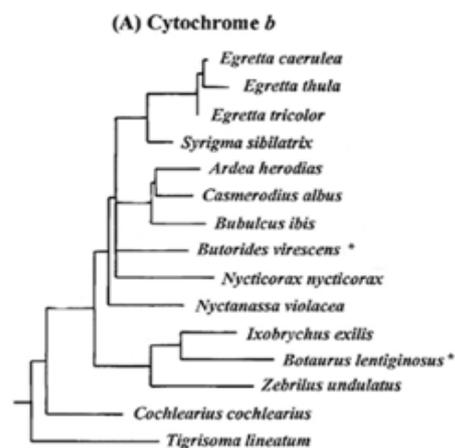


Figura 6: Filogenia das 15 espécies da família Ardeidae estimada usando um fragmento do Cit *b* (retirada de SHELDON et al., 2000). *Espécies que não ocorrem no Brasil. A espécie *Casmerodius albus* corresponde a *Ardea alba*.

Os genes constituintes da molécula do DNAmít são os mesmos para todos vertebrados, mas a posição destes genes é variável (PEREIRA, 2000). Gibb e cols. (2007)

seqüenciaram o DNAmít da *Ardea novaehollandiae* e encontraram nessa espécie a mesma disposição dos genes no DNAmít identificada em *G. gallus* (DESJARDINS; MORAIS, 1990), um padrão também observado para outros Ciconiiformes, como por exemplo, cabeça-seca (*M. americana*) (LOPES, 2002) (Figura 7).

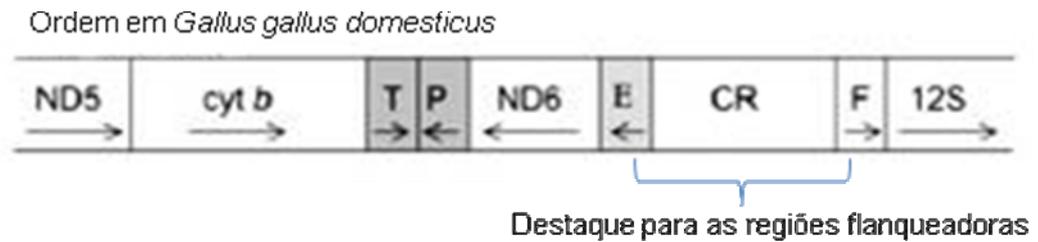


Figura 7: Disposição das regiões flanqueadoras da região controladora (CR) ou *D-loop* (modificado de GIBB et al., 2007).

1.4 Estudos filogeográficos e demográficos em Aves

Estudos com enfoque filogeográfico ou que visam à determinação da estrutura populacional ou o histórico demográfico das populações têm revelado que muitas espécies de aves norte-americanas e européias foram fortemente afetadas pelos eventos glaciais passados. Estudo usando amostras de 12 diferentes sítios migratórios do Falconiforme norte-americano *Accipiter striatus velox* (298 indivíduos), por exemplo, revelou uma diferenciação genética entre as populações do leste e oeste. Os resultados são discutidos considerando que estas duas regiões foram afetadas diferentemente pelos eventos climáticos do Holoceno, sendo o tempo de expansão populacional mais recente na população oeste (7000 – 5000 anos atrás) (HULL; GIRMAN, 2005).

Estudos filogeográficos podem prover informações úteis que ajudam na definição de unidades evolutivas e unidades de manejo e, desta forma, auxiliam na definição das estratégias de conservação de uma determinada espécie. No estudo baseado na região controladora e do citocromo b na espécie *Tetrao urogallus*, realizado por Segelbacher e Piertney (2007) verificou-se uma relação histórica entre as populações de 14 localidades da

Europa (N=221). A estrutura filogeográfica da distribuição na população europeia parece ter sido derivada de dois refúgios glaciais primários: um localizado na Ibéria e outro no leste europeu. Após a retração do gelo, as populações da ibéricas permaneceram restritas, enquanto que, as outras regiões remanescentes da Europa foram recolonizadas pela população do refúgio oriental europeu. O padrão genético detectado desta espécie sustenta duas unidades evolutivas significativas dentro da Europa.

Um estudo filogeográfico global baseado na sequência de um fragmento de 584 pb da região controladora foi realizado numa amostra de 386 adultos da espécie de Procellariiformes, *Oceanodroma castro*, amostrados em oito regiões subtropical e tropical dos oceanos Atlântico e Pacífico. Neste estudo, ficou demonstrado que a estruturação populacional dessas regiões está associada às flutuações observadas nas condições oceanográficas, ocorridas durante o Pleistoceno, contradizendo a classificação original da espécie como sendo monotípica e com um fluxo gênico extensivo entre as colônias (SMITH et al., 2007).

Em um estudo baseado na sequência de um fragmento de 894 pb da região controladora em 78 indivíduos da espécie do pato-azul da Nova Zelândia, *Hymenolaimus malacorhynchos*, Robertson e cols. (2007) encontraram estruturação genética significativa entre as populações das Ilhas do Norte e do Sul, sendo que, o modelo de isolamento por distância explicou a diferença encontrada entre as populações da Ilha do Sul. Esse trabalho pretende subsidiar planos de translocação que deverão considerar as relações históricas existentes entre as populações. Segundo autores não devem ser realizadas translocações entre indivíduos da Ilha do Norte e do Sul essas deveriam ser restritas dentro de cada ilha.

Marthinsen e cols. (2009) investigaram a estrutura genética das populações da coruja da neve, *Bubo scandiacus* com distribuição no círculo polar ártico em três regiões geograficamente separadas (Escandinávia, leste da Sibéria e América do Norte). Esse autores

analisaram dois genes mitocondriais, 510 pb da região controladora e 415 pb do citocromo b, e dois íntrons nucleares do cromossomo Z, VLDLR-9 e BRM-15, não foi encontrada estruturação filogeográfica entre as populações amostradas (N=40), e nem associação significativa entre os haplótipos e a localização geográfica das amostras estudadas. As estimativas de fluxo gênico foram altas no passado recente e possivelmente até hoje, indicando que as populações da coruja da neve constituem na perspectiva genética, uma população panmítica.

Outro estudo realizado por Pavlova e cols. (2006) usando amostras de quinze pontos da Europa e Ásia também diagnosticou não estruturação filogeográfica em duas espécies de Passeriformes, da família Paridae (*Parus major* e *Parus montanus*), confirmando um estudo prévio que demonstrava ausência dessa estruturação. Com a utilização do gene completo do ND2, esta falta de estruturação filogeográfica foi corroborada para as duas espécies, assim como as prévias hipóteses de refúgios que supunham que as duas espécies tinham sofrido contração durante o último período glacial. *P. major* manteve um número pequeno de indivíduos no sul da Europa, já para *P. montanus*, concluiu-se que além da sobrevivência no período glacial no sudeste da Ásia, como anteriormente sugerido, foi sustentada a hipótese de uma população relativamente grande no norte da Eurásia que se expandiu depois para o leste. Esse trabalho demonstra como cada espécie pode responder diferentemente ao período glacial.

No estudo filogeográfico realizado por Cabanne e cols. (2007) na espécie *Xiphorhynchus fuscus*, na Mata Atlântica do sudeste brasileiro, foi utilizada a variação genética detectada na região controladora (575 pb). Significante estruturação populacional, definida por três linhagens principais mitocondriais, foi encontrada e uma delas está associada à subespécie *Xiphorhynchus fuscus tenuirostris* e as outras duas linhagem à subespécie *Xiphorhynchus fuscus fuscus* (linhagem do Norte e linhagem do Sul). A diversificação

intraespecífica encontrada neste trabalho foi explicada pelo isolamento por distância, por eventos recentes de vicariância e pela expansão demográfica relacionada ao Pleistoceno e Holoceno.

Joseph e Wilke (2007), baseando-se em seqüência mitocondriais do gene ND2 (1041pb), investigaram a estrutura filogeográfica de três espécies de Passeriformes a fim de avaliar se essas passaram por expansões recentes (no Pleistoceno) em todo o continente australiano. A expansão populacional não pode ser rejeitada para nenhuma das espécies estudadas. Estas espécies apresentavam padrões fenotípicos estruturados geograficamente, mas ausência de estruturação avaliada pelo DNAmít foi observada. Concluiu-se que os padrões geográficos observados podem ter evoluído rapidamente em resposta aos gradientes ambientais, ou os fatores históricos podem estar operando há pouco tempo para serem detectados pelo ND2.

Essa breve revisão demonstra que o DNAmít apresenta-se como uma eficiente ferramenta nos estudos filogeográficos, de estruturação populacional e de histórico demográfico das populações de aves como as abordadas neste estudo.

1.5 A última glaciação na América do Sul

Durante o Pleistoceno o clima tropical se modificou devido à diminuição da temperatura e do nível de precipitação (PRANCE, 1982). Na América do Sul os rios foram provavelmente afetados pelas mudanças climáticas e pelo abaixamento do nível do mar, áreas inundadas foram secadas e houve diminuição da cobertura vegetal (CLAPPERTON, 1993).

Ab'Saber (1977) e Clapperton (1993) propuseram que durante o Último Máximo da Glaciação (UMG) a região do Pantanal apresentava um clima árido. Estudos mais recentes nas áreas vizinhas ao Pantanal propõem que a área da planície não se tornou tão árida como foi inicialmente proposto, mas que reteve certo grau de umidade e apresentou uma queda na

temperatura média de cerca de 6°C (ASSINE; SOARES, 2004; FERRAZ-VICENTINI; SALGADO-LABORIAU, 1996; LEDRU et al., 1996). O grau da intensidade desses efeitos climáticos ainda está por ser determinado, mas é certo que os eventos paleoclimáticos provocaram mudanças drásticas na biodiversidade dos ecossistemas, principalmente no Alto Araguaia e Pantanal, pois esses sistemas dependem das águas das chuvas para sua inundação sazonal (JUNK, 2003).

Ab'Saber (1977) e Clapperton (1993) propuseram que a região sul do país apresentou um clima mais seco e formações xerófilas com cactáceas na época do UMG. Behling (2002) analisando dados palinológicos na região sul e sudeste (RS, SC, PR, SP e leste de MG) propôs que na época do UMG predominou a vegetação de campos e um clima mais frio com fortes geadas e com temperatura média mínima de 10°C.

No norte do país, na região Amazônica, supõe-se que durante o Pleistoceno o clima foi frio e úmido (e. g. COLINVAUX et al., 2000) e a queda na temperatura foi de 5°C durante o UMG. Como demonstrado por Bush e cols. (2004) nos últimos 170.000 anos a região amazônica apresentou oscilações nos níveis de lagos, mas estes estavam presentes assim como a presença contínua de floresta por todo o último período glacial.

O pico do Último Máximo da Glaciação segundo Thompson e cols. (2000), ocorreu mais tardiamente na região sul da América do Sul (20.000-18.000 anos atrás) do que nas regiões norte e centro (27.000 anos atrás). Existiram diferenças, portanto, na intensidade e na duração das alterações do clima nessas regiões de latitudes diferentes. Por exemplo, a queda na temperatura média foi para 5°C na região norte e de 6°C para o Pantanal, enquanto que, uma queda ainda maior ocorreu no sul e sudeste do Brasil (entre 9 -12°C) (THOMPSON et al., 2000). Da mesma forma prevê-se que a formação da atual planície alagável do Pantanal tenha ocorrido na transição do Pleistoceno/Holoceno (10.200-5.190) (ASSINE; SOARES,

2004; BEZERRA, 1999), enquanto que, condições de maior umidade no sul do país só foram recuperadas por volta de 3.000 anos atrás (BEHLING, 2002; BEHLING et al., 2004).

2 Justificativa

As mudanças climáticas ocorridas durante o final do Pleistoceno podem não ter atingido todas as espécies de aves na mesma intensidade, mas por certo ocasionaram um impacto profundo na distribuição das espécies de aves aquáticas. O efeito pode ter sido maior nas populações das espécies dependentes de faixas de águas rasas para o forrageamento e de substrato vegetal para a construção de ninhos durante seus ciclos reprodutivos. A espécie *A. alba egretta* se inclui nesse grupo de aves, pois forrageia preferencialmente em águas de 20-40 cm de profundidade e faz ninhos em arbustos e árvores. Se considerarmos que a glaciação afetou o nível de umidade das diversas regiões do país como Rio Grande do Sul, Pantanal e Amapá, podemos supor que as aves dessa espécie devem ter se deslocado para outros sítios onde as mudanças climáticas e geomorfológicas foram mais amenas. Um censo realizado anualmente no Reino Unido desde 1928 com *Ardea cinerea* demonstrou uma diminuição na população após inverno severos, seguida de recuperação ao longo do tempo (MARCHANT et al., 2004). Esse trabalho em outra espécie do mesmo gênero demonstra que as populações são afetadas por quedas nas temperaturas.

Uma possível hipótese para o cenário durante os períodos glaciais é de que as populações da espécie *A. alba egretta*, podem ter se deslocado para regiões mais próximas do Equador, onde as mudanças climáticas foram menores e onde as áreas de forrageamento permaneceram disponíveis (COLINVAUX; DE OLIVEIRA, 2001; COLINVAUX et al., 2000; JUNK, 2003). As populações de *A. alba egretta* estão amplamente distribuídas pelo nosso país e o estudo de populações posicionadas em diferentes latitudes permitirá verificar se estas populações foram afetadas de forma diferente durante o Último Máximo da Glaciação. O Domínio I da região controladora (*D-loop*) foi selecionado para esse estudo por ser uma região variável do DNAmít e por não estar aparentemente sob seleção, permitindo um estudo intra específico (AVISE, 2004).

Estudos baseados em DNAmít permitem esclarecer questões históricas das populações num passado mais distante, já estudos com marcadores com altas taxas mutacionais, como por exemplo, os microssatélites possibilitam o entendimento de um passado recente das populações (10 a 100 gerações) (FRIESEN et al., 2007; SELKOE; TOONEN, 2006). A comparação e/ou combinação destes dois marcadores pode fornecer respostas mais conclusivas sobre os padrões de evolução neutra das populações de uma espécie.

3 Objetivos

- Avaliar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações de *Ardea alba egretta* das regiões do Rio Grande do Sul, do Pantanal, de São Paulo e Amapá, com base nas seqüências da região controladora do DNA mitocondrial.
- Verificar o histórico demográfico de populações de *Ardea alba egretta* em quatro regiões brasileiras e traçar um panorama filogeográfico da espécie.
- Comparar os níveis de diversidade e estruturação encontrados pela análise de DNAmít com os encontrados pelo estudo de microssatélites, realizado por Souza (2008).

4 Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Áreas de estudo: Rio Grande do Sul, Pantanal (MT), São Paulo e Amapá.

O estado do Rio Grande do Sul ocupa uma área de 281.748,538 km², sendo banhado a leste pelo oceano Atlântico. O estado possui a segunda maior lagoa da América Latina, a Lagoa dos Patos, e mais duas grandes lagoas, a Lagoa Mirim e a Lagoa Mangueira. Associado a essas lagoas estende-se um complexo sistema de banhados, áreas úmidas e pequenas lagoas isoladas, além de algumas matas de restinga. O Parque Nacional da Lagoa do Peixe é o Sítio de Ramsar (Convenção sobre Zonas Úmidas - RAMSAR - Irã, 1971) do Rio Grande do Sul, esta convenção internacional tem como principais objetivos evitar a perda das zonas úmidas e promover a sua conservação, reconhecendo suas funções ecológicas fundamentais, seu valor econômico, cultural, científico e recreativo. O clima do estado é subtropical úmido, constituído por invernos e verões bem definidos, onde as temperaturas médias dos meses de verão ficam abaixo dos 22°C, em diversas regiões, as temperaturas, estão entre as mais baixas do inverno brasileiro, chegando a -6°C . As chuvas são bem distribuídas ao longo do ano, com médias de precipitação entre 1400mm a 2200mm (BEHLING, 2002). Do ponto de vista ornitológico a região destaca-se pela variedade e extensão de suas áreas úmidas, com uma macrofauna bastante diversificada que sustenta uma avifauna aquática extremamente rica e abundante (BENCKE et al., 2007; SICK, 1997). Sobretudo no período pós-colheita (por exemplo, do arroz) muitas espécies se tornam numerosas como as garças (Ardeidae), o maçarico (*Plegadis chihi*), o colhereiro (*P. ajaja*) e o cabeça-seca (*M. americana*) (BENCKE et al., 2007).

O Pantanal localiza-se nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e nos países vizinhos do Brasil (Bolívia e Paraguai). É uma área com cerca de 200.000km² de planícies alagadas, sujeitas a inundações anuais entre outubro e março, devido o transbordamento do Rio Paraguai e seus afluentes. Nos meses da vazante, formam-se baías de água doce ao lado de “salinas” de água salobra. Entre os meses de julho a outubro, aves como garças, colhereiros e cabeças secas nidificam nestes locais (SIGRIST, 2006). As chuvas que ocorrem na cabeceira dos rios ao norte são responsáveis por mais de 90% da água que alaga a planície aluvial (HAMILTON et al., 1996). A vegetação pantaneira é um mosaico de três regiões distintas: Amazônica, Cerrado e Chaco (Paraguaio- Boliviano) (JUNK et al., 2006). A vegetação do Pantanal não é homogênea e há um padrão diferente de flora de acordo com o solo e a altitude. A temperatura média anual varia de 20 a 28°C. Pelas suas características e importância esta área foi reconhecida pela UNESCO em 2000, como Reserva da Biosfera. Além disso, abriga dois grandes Sítios Ramsar, o Parque Nacional do Pantanal Mato-Grossense e a Reserva Particular do Patrimônio Natural do SESC Pantanal.

São Paulo ocupa uma área de 248.209,426 km², está localizado em uma latitude intermediária a Rio Grande do Sul e Pantanal, de clima subtropical com precipitações em torno de 1200 a 1400 mm e temperaturas anuais de 19 a 22 °C (PESSENDA et al., 2004). Estado conhecido mundialmente por suas riquezas econômicas, já perdeu grande parte de sua cobertura vegetal, reduzida com a expansão da agropecuária e das cidades. Suas florestas, cerrados, mangues, campos e restingas cobrem hoje apenas 13,9% do território paulista dos quais 77% pertence a proprietários particulares e 23% estão protegidos pelo Estado (BIOTA – FAPESP, 2006).

O Estado do Amapá faz parte dos limites da Amazonia Legal, ocupando uma área de 142.814,585 km² é um estado fortemente influenciado pelas águas, banhado pelo Oceano Atlântico e com importantes rios, como o Amazonas, Jari, Oiapoque, Araguari. O clima é

quente e úmido a cobertura vegetal é bastante diversificada, caracterizada principalmente pela Floresta Ombrófila Densa (Floresta Amazônica), Matas de Várzea, Igapós, Campos Alagáveis e nas áreas próximas ao litoral a vegetação encontrada é de manguezais, onde chama a atenção a grande quantidade de dormitórios de garças (*A. alba*, *E. thula*, *Egretta caerulea*), guarás (*Eudocimus ruber*) e colhereiros (*P. ajaja*), além de algumas cegonhas (*M. americana*, *Ciconia maguari* e *Jabiru mycteria*) (SOUZA et al., 2008). A temperatura média mensal do Amapá é de 25,6°C, a média anual de 24°C, com máxima e mínima de 30°C e 18°C, respectivamente (COUTO et al., 2001), o clima local apresenta duas estações bem definidas, verão e inverno. Os índices pluviométricos anuais ficam em torno de 2000mm a 3500mm (AB’SABER, 2003). A capital do estado, Macapá, está próxima ao “marco zero”, ou seja, próximo a linha do Equador, portanto o Amapá encontra-se em uma latitude que durante o UMG manteve suas características mais estáveis, e possivelmente serviu como refugio (Figura 8).

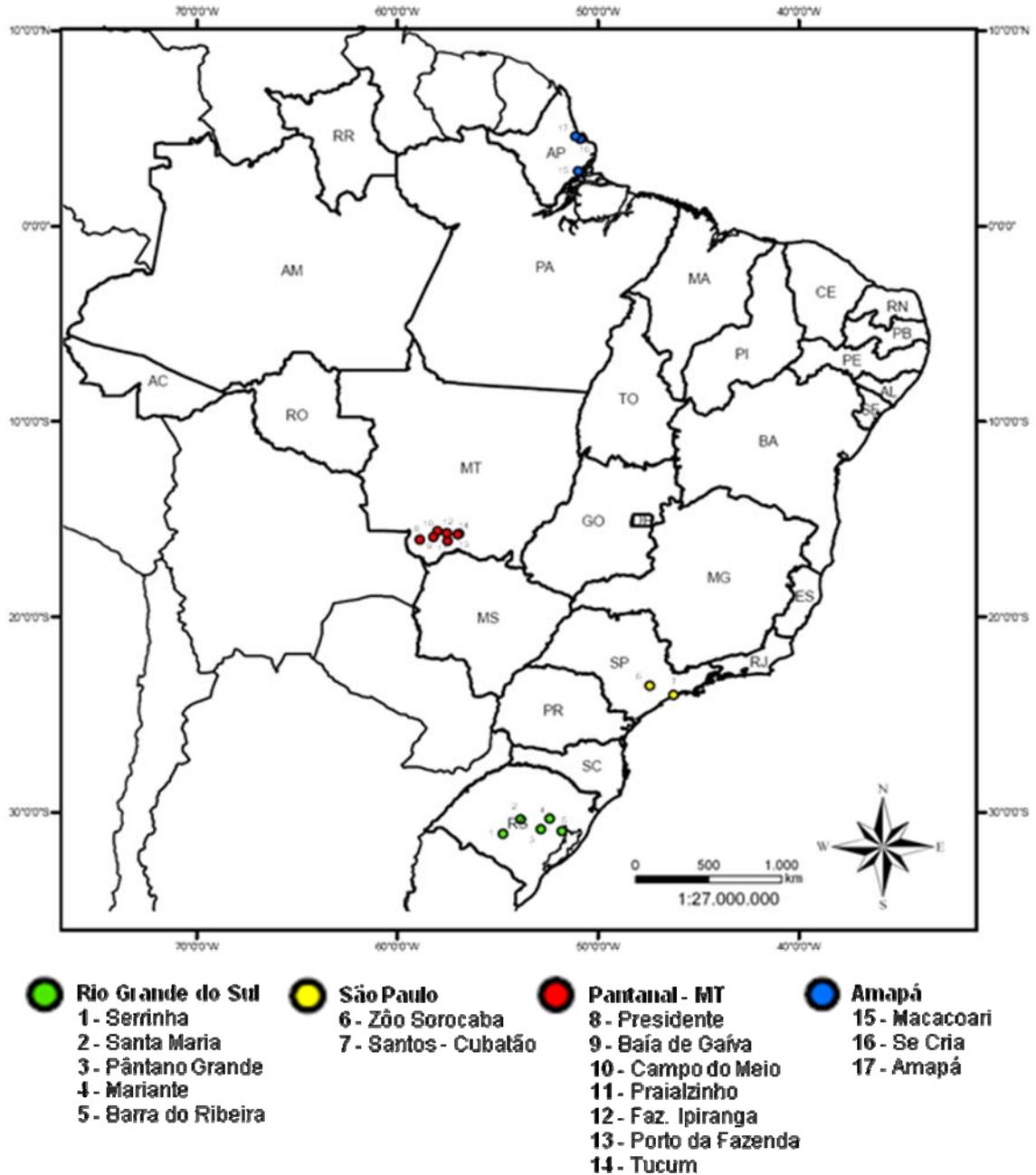


Figura 8: Localização das colônias amostradas em quatro regiões do Brasil.

4.1.2 Amostras

No desenvolvimento deste estudo três cidades do Pantanal Mato-Grossense foram visitadas no fim do mês de agosto e início do mês de setembro (2008): Barão de Melgaço, Poconé e Cáceres. Um total de sete colônias ativas neste período foram identificadas, na qual foram acessadas cinco delas: Tucum, Porto da Fazenda, Praialzinho, Campo do Meio e Presidente, coletando-se 92 amostras de sangue. Todas as colônias

acessadas localizavam-se em terrenos seco e próximas de rios ou corixos, com exceção do ninhal Campo do Meio que não apresentava nem um tipo de corpo d'água perto. As colônias mistas incluíam as espécies *A. alba egretta*, *M. americana* e *P. ajaja*, variando no número de ninhos de cada espécie, mas com o predomínio de cabeça-seca. Algumas colônias como, por exemplo, Tucum e Porto da Fazenda, apresentavam grande assincronia, ou seja, possuía ninhos com filhotes em estágios diferentes de desenvolvimentos (desde ovos até jovem adultos). Foi verificada a presença de muitos predadores como urubus (*Coragyps atratus*) e carcarás (*Polyborus plancus*) em todas as colônias, mas no ninhal Praiazinho a frequência foi menor que as demais localidades. Ainda para avaliar a região do Pantanal, foram utilizadas amostras já coletadas de duas colônias: Fazenda Ipiranga (coletadas em 1997) e Baía de Gaíva (coletadas em 2003).

A equipe do Laboratório Genética de Aves amostrou em janeiro de 2007, no Rio Grande do Sul, cinco colônias Barra do Ribeira, Santa Maria, Serrinha, Mariante e Pântano Grande, totalizando 170 amostras de sangue de filhotes de *A. alba egretta*. O Estado do Amapá foi acessado por dois anos onde 14 indivíduos foram amostrados, dentre eles estão amostras de sangue das colônias de Se Cria (coleta de 2006) e Macacoari (coletados em 2007), e amostra de pena (amostragem não invasiva) de um pouso na Cidade de Amapá (AP). São Paulo foi representado por duas colônias totalizando 13 indivíduos, uma localizada dentro do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros na cidade de Sorocaba (2007), e outra colônia na área de mangue de Santos-Cubatão (1998). Apenas um indivíduo por ninho foi incluído na análise (Tabela 1).

Tabela 1: Localização geográfica dos locais nos quais se encontram as colônias reprodutivas acessadas, as siglas, número de indivíduos analisados e tipo de amostra para cada colônia.

Populações	Sigla	Nº de ind. analisados	Amostra	Coordenadas Geográficas
Rio Grande do Sul				
Barra do Ribeira	BR	19	Sangue	S 30°16'46.7"/ W 51°23'52.3"
Santa Maria	SM	20	Sangue	S 29°42'36.5"/ W 53°16'02.1"
Serrinha	SR	20	Sangue	S 30°22'58.3"/ W 54°04'37.1"
Mariante	MA	20	Sangue	S 29°40'48.4"/ W 51°58'07.0"
Pântano Grande	PG	17	Sangue	S 30°10'58.3"/ W 52°20'51.6"
Pantanal				
Tucum	TU	10	Sangue	S 16°26'31.8"/ W 53°3'28.8"
Porto da Fazenda	PF	22	Sangue	S 16°28'5.02"/ W 56°7'35.7"
Praialzinho	PZ	22	Sangue	S 16°46'4.6"/ W 56°35'2.1"
Campo do Meio	CM	5	Sangue	S 16°18'59.1"/ W 57°2'45.6"
Presidente	PR	1	Sangue	S 16°43'13.6"/ W 57°50'3.2"
Baía de Gaíva	BG	5	Sangue	S 16°35' / W 57°14'
Faz. Ipiranga	FI	6	Sangue	S 16°25' / W 56°36'
São Paulo				
Zôo Sorocaba	ZS	6	Sangue	S 23°30'17.03"/ W 47°26'16.93"
Santos-Cubatão	SC	7	Sangue	S 23°55'31"/ W 46°20'53"
Amapá				
Se Cria	SE	5	Sangue	N 1°56' / W 50°35'
Macacoari	MC	2	Sangue	N 0°26'60.0"/ W 50°40'0.0"
Cidade do Amapá	PA	7	Penas	N 2° 3'3.90"/ W 50°47'40.07"
Total		194		

Nas colônias onde os ninhos foram construídos em árvores altas e o acesso não foi possível apenas com as mãos ou vara com laço, utilizou-se escadas de 6m e/ou uso de equipamentos de escalada para a captura dos ninhegos. As amostras de sangue foram obtidas com a manipulação dos filhotes no entorno do ninhal e foi feita posterior devolução dos filhotes para os ninhos. Aproximadamente 0,2ml de sangue foram coletados da veia braquial com seringas e agulhas de 1ml, utilizando-se EDTA 3% como anticoagulante. O sangue foi transferido imediatamente para um microtubo com etanol absoluto. Foram tomadas medidas morfométricas dos ninhegos amostrados, tais como: peso e comprimento do tarso, do cúlmen e da asa. No laboratório o material foi armazenado em freezer a -20°C para posterior extração do DNA. Todos os ninhegos foram marcados com anilhas metálicas fornecidas pelo

CEMAVE (Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres - ICMBio)
(Figura 9).

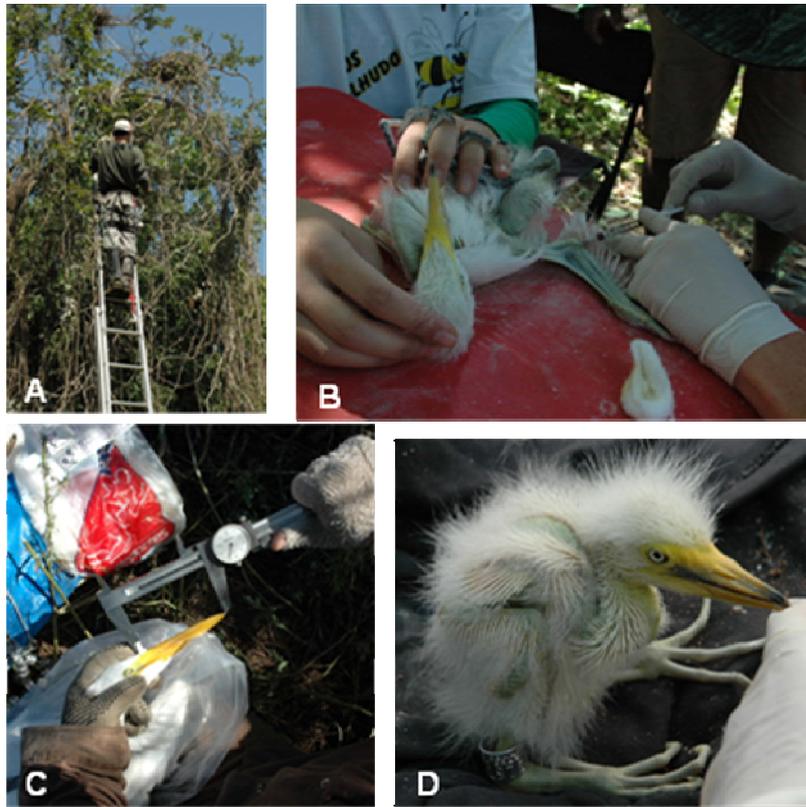


Figura 9: A- Acesso ao ninho com auxílio de escada; B- Coleta de amostra de sangue; C- Medida do cúlmen; D- Ninhego de *A. alba egretta* com anilha do CEMAVE.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de DNA

No laboratório, foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue correspondentes à coleta de 2008 e parte da coleta do RS de 2007, segundo o método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) com algumas modificações: 30 μ l de papa de hemácias foram misturados a 220 μ l de tampão de lise (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 e KCl 50mM), 5 U de Proteinase K e 10 μ l de SDS 10%, esta mistura foi incubada em banho-maria por 12 horas a 37 °C. A extração propriamente dita iniciou-se com a adição de 250 μ l de fenol,

seguida de agitação por 10 min., após esta etapa centrifugou-se por 10 min. a 12.000rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e acrescidos com 250µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), as etapas de agitação e centrifugação foram repetidas. Os sobrenadantes foram novamente transferidos e acrescidos com 250µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguiu-se novamente leve agitação e centrifugação. Os sobrenadantes resultantes deste último passo foram transferidos para tubos limpos, adicionou-se acetato de sódio 3M (10% do volume transferido) e etanol absoluto gelado (250% do volume), O tubo foi invertido algumas vezes até a visualização das moléculas de DNA precipitadas.

Os tubos contendo DNA e álcool foram deixados no freezer durante uma noite, para que a precipitação do DNA se completasse. Decorrido este período centrifugou-se os tubos por 30 min. a 12.000rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500µl de etanol 70% gelado para lavar o precipitado, centrifugou-se por 10 min. a 12.000rpm, descartou-se o etanol e repetiu-se este último passo de lavagem do DNA por mais uma vez. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente para evaporação do álcool. O DNA foi ressuspendidos adicionando-se de 100 a 200µl de água destilada. As amostras foram quantificadas em gel de agarose 1%, aplicando-se em cada poço 1µl da solução de DNA e se comparando com um marcador de massa molecular (DNA Mass Ladder, Fermentas) e após a quantificação as amostras foram diluídas em água destilada para a concentração de DNA de 40ng/µl, a serem usadas nas amplificações por PCR. O DNA estoque e diluído foram estocados em freezer - 20°C.

O DNA das amostras de penas foi extraído de acordo com protocolo desenvolvido por Miño e Del Lama (2009). Como as penas foram coletadas no solo, antes do início da extração as penas foram limpas com álcool 96% para se eliminar possíveis fontes de contaminação. A região do cálamo da pena, onde são encontrados restos celulares do tecido sangüíneo foi

picada com auxílio de uma tesoura estéril. Aproximadamente 5 mg deste tecido foram misturados a 500 µl de TNE 1x (H₂O; 50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl e 6.3 mM EDTA pH 7.5), 10 U de Proteinase K (Sigma-Aldrich) e 8 µl de SDS 25%. Esta mistura foi incubada em banho-maria à 37°C por 7 dias, e a cada dia foi adicionado 5U de Proteinase K, seguido de leve homogeneização em agitador orbital por 1 hora. Decorrida uma semana de incubação, a extração foi iniciada segundo o método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) utilizado para as amostras de sangue descrito acima.

O DNA das amostras coletadas em viagens de campo anteriores a 2008 que já havia sido extraído por outros membros do laboratório de Genética de Aves (DGE – UFSCar), e encontrava-se armazenado no banco de DNA desse laboratório foram novamente diluídos a fim de se obter novas soluções de 40ng/µl.

4.2.2 Sexagem molecular

A sexagem molecular foi realizada segundo Griffiths e cols. (1998), após ampliações dos íntrons do gene CHD nos cromossomos W e Z, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores P₂ (5' TCTGCATCGCTAAATCTTT 3') e P₈ (5' CTCCAAGGATGAGRAAYTG 3') (GRIFFITHS et al., 1998). O volume final da reação de polimerase em cadeia (PCR) possuía 16µl, contendo: 7,5mg/µl de DNA, 10mM Tris-HCl (pH 9), 50mM KCl, 20mM (NH₄)SO₄, 2mM MgCl₂, 0,2µM de cada nucleotídeo, 10µM dos iniciadores P₂ e P₈, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools) e H₂O. As reações foram realizadas num termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®, com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3', seguido de 30 ciclos de 95°C 30'', 49°C 30'' e 72°C 45'', finalizado com uma extensão de 72°C por 5'.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, submetido à corrente de 30 mA por aproximadamente 3 horas. Ao

término da corrida o sexo dos indivíduos foram identificados pela visualização dos géis sob luz UV em transiluminador (Beckman, DU 520), com o auxílio de marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder, Fermentas).

Os desvios na razão sexual, ou seja, a proporção de machos e fêmeas de uma população, calculada a partir do número de machos pelo total de cada colônia e região foram testados segundo o teste de Qui-quadrado presente no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4.2.3 Amplificação do fragmento do Domínio I

Não existiam descritos na literatura oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação da região controladora da espécie *A. alba egretta*, portanto, para uma primeira amplificação desta região foram utilizados para a cadeia leve (L) oligonucleotídeos iniciadores universais, desenhados para amplificação do DNA mitocondrial das aves (SORENSEN et al., 1999):

L16206 5' TAA ACH GCC CGA ATH GCC CC 3' $t_m = 62^\circ\text{C}$

L16525 5' ACA AAC ACC ACC ARC ATH CCH CC 3' $t_m = 58^\circ\text{C}$

Para a cadeia pesada (H) foi utilizado um oligonucleotídeo desenhado para a região conservada CSB-1, desenhado a partir da seqüência da região controladora de *G. gallus* por Lopes e cols. (2006):

HCSB-1 5' TCC GAC AAG CAT TCA CTA AAT 3' $t_m = 58^\circ\text{C}$

Para os testes com as duas combinações de iniciadores, foram realizadas reações no volume final de 12,5µl segundo o protocolo: 9,5mg/µl de DNA, 75mM Tris-HCl (pH 9),

50mM KCl, 20mM (NH₄)SO₄, 2mM MgCl₂, 0,25 μM de cada nucleotídeo, 10μM de cada iniciador, 0,152mg/ml de BSA, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools) e H₂O. A reação foi submetida à denaturação inicial de 96°C por 5', seguido de 5 ciclos de 94°C 30'', 51°C 30'', 72°C 1', 21 ciclos de 94°C 30'', 51°C 30'', 72°C 1', sendo a temperatura 51°C diminuída 0,1°C a cada ciclo (*touchdown*) e 10 ciclos de 94°C 30'', 45°C 30'', 72°C 1', finalizando com uma extensão de 72°C por 10' (Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®).

Após a amplificação, os produtos obtidos foram seqüenciados. A partir destas seqüências foram desenhados novos oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos mais internos. A seqüência completa do DNA mitocondrial de *Ardea novaehollandiae* obtida no Genebank (NC 008551) (GIBB et al., 2007), foi também utilizada durante a definição destes oligonucleotídeos iniciadores. O programa GeneRunner 3.05 (Copyright © 1994) foi utilizado na avaliação dos novos iniciadores desenhados manualmente. Foram verificados parâmetros como a possível ocorrência de dímeros e formação de "hairpin loops", a porcentagem das bases CG e as temperaturas de hibridação.

Foram desenhados seis iniciadores espécie-específicos, três para a cadeia L (Ardea L1, Ardea L2 e Ardea L3) e três para cadeia H (Ardea H1, Ardea H2 e Ardea H3). As seqüências dos oligonucleotídeos estão apresentadas a seguir:

Ardea L1 5' AGT GTA CGG CTG TGC TTG AA 3' $t_m = 60^\circ\text{C}$

Ardea L2 5' TGA GTA ATG GTG GGC TGT GC 3' $t_m = 62^\circ\text{C}$

Ardea L3 5' CAC CTA ACA CAA AAC ACA AAC 3' $t_m = 58^\circ\text{C}$

Ardea H1 5' CGT CTG TAT GCT CAC GTC TTC 3' $t_m = 64^\circ\text{C}$

Ardea H2 5' CCG TCT CAT CCA GTT ATT CTT GC 3' $t_m = 68^\circ\text{C}$

Ardea H3 5' GAA CGA CCA ATA GAT AAC CTG 3' $t_m = 60^\circ\text{C}$

Todas as combinações foram testadas e foi escolhido o par de oligonucleotídeos que apresentou fragmento de amplificação mais próximo do esperado e de tamanho adequado para as análises subsequentes. O fragmento amplificado no presente estudo utilizou o par de iniciadores Ardea L3 e Ardea H1 e as seguintes condições: 9,5mg/μl de DNA, 10mM Tris-HCl (pH 9), 50mM KCl, 20mM (NH₄)SO₄, 2mM MgCl₂, 0,25μM de cada nucleotídeo, 10 μM de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools) e água estéril. A reação, no volume final de 12,5μl, foi submetida à denaturação inicial de 96°C por 5', seguido de 5 ciclos de 94°C 30'', 60°C 30'', 72°C 1', 21 ciclos de 94°C 30'', 58°C 30'', 72°C 1', sendo a temperatura 58°C diminuída 0,1°C a cada ciclo (touchdown) e 10 ciclos de 94°C 30'', 45°C 30'', 72°C 1', finalizando com uma extensão de 72°C por 10' (Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®). Os demais pares de oligonucleotídeos utilizados durante as provas de padronização da região analisada, também seguiram este protocolo apenas com a mudança da temperatura de hibridação de cada iniciador.

A amplificação dos produtos de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, submetido à corrente de 60mA. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas) para conferir o tamanho do fragmento amplificado.

4.2.4 Seqüenciamento

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados. A um volume de 8μl de produto de PCR, foram adicionados 1U da enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB®) e 10U de Exo I (Exonuclease I, USB®), esta reação foi submetida à uma hora a 37 °C e 80 °C por 15 min. no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®. A qualidade da purificação, bem como a quantidade de DNA presente, foi avaliada em gel de agarose 1%, através da comparação com um marcador de massa molecular (DNA Mass Ladder,

Fermentas). As amostras purificadas foram diluídas em água estéril a fim de obter-se um produto de aproximadamente 50ng/μl para a reação de seqüenciamento.

A reação de seqüenciamento utilizando Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer) foi realizada no próprio laboratório segundo instruções do fabricante do *kit*: foram misturados 1μl de Big-Dye, 1μl do DNA purificado (50ng/μl), 1μl do iniciador correspondente (10μM), 3μl de Tampão (200mM Tris-HCl pH 9.0, 5mM MgCl₂) e 4μl de água estéril, totalizando um volume final de 10μl. Esta reação foi levada ao termociclador utilizado o mesmo programa usado para a amplificação do fragmento. As reações de seqüenciamento foram realizadas com cada um dos iniciadores a fim de obter seqüências “*forward*” e “*reverse*” da região amplificada.

Os seqüenciamentos foram realizados utilizando-se o seqüenciador automático ABI Prism 3730 ou 3700, no Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Jaboticabal.

4.2.5 Validação do fragmento da região controladora estudada

As seqüências completas dos DNAmits descritas de *Ardea novaehollandiae* (NC 008551) (GIBB et al., 2007) e *Egretta eulophotes* (NC 009736) (ZHOU et al., 2008) disponíveis do NCBI (National Center for Biotechnology Information), foram utilizadas como base (“*outgroup*”) no alinhamento e validação das seqüências obtidas. O recurso blastn, do NCBI, para avaliar a similaridade entre seqüências também foi utilizado.

Como tentativa de evitar NUMTs (do inglês, *Nuclear Mitochondrial-like Sequences*) o fragmento seqüenciado foi maior do que a região utilizada em todas as análises do trabalho (apenas Dom I), este fragmento completo englobou o RNA^{Glu} que flanqueia o Domínio I e parte do gene ND6. Utilizando o recurso ORF Finder (ORF - Open Reading Frame Finder) do NCBI o códon de iniciação (ATG – Met) do gene ND6 foi identificado sugerindo a

funcionalidade do mesmo. Além desta análise um alinhamento foi realizado no MultAlin (CORPET, 1988) entre indivíduos de *A. alba egretta* analisados (N= 6) e o RNAt^{Glu} da *A. novaehollandiae*.

Outra estratégia utilizada foi a comparação das proporções das bases nitrogenadas que compõem o domínio estudado, comparando com o esperado para o DNAmít de outras Aves (BAKER; MARSHALL, 1997)

4.2.6 Análise das seqüências de DNA mitocondrial

Os eletroferogramas das seqüências foram visualmente verificadas utilizando-se o programa Codon Code Aligner 1.5.2 (CodonCode Corporation, 2007) onde as seqüências “forward” e “reverse” de cada indivíduo foram alinhadas, obtendo-se um consenso. Com a utilização do programa BioEdit (HALL, 1999), através do ClustalW, as seqüências consenso foram alinhadas e manualmente verificadas. As estimativas de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) (NEI, 1987) foram computadas pelo programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). Estas estimativas podem ser utilizadas na investigação do histórico demográfico, onde altos valores de diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica podem sugerir recente crescimento populacional, enquanto que altos valores de diversidade haplotípica e altos valores diversidade nucleotídica são indicativos de populações estáveis (MILA et al., 2000; HULL; GIRMAN, 2005). O teste estatístico t (amostras independentes) presente no BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), foi utilizado para avaliar a significância das diferenças nas diversidades observadas entre as colônias de cada região. Foi realizado um teste de correlação no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) entre as diversidades nucleotídicas e as latitudes das quatro regiões.

A distribuição espacial da diversidade genética foi investigada através de estimativas de *Fst* par-a-par e da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992)

utilizando-se o programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). Os índices de fixação da AMOVA foram aplicados para estimar a proporção de variação genética entre os grupos (F_{ct}), entre populações e entre grupos (F_{st}) e entre populações dentro de grupos (F_{sc}). A significância destes parâmetros foi testada utilizando-se estatísticas de permutação não-paramétrica incorporadas no programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005).

Como proposto por Ramos-Onsins e Rozas (2002) o rápido crescimento demográfico da espécie nas áreas amostradas foi inferido a partir da comparação entre os métodos estatísticos de Classe I: utiliza informações das frequências mutacionais de sítios segregantes (D de Tajima e R_2); Classe II: utiliza informações sobre a distribuição haplotípica (F_s de Fu); e Classe III: onde a informação utilizada é a distribuição das diferenças par a par das seqüências (“*mismatch distribution*”).

A região do DNAmít estudada foi testada quanto a neutralidade utilizando diversos parâmetros. Os testes de neutralidade de F_s de Fu (FU, 1997) e D de Tajima (TAJIMA, 1989) realizados pelo Arlequin. Os testes de D^* e F^* de Fu e Li (1993) e R_2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002) foram realizados utilizando-se o programa DnaSP v. 5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). O F_s de Fu é um teste estatístico que utiliza informações sobre a distribuição dos haplótipos para testar especificamente o crescimento populacional e tem sido demonstrado estar entre os melhores, em comparações do poder estatístico, para tal detecção (FU, 1997; RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002). O teste de D de Tajima contrasta o número de diferenças nucleotídicas entre as seqüências (π) e o número de diferenças entre os sítios segregantes (θ). Expansões populacionais podem causar um desvio significativo negativo para D de Tajima (TAJIMA, 1989). As estatísticas D^* e F^* de Fu & Li (1993) foram calculadas para refinar as inferências sobre as causas de um eventual desvio da neutralidade já que estes testes são mais sensíveis a desvios decorrentes de seleção e não dos sinais de expansão populacional. Valores de F_s significativos e de D^* e F^* não significativos reforçam os indícios de expansão

demográfica, enquanto que o reverso sugere que os efeitos da seleção sejam mais pronunciados. O teste R_2 , desenvolvido por Ramos-Onsins e Rozas (2002) baseia-se nas diferenças entre o número de mutações únicas e o número médio de nucleotídeos. O teste de R_2 parece ser mais adequado para análises de populações com tamanho amostral pequeno.

A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“*mismatch distribution*”) (HARPENDING, 1994; ROGERS; HARPENDING, 1992) permitem discriminar entre populações que permaneceram estáveis ao longo do tempo e populações que sofreram expansão demográfica recente. Populações estáveis e em equilíbrio entre mutação (que tende a aumentar a variação da população) e deriva (que promove a perda aleatória de variação), apresentam padrões de curvas multimodais. Por outro lado, populações que sofreram processo de expansão demográfica apresentam padrão unimodal devido à taxa de acumulação de novas mutações ser mais alta que a perda da variação por deriva (ROGERS; HARPENDING, 1992). As curvas observadas e esperadas da “*mismatch distribution*” foram obtidas utilizando o programa DnaSP v. 5, a soma do desvio dos quadrados (*SSD*) calculado no Arlequin 3.1. A estatística “*raggedness*” (*rg*) (HARPENDING et al., 1993; HARPENDING, 1994) também foi utilizada para avaliar a homogeneidade da curva (“*smoothness*”) da “*mismatch distribution*”, que apresenta diferentes padrões para populações estáveis e populações em expansão, baixos valores de *rg* são esperados para o modelo de crescimento populacional, obtidos no DNAsp v. 5.

A partir dos parâmetros demográficos obtidos na análise da “*mismatch distribution*” (Arlequin 3.1) como Tau, estimativa da idade de expansão (τ); e Theta 0 e Theta 1 são os tamanhos populacionais antes (θ_0) e depois (θ_1) da expansão. O tempo em anos desde expansão da população foi calculado através do modelo de Rogers e Harpending (1992) utilizando-se a fórmula $t = \tau/2u$, onde u é traduzido como: $mt \times k$ (mt é a taxa de mutação por milhão de anos por tempo de geração; k é o tamanho da seqüência em pb). A taxa de mutação

de 2% sugerida convencionalmente pelo relógio molecular do DNAmít em aves parece não se aplicar as seqüências da região controladora, que tem sido empregado para a calibração taxas dez vezes mais rápidas (BAKER; MARSHALL, 1997). Portanto foram utilizadas taxas de mutação de 2%, 6% e 10% para a obtenção de um tempo médio em anos (SANTOS et al., 2008), dois anos de tempo de geração (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) e o tamanho de 586pb do fragmento da região controle.

Uma rede representativa da relação evolutiva entre os haplótipos (rede de haplótipos) foi gerada utilizando-se o programa TCS v. 1.18 (CLEMENT et al., 2000) implementado no pacote estatístico NCPA (PANCHAL, 2007). Este programa estima a relação entre os haplótipos através do método da parcimônia estatística e os agrupamentos são realizados a partir das mutações contidas nas seqüências. Foi realizada a partir da rede de haplótipos gerada com todas as localidades amostradas uma análise filogeográficas estatísticas, a “*Nested Clade Analysis*” (NCA) - designada atualmente “*Nested Clade Phylogeographical Analysis*” (NCPA) - a fim de uma análise da distribuição espacial da variabilidade genética (TEMPLETON, 2004; TEMPLETON, 1998; TEMPLETON et al., 1995), pois a NCPA testa a associação geográfica dos haplótipos levando em consideração a informação genealógica; e mais importante pode discriminar entre associações filogeográficas devido os efeitos recorrentes, mas restritos de fluxo gênico versus os eventos históricos (como fragmentação, colonização ou eventos de expansão) (TEMPLETON, 1998). As informações sobre os agrupamentos, tamanho das amostras e a localização geográfica de cada clado foram testadas através do teste exato de contingência de permutação incrementado no programa Geodis 2.6 (POSADA et al., 2000). Para a realização desta análise, as coordenadas geográficas de cada população foram utilizadas no cálculo de dois parâmetros principais: a distância do clado (D_c – “*clade distance*”, que mede a distribuição geográfica de determinado clado) e a distância do clado “aninhado” (D_n – “*nested clade distance*”, que mede como um clado está

geograficamente distribuído em relação aos outros clados no mesmo nível). Valores significativos do teste exato de contingência implicam na rejeição da hipótese nula de não associação geográfica entre os haplótipos, uma interpretação biológica através de chave de inferência publicada por Templeton (2004) permitiu testar a hipótese estatística gerada.

Árvores filogenéticas permitem inferir relações evolutivas entre as espécies. O programa MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004) foi utilizado para gerar a árvore de Neighbor-Joining dos haplótipos encontrados, utilizando 5000 “*bootstrap*” de repetições e o modelo de Kimura. Foram utilizadas três espécies como grupo externo, *Ardea novaehollandiae* (NC 008551) e *Egretta eulophotes* (NC 009736) cujas seqüências completas do DNAmít estão depositadas no banco de dados do NCBI, já as seqüência para *Bubulcus ibis* foram obtidas no grupo de trabalho do Laboratório Genética de Aves a partir do par de oligonucleotídeos Ardea L3 e Ardea H1 desenvolvidos.

5 Resultados

5.1 Extração de DNA

O DNA de todas as amostras obtidas durante a coleta de 2008 e parte das obtidas na coleta de 2007 foi extraído e quantificado com sucesso, como mostrado na figura 10. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para 40ng/μl e o estoque armazenado no banco de DNA do Laboratório de Genética de Aves (DGE – UFSCar).

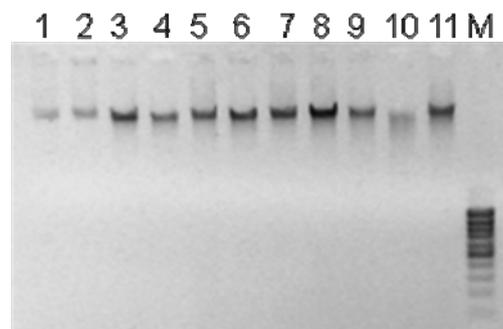


Figura 10: Fotografia de um gel de agarose 1%, mostrando a quantificação do DNA extraído de sangue. M: Marcador de massa molecular (DNA Mass Ladder, Fermentas).

5.2 Sexagem molecular

A amplificação de íntrons de tamanhos diferentes nos cromossomos sexuais Z e W, usando os iniciadores P₂ e P₈ descritos por Griffiths e cols. (1998) foi bem-sucedida, como se pode observar na figura 11. Apenas não foi possível a amplificação de uma amostra de pena do Amapá. O tamanho do fragmento observado para o cromossomo Z foi de 390pb e para o W de 396pb, sendo observado na fêmea, o sexo heterogamético, duas bandas e nas amostras dos machos uma única banda.

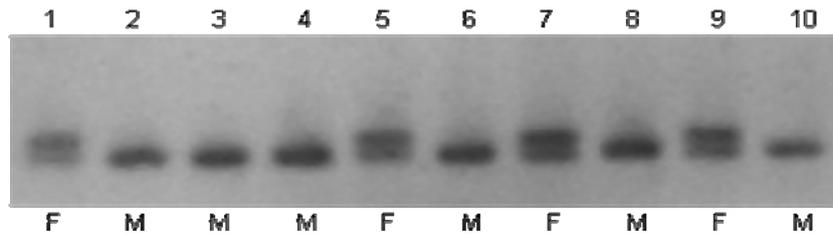


Figura 11: Fotografia de um gel de agarose 3%, mostrando os fragmentos de amplificação de marcadores sexo-específicos. Linhas 1, 5, 7 e 9, fêmeas (F) e linhas 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 10, machos (M).

Após a sexagem das amostras analisadas, obteve-se a proporção de machos (105) e fêmeas (88) mostrada na tabela 2. Os desvios na razão sexual das colônias não foram significativos.

Tabela 2: Sexagem realizada nos indivíduos de *A. alba egretta*.

Populações	Machos	Fêmeas	Razão Sexual		Valor de p
			Observado	Esperado	
Barra do Ribeira	8	11	0,42	0,50	0,8707
Santa Maria	10	10	0,50	0,50	-
Serrinha	14	6	0,70	0,50	0,3329
Mariante	8	12	0,40	0,50	0,7506
Pântano Grande	12	5	0,70	0,50	0,3809
Total Região Sul	52	44	0,54	0,50	0,6647
Tucum	5	5	0,50	0,50	-
Porto da Fazenda	10	12	0,45	0,50	1,0
Praialzinho	8	14	0,36	0,50	0,5427
Campo do Meio	4	1	0,80	0,50	0,7403
Presidente	1	-	1	0,50	-
Faz. Ipiranga	5	1	0,83	0,50	0,5403
Baía de Gaíva	4	1	0,80	0,50	0,7403
Total Região Pantanal	37	32	0,54	0,50	0,7983
Zôo Sorocaba	2	4	0,33	0,50	1,0
Santos-Cubatão	3	4	0,42	0,50	0,7887
Total Região São Paulo	5	8	0,38	0,50	0,8435
Se Cria	4	1	0,80	0,50	0,7403
Macacoari	2	-	1	0,50	-
Cidade do Amapá	5	1	0,83	0,50	0,5403
Total Região Amapá	6	1	0,85	0,50	0,3907
Total	105	88	0,54	0,50	0,4447

$p = 0,05$

5.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para o Domínio I da região controladora

Como relatado na seção Materiais e Métodos, os oligonucleotídeos iniciadores para a região controladora de *A. alba egretta* não tinham sido descritos anteriormente. A estratégia para amplificação inicial utilizada no presente trabalho foi baseada no uso do iniciador L16525 descrito por Sorenson e cols. (1999), localizado na porção do DNAmít denominada ND6 (NADH desidrogenase 6) e do uso do iniciador HCSB-1 descrito por Lopes e cols. (2006), localizado entre o segundo e o terceiro domínios da região controladora, numa região conservada na maioria das espécies de aves. Outra combinação com oligonucleotídeos iniciadores também foi testada, L16206 + HCSB-1, mas apresentou muitas bandas inespecíficas e baixo rendimento, sendo o uso desse conjunto descartado.

Sete indivíduos foram amplificados com o conjunto L16525 + HCSB-1 e foi obtido um fragmento de um pouco mais que 1000 pb, com tamanho aproximado ao encontrado em outra espécie da mesma ordem, a espécie *P. ajaja*, usada como controle. Para eliminar as bandas inespecíficas que poderiam atrapalhar o seqüenciamento, a banda do fragmento candidato foi eluída do gel de agarose 2%, utilizando GFXTM PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) (Figura 12). Após sua eluição, este DNA foi submetido a uma nova reação de PCR, utilizando-se o mesmo protocolo apenas com uma modificação no volume de DNA que passou a ser de 160ng e uma modificação na temperatura de hibridação no programa do termociclador, sendo a temperatura de 52 °C diminuída 0,1°C a cada ciclo, até a temperatura de 49,9 °C.

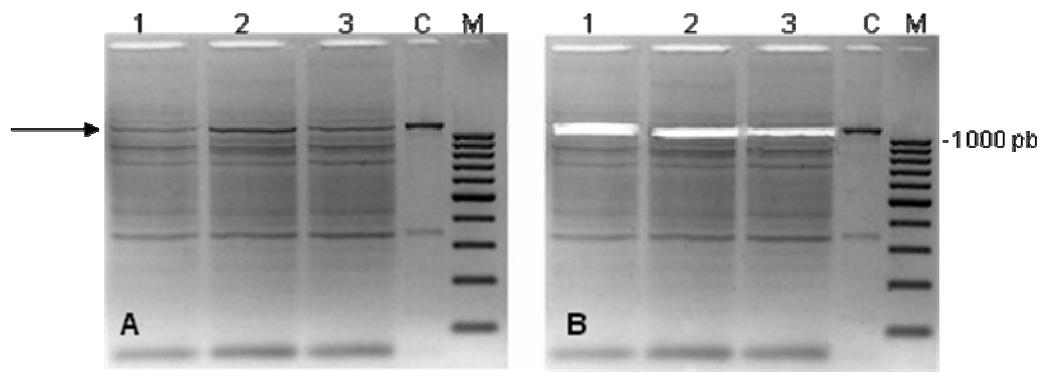


Figura 12: Fotografia de dois géis de agarose, mostrando: A- Amplificação de três indivíduos de *A. alba* utilizando os iniciadores L16525 e HCSB-1, B- Retirada do fragmento desejado de aproximadamente 1.000 pb. c = *Platalea ajaja*; M: Marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas).

Os produtos da reação de PCR referentes a sete indivíduos foram purificados e usados como molde nas reações de seqüenciamento, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores L16525 e HCSB-1.

Os eletroferogramas foram avaliados e depois de se chegar ao consenso de cada seqüência pela comparação entre as seqüências “*forward*” e “*reverse*”, foi realizado o alinhamento entre as sete seqüências. Observou-se que a qualidade das seqüências obtidas utilizando-se o iniciador L16525 foi significativamente inferior à das seqüências obtidas com o iniciador HCSB-1, localizado numa região mais conservada. A média do tamanho do fragmento obtido foi de 700 pb e para a confirmação de que este fragmento realmente pertencia à região controladora foi realizado um “*blast*” (cruzamento de informações), usando-se o programa Blastn do banco público de dados de seqüências NCBI. Essa análise revelou que as seqüências obtidas no presente trabalho apresentavam grande similaridade com a região controladora de outras espécies de aves.

Após confirmação de que a região seqüenciada pertencia à região de interesse do estudo, foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos. Inicialmente foram definidos quatro oligonucleotídeos espécie-específicos, dois para a cadeia L (Ardea L1 e Ardea L2) e dois para cadeia H (Ardea H1 e Ardea H2) (Figura 13). Pela combinação desses

oligonucleotídeos esperava-se obter fragmentos de aproximadamente: 503 pb, 468 pb, 456 pb e 421 pb.

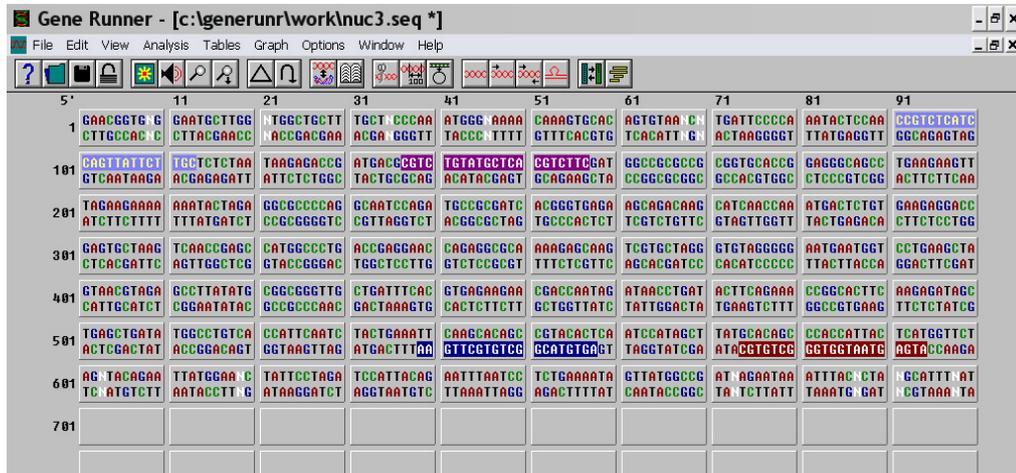


Figura 13: Janela de interface do programa Gene Runner 3.05 (Copyright © 1994) mostrando uma das seqüências de *Ardea alba* e os oligonucleotídeos espécie-específicos desenhados neste trabalho (destacados em lilás = H2, roxo = H1, azul = L1 e vermelho = L2).

Todas as combinações dos iniciadores desenhados apresentaram ampliações satisfatórias quanto à qualidade e rendimento, e os fragmentos obtidos apresentaram tamanhos esperados e bandas únicas nos géis de agarose. O par de iniciadores *Ardea* L2 e *Ardea* H2 foi escolhido, pois sua utilização resultava na obtenção de um fragmento maior, com o tamanho aproximado ao esperado de 500 pb (Figura 14).

Foram selecionados para esta etapa 27 indivíduos, sendo 12 do Rio Grande do Sul, 11 do Pantanal, dois do Amapá e dois indivíduos do Zoológico de Sorocaba. Após a confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram seqüenciados.

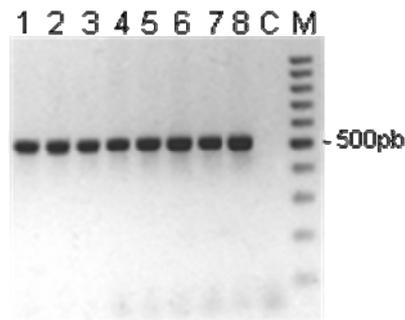


Figura 14: Fotografia de um gel de agarose 2%, mostrando os fragmentos de amplificação de oito indivíduos de *A. alba egretta*. C: controle negativo, sem DNA; M: Marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas).

O seqüenciamento dos 27 indivíduos resultou na obtenção de um fragmento de 485 pb que apresentou ótima qualidade nos eletroferogramas, com picos perfeitos e de ótima leitura. Não foi encontrada variação em aproximadamente 400 pb desse fragmento, sendo detectadas apenas seis substituições em 24 amostras.

Considerando que esse nível de variação não permitia a análise filogeográfica, foram seqüenciados cinco indivíduos utilizando-se os iniciadores L16525 e HCSB-1 que resultou na obtenção de um fragmento de aproximadamente 900 pb. Quando esse conjunto de iniciadores foi novamente utilizado, a cadeia L apresentou uma leitura de melhor qualidade do que tinha apresentado na primeira tentativa de seqüenciamento, mas ainda bem inferior à qualidade dos picos dos eletroferogramas encontrados nas seqüências a partir do iniciador HCSB-1. Além destas amostras, foram seqüenciados mais 15 indivíduos de todas as colônias amostradas do Rio Grande do Sul, utilizando-se ainda os iniciadores Ardea L2 e Ardea H2, para a confirmação da ausência de variação nesta região.

Após a análise manual das seqüências dos 39 indivíduos e o alinhamento ficou confirmado que a variação no fragmento obtido por amplificação com o par de iniciadores Ardea L2 e Ardea H2 era muito baixa para a análise intraespecífica pretendida neste estudo.

Dois novos oligonucleotídeos foram desenhados, um deles na fita H, visando diminuir a amplificação da região conservada próxima ao Domínio II (Ardea H3), e outro na fita L

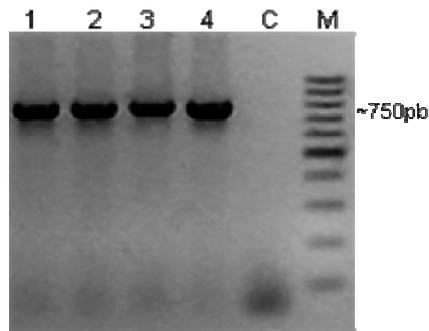


Figura 16: Fotografia de um gel de agarose 2% mostrando o fragmento de 750 pb amplificado com o conjunto de iniciadores Ardea L3 e Ardea H1 em quatro indivíduos de *A. alba egretta*. C: controle negativo sem DNA; M: Marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Fermentas).

5.4 Validação do uso do fragmento amplificado da região controladora

Foi realizado um alinhamento com a sobreposição de todos os fragmentos amplificados com os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados (L16525+HCSB-1; Ardea L2 e Ardea H2; Ardea L3 e Ardea H1). O tamanho do fragmento total obtido (900pb) é alto para se supor que teria sido incorporado ao DNA nuclear (RICHLY; LEISTER, 2004) logo, concluiu-se que as amplificações obtidas não corresponderiam a um NUMT e sim ao DNAmít. Além disso, verificou-se que seria improvável uma amplificação de NUMTs, pois o uso dos oligonucleotídeos espécie-específicos resultava na amplificação de um fragmento total de 660 pb, incluindo o RNA^t^{Glu} que flanqueia o Domínio I e parte do gene ND6. Nas seqüências analisadas, a presença do códon de iniciação ATG (Met) do ND6 foi verificada antes do início do RNA^t^{Glu}. A figura 17 ilustra o alinhamento da região do RNA^t^{Glu} entre as espécies *A. alba egretta* e *A. novaehollandiae*, revelando a homologia entre elas e o códon iniciador do ND6.

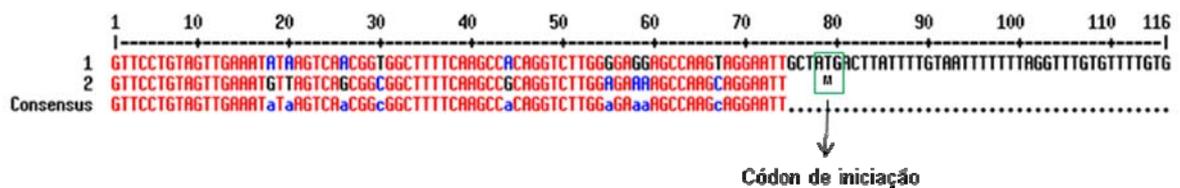


Figura 17: Alinhamento entre as seqüências do RNA^t^{Glu} de *A. alba egretta* (1) e de *A. novaehollandiae* (2), vermelho: forte homologia (acima de 90%), azul: fraca homologia (abaixo de 50%) e preto: diferenças entre as seqüências; Destaque para o códon de iniciação ATG (Met) do gene ND6. Fita do DNA molde para o gene ND6

(sentido 5'-3', cadeia H). Para melhor visualização da figura, apenas um indivíduo de *A. alba egretta* foi utilizado no alinhamento.

A realização do “blast” no Blastn (NCBI) revelou que as seqüências obtidas com o conjunto Ardea L3 e Ardea H1 (selecionados para esse estudo) mostraram valores altos de similaridade com a região controladora de outras espécies de aves. Para espécies da mesma família a similaridade foi de 87% para *Egretta eulophotes* e 84% para *Ardea novaehollandiae* (ambas apresentam o genoma mitocondrial completo seqüenciado), e de 90% para a espécie *Egretta rufescens* cuja seqüência depositada no NCBI se refere apenas à região controladora. Nas espécies da mesma ordem dos Ciconiiformes foram encontradas similaridades de 79% para *Nipponia nippon* e 88% para *Ciconia boyciana*. Para espécies de outras ordens foram encontradas: em Pelicaniformes (*Sula dactylatra* 86%), em Procellariiformes (*Oceanodroma castro* 82%) e Gaviiformes (*Gavia stellata* 79%).

A composição das bases nitrogenadas em valores relativos foram C: 25,70%, T: 30,04%, A: 24,32% e G: 19,95%. A tabela 3 compara a proporções encontradas nesse estudo com as de outras espécies de Aves para esta região (Dom I) do DNAmít.

Tabela 3: Proporções de bases nitrogenadas no fragmento da região controle (Domínio I).

Espécie	C%	T%	A%	G%	Referência
<i>A. alba egretta</i>	25,70	30,04	24,32	19,95	Presente estudo
<i>Mycteria americana</i>	29,67	27,13	30,63	12,57	Avelar, 2008
<i>Platalea ajaja</i>	21,12	18,14	32,90	27,84	Santos et al., 2008
<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	25,00	31,00	27,70	16,30	Cabanne et al., 2007
Média de 9 espécies	31,37	25,27	28,68	14,69	Baker; Marshall, 1997

5.5 Diversidade Genética

As análises foram baseadas num fragmento de 586 pb da região controladora do DNAmít. Cinquenta e oito sítios polimórficos foram encontrados no conjunto das seqüências analisadas, definindo 74 haplótipos entre os 194 indivíduos analisados, provenientes das colônias do Rio Grande do Sul, Pantanal, São Paulo e Amapá. Foram observadas 56

substituições, sendo sete transversões, 49 transições e duas inserções/deleções (*indels*). A razão entre transições e transversões foi de 7, um índice que está dentro da faixa esperada para valores relatados para outras espécies aves (BAKER; MARSHALL, 1997).

O haplótipo de maior frequência foi o Hap9, seguido pelo Hap7, Hap14, Hap27, Hap8 e Hap15. A maioria dos haplótipos apresenta baixas frequências com apenas um ou dois indivíduos (Tabela 4). A elevada frequência do haplótipo Hap9 sugere que ele seja o mais ancestral. As amostras analisadas do Pantanal e Rio Grande do Sul apresentaram 25 haplótipos exclusivos cada, São Paulo apresentou cinco haplótipos exclusivos e Amapá oito. A tabela 5 mostra a distribuição destes haplótipos nas colônias amostradas, segundo as regiões do país.

Tabela 5: Distribuição dos haplótipos nas colônias amostradas das quatro regiões do Brasil.

Regiões Hap.	Rio Grande do Sul					Pantanal							S. Paulo		Amapá			Total
	BR	SM	SR	MA	PG	TU	PF	PZ	CM	PR	BG	FI	ZS	SC	SE	MC	PA	
Hap1	1	1		1					1									4
Hap2	1																	1
Hap3	2																	2
Hap4	1																	1
Hap5	1																	1
Hap6	1																	1
Hap7	1	2	1		1			4										9
Hap8	2	1	2					1				1						7
Hap9	5	5	8	7	10	1	7	4	1		2	2		4				56
Hap10	1																	1
Hap11	1																	1
Hap12	1																	1
Hap13	1																	1
Hap14		1		1	2	1	1	2										8
Hap15		1	1		1		2	1				1						7
Hap16		1	1					1										3
Hap17		1				1						1			1			4
Hap18		1																1
Hap19		1																1
Hap20		1																1
Hap21		1	2														1	3
Hap22		1																1
Hap23		1		1									1					3
Hap24		1						1										2
Hap25			1															1
Hap26			2															2
Hap27			1	2	2	1					1					1		8
Hap28			1															1
Hap29				1														1
Hap30				1														1
Hap31				1				1										2
Hap32				1														1
Hap33				2														2
Hap34				1														1
Hap35				1				2	1				1					5
Hap36					1													1
Hap37						1												1
Hap38						1	1											2
Hap39						1												1
Hap40						1												1
Hap41						1												1
Hap42						1												1
Hap43								1										1
Hap44								1										1
Hap45								1										1
Hap46								1										1
Hap47								2										2
Hap48								1										1
Hap49								1	2									3
Hap50									1									1
Hap51									1									1
Hap52									1									1
Hap53									1									1
Hap54									1									1
Hap55									1									1
Hap56										1								1
Hap57										1								1
Hap58											1							1
Hap59												1						1
Hap60												1						1
Hap61													1					1
Hap62															1			1

Regiões	Rio Grande do Sul					Pantanal							S. Paulo		Amapá			Total
Hap.	BR	SM	SR	MA	PG	TU	PF	PZ	CM	PR	BG	FI	ZS	SC	SE	MC	PA	Total
Hap63															1			1
Hap64															1			1
Hap65															1		3	4
Hap66																1		1
Hap67																	1	1
Hap68																	1	1
Hap69																	1	1
Hap70													1					1
Hap71													1					1
Hap72													1					1
Hap73													1					1
Hap74														3				3
Total	19	20	20	20	17	10	22	22	5	1	5	6	6	7	5	2	7	194

As estimativas de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) (NEI, 1987) foram realizadas de duas formas: agrupando-se todos os indivíduos para avaliar a diversidade de cada região e numa análise subpopulacional em que os indivíduos foram agrupados segundo suas respectivas colônias (Tabela 6).

Tabela 6: Diversidade genética nas colônias de *A. alba egretta* em quatro regiões brasileiras

Colônias	Nº Ind.	Nº Haplótipos	Nº Sít. Polimórficos	<i>h</i>	π
Rio Grande do Sul	96	36	36	0,8586 +/-0,0335	0,005325 +/-0,003087
BR	19	13	21	0,9298 +/-0,0466	0,006738 +/-0,003945
SM	20	15	17	0,9421 +/-0,0432	0,005479 +/-0,003297
SR	20	10	12	0,8368 +/-0,0757	0,003221 +/-0,002144
MA	20	12	17	0,8789 +/-0,0654	0,006469 +/-0,003798
PG	17	6	9	0,6544 +/-0,1223	0,004424 +/-0,002789
Pantanal	71	37	38	0,9336 +/-0,0221	0,006586 +/-0,003711
TU	10	10	18	1,0000 +/-0,0447	0,008851 +/-0,005294
PF	22	13	18	0,8961 +/-0,0550	0,005260 +/-0,003170
PZ	22	14	22	0,9394 +/-0,0325	0,007119 +/-0,004105
CM	5	5	9	1,0000 +/-0,1265	0,006496 +/-0,004585
PR*	1	1	0	-	-
BG	5	4	7	0,9000 +/-0,1610	0,006154 +/-0,004376
FI	6	5	9	0,9333 +/-0,1217	0,006268 +/-0,004254
São Paulo	13	8	14	0,8846 +/-0,0699	0,005479 +/-0,003399
ZS	6	6	13	1,0000 +/-0,0962	0,008775 +/-0,005715
SC	7	2	2	0,5714 +/-0,1195	0,001954 +/-0,001636
Amapá	14	11	16	0,9341 +/-0,0611	0,008246 +/-0,004807
SE	5	5	11	1,0000 +/-0,1265	0,008547 +/-0,005839
MC*	2	2	8	1,0000 +/-0,5000	0,013675 +/-0,014505
PA	7	5	11	0,8571 +/-0,1371	0,008140 +/-0,005183
Total	194	74	58	0,9079 +/-0,0005	0,006098 +/-0,003443

Nº ind. = número de indivíduos amostrados; Nº hap. = número de haplótipos; Nº Sít. = número de sítios polimórficos, *h* = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. * = estas colônias não representam unidades populacionais, portanto suas diversidades foram consideradas apenas para o cálculo regional e total.

Verificou-se pelo teste estatístico t (amostras independentes) se as diferenças encontradas entre as diversidades haplotípicas e nucleotídicas das colônias eram significativas ou não, considerando-se primeiramente todas as colônias dentro de cada região, e depois as diversidades das regiões foram comparadas entre si. As diversidades haplotípicas das quatro regiões não diferiram significativamente entre si. Por outro lado, a diversidade nucleotídica apresentou diferenças significativas entre as colônias do Rio Grande do Sul e as do Amapá ($p=0,0380$).

Utilizando-se as diversidades nucleotídicas e as latitudes das populações realizou-se um teste de correlação para cada população amostrada. A reta de regressão traçada

demonstrou associação significativa entre os pontos amostrados e os índices de diversidade nucleotídica ($p= 0,0360$), como pode ser visto no gráfico (Figura 18).

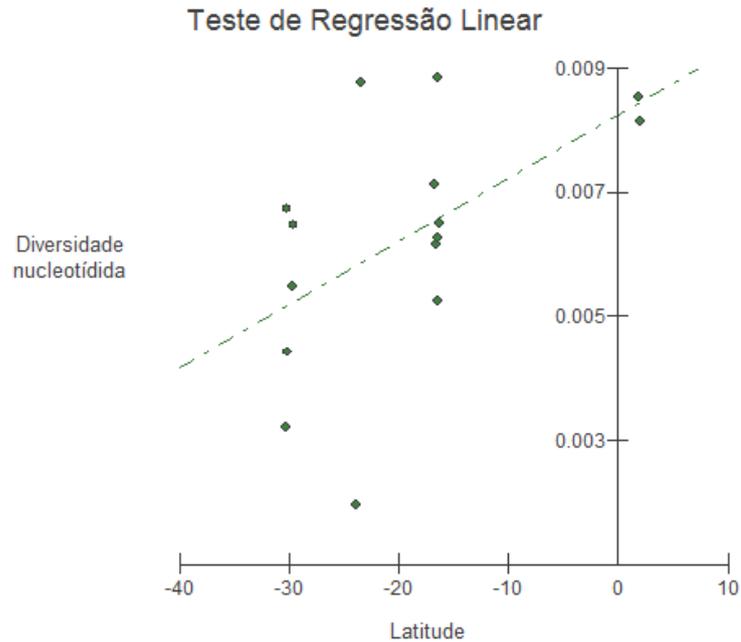


Figura 18: Regressão linear da diversidade nucleotídica versus a latitude das colônias amostradas de *A. alba egretta*. $F = 5,3503$ ($p = 0,0360$); $R^2 = 23,71\%$.

5.6 Estruturação populacional

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para avaliação da distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações estão apresentados na tabela 7. Este resultado indica que a maior parte da variação genética está contida dentro das populações e corresponde a 97,13%, sendo verificada diferenciação genética significativa entre as populações das diversas regiões (F_{ct}) ($p= 0,0033$).

Tabela 7: Resultados da AMOVA global.

Fonte de variação	G.L	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação
Entre as populações das regiões (RSxPanxSPxAmapá)	3	10,010	0,0382	2,14
Fct = 0,02145; p = 0,03324*				
Entre as colônias das diversas regiões (colônias Rscolônias PanxcolôniasSPxcolôniasAmapá)	11	20,864	0,01289	0,72
Fsc = 0,00739; p = 0,34018				
Dentre os indivíduos das colônias (colôniasxcolônias)	176	304,435	172,974	97,13
Fst = 0,02868; p = 0,05572				
Total	190	335,309	170,921	

G. L. = grau de liberdade; * $p = 0,05$

Foram excluídos dessas análises o indivíduo amostrado na colônia Presidente do Pantanal e os dois indivíduos amostrados em Macacoari, no Amapá, pois essas amostras não representavam unidades populacionais.

A análise de *Fst* par-a-par revelou baixa estruturação entre as colônias, a tabela 8 mostra os resultados obtidos. Os *Fsts* significativos para alguns pares de amostras podem estar enviesados devido ao baixo número de indivíduos amostrados/colônia. Por exemplo, a colônia Santos-Cubatão foi amostrada com sete indivíduos e foram encontrados apenas dois haplótipos, esta diversidade encontrada pode não ser representativa da população real.

Nas comparações de *Fst* par-a-par foram detectados dois *Fsts* significativos (SR x MA e SR x PG) entre os dez calculados para as colônias do Rio Grande do Sul. Para a região do Pantanal, nenhum dos *Fsts* par-a-par foi significativo entre os 15 calculados para a região, assim como para o Amapá que não apresentou nenhum *Fst* significativo entre suas colônias. A única comparação entre as duas colônias de São Paulo foi significativa (ZS x SC), mas este resultado pode ser devido à amostragem inadequada da colônia de Santos-Cubatão. Enfim o

que se concluiu com o padrão observado é que não existe estruturação intra-regional para as populações dessa espécie, pois as colônias devem trocar integrantes entre os diversos sítios reprodutivos de uma região.

Tabela 8: Matriz de significância do *Fst* par-a-par. Diagonal inferior valores do *Fst*; diagonal superior valores de *p* significativos.

	BR	SM	SR	MA	PG	TU	PF	PZ	CM	BG	FI	ZS	SC	SE	PA
BR	-														
SM	-0,02149	-											0,00901**		0,00901**
SR	0,01982	0,01073	-	0,00901**	0,01802**					0,00000**		0,00901**	0,01802**	0,01802**	0,00000**
MA	0,00217	0,00643	0,11014	-									0,01802**		
PG	-0,01613	-0,01505	0,06573	-0,03203	-										
TU	-0,01170	-0,01672	0,09926	-0,04055	-0,02691	-							0,02703*		
PF	0,01714	0,00840	0,04173	0,04578	0,0132	0,01732	-						0,00901**		0,00000**
PZ	-0,00742	-0,01839	0,03895	-0,01571	-0,03071	-0,04393	0,00696	-					0,03604*		
CM	-0,03551	-0,03084	0,08569	0,00503	0,02089	-0,04005	-0,02381	-0,01636	-						
BG	-0,02424	0,04798	0,19006	-0,04937	-0,02429	-0,03847	0,08671	-0,01366	0,05612	-					
FI	-0,05365	-0,04013	0,10556	-0,07611	-0,06529	-0,08827	0,01271	-0,05706	-0,0461	-0,07952	-		0,01802**		
ZS	-0,00881	-0,01549	0,10652	-0,00663	0,02357	-0,04532	-0,0026	-0,01343	-0,09432	-0,00642	-0,08493	-	0,03604*		
SC	0,06179	0,09800	0,09506	0,13740	0,12543	0,13014	0,10043	0,09097	0,17542	0,17428	0,18184	0,13497	-	0,01802**	0,00901**
SE	-0,02606	-0,00721	0,15403	-0,06588	-0,01283	-0,10301	0,03226	-0,05034	-0,04762	-0,08586	-0,12561	-0,10991	0,17357	-	
PA	0,11597	0,16680	0,34779	0,04316	0,12287	0,00692	0,21421	0,07455	0,14082	-0,05331	0,02928	0,08567	0,34242	-0,05966	-

Significância dos valores de * $p = 0,05$; ** $p = 0,01$

Siglas das colônias: BR- Barra do Ribeira; SM- Santa Maria; SR- Serrinha; MA- Mariante; PG- Pântano Grande; TU- Tucum; PF- Porto da Fazenda; PZ- Praialzinho; CM- Campo do Meio; BG- Baía de Gaíva, FI- Fazenda Ipiranga; ZS- Zoológico de Sorrocaba; SC- Santos-Cubatão; SE- Se Cria; PA- Cidade do Amapá.

Considerando cada região como uma população, foi avaliada a estruturação genética entre as quatro regiões pelos valores de *Fst* par-a-par apresentados na tabela 9. Fica evidente nessa tabela que a composição genética do Amapá se diferencia das demais regiões estudadas. Esse resultado detalha a diferenciação encontrada pelo *Fct* na AMOVA global, demonstrando que a diferenciação encontrada na análise anterior se deve à população do norte do país.

Tabela 9: Matriz de significância do *Fst* par-a-par para as quatro regiões. Diagonal inferior valores do *Fst*; diagonal superior valores de *p* significativos.

	Rio Grande do Sul	Pantanal	Amapá	São Paulo
Rio Grande do Sul	-		0,00901**	
Pantanal	0,00187	-	0,01802**	
Amapá	0,10921	0,06238	-	0,00901**
São Paulo	0,01775	0,01882	0,12528	-

Significância dos valores de **p* = 0,05; ***p* = 0,01

Diante deste resultado foram realizadas análises de estruturação agrupando as populações do Rio Grande do Sul, Pantanal e São Paulo em uma única população e comparando a população do Amapá. Como pode ser verificado na tabela 10 da AMOVA e já demonstrado na análise anterior a maior parte da variação genética está contida dentro das populações. A análise de *Fst* confirma a diferenciação observada entre o Amapá e as demais localidades amostradas (Tabela 11).

Tabela 10: Resultados da AMOVA.

Fonte de variação	G.L	Soma dos quadrados	Componente de variação	% de variação
Entre as populações (RS+Pan+SPxAmapá)	1	6,519	0,18310	9,41
Dentre os ind. das populações (RS+Pan+SP+Amapá)	192	338,290	1,73193	97,13
Total	193	344,809	1,94503	

***Fst* = 0,09414; *p* = 0,00293**

G. L. = grau de liberdade; * *p* = 0,05

Tabela 11: Matriz de significância do F_{st} par-a-par duas populações. Diagonal inferior valor do F_{st} ; diagonal superior valore de p significativo.

	RS+PAN+SP	Amapá
RS+PAN+SP	-	0,00901*
Amapá	0,09414	-

* $p = 0,05$

5.7 Histórico demográfico

5.7.1 Testes de Classe I e II

Os resultados de estruturação populacional revelaram uma baixa subdivisão populacional regional, justificando o agrupamento de todas as colônias de cada região nas análises do histórico demográfico. Essas análises nos permitiram identificar alguns padrões na escala macro-regional. Apesar da ausência de estruturação entre as populações do Rio Grande do Sul, Pantanal e São Paulo, segundo propõem-se para o período glacial estas regiões foram afetadas diferentemente, portanto analisando as populações separadamente permite verificar como cada população de latitude diferente comportou-se.

Os resultados dos testes de neutralidade, F_s de Fu (FU, 1997), D de Tajima (TAJIMA, 1989), F^* e D^* de Fu e Li (FU; LI, 1993) e a estatística R_2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002) estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Testes de Classe I e II para as quatro regiões.

Teste	Rio Grande do Sul	Pantanal	São Paulo	Amapá
F_s	-26,31538**	-25,97601**	-2,01060	-4,01852*
D	-1,69154*	-1,58999*	-1,20148	-0,16884
F^*	-3,36870**	-2,93076**	-1,16188	-0,42289
D^*	-3,53750**	-2,97680**	-0,95172	-0,44318
R_2	0,0407**	0,0471**	0,0924	0,1235

Significância dos valores de * $p = 0.05$ e ** $p = 0,01$ (Correção de Bonferroni)

5.7.2 Testes Classe III

Os resultados da “*mismatch distribution*”, distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas (ROGERS; HARPENDING, 1992), revelaram padrões unimodais para as três regiões estudadas: Rio Grande do Sul, Pantanal e Amapá. Apenas a amostra de São Paulo apresentou-se com uma distribuição multimodal (Figura 19).

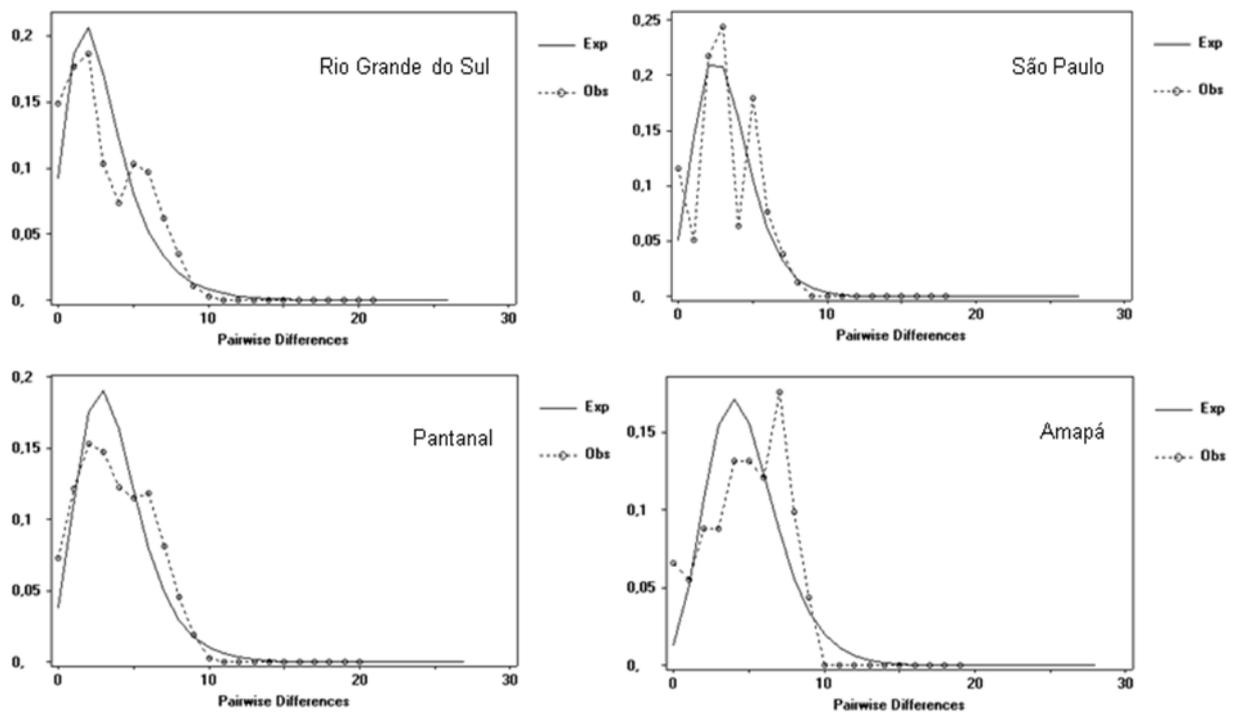


Figura 19: Gráficos da “*mismatch distribution*” para Rio Grande do Sul, Pantanal, São Paulo e Amapá.

Para avaliar a significância das curvas da distribuição das diferenças pareadas foram estimados *SSD* e *Raggedness* (*rg*) que estão apresentados na tabela 13. Segundo a tabela abaixo, os valores de *p* para *SSD* não são significativos, indicando que as curvas observadas não diferiram significativamente do modelo de expansão populacional. O *Raggedness* (*rg*) testa a homogeneidade da curva e valores significativos, como os encontrados no Rio Grande do Sul, Pantanal e Amapá, são esperados para o modelo de crescimento populacional.

Tabela 13: Testes de Classe III: valores de *SSD* e de *Raggedness* (*r*) para as regiões do Rio Grande do Sul, Pantanal, São Paulo e Amapá.

Região	<i>SSD</i>	Valores de <i>p</i>	<i>R</i>	Valores de <i>p</i>
--------	------------	---------------------	----------	---------------------

Rio Grande do Sul	0,00527513	0,672	0,0121	0,007*
Pantanal	0,00216474	0,756	0,0077	0,002*
São Paulo	0,02552476	0,312	0,0909	0,389
Amapá	0,00498262	0,880	0,0171	0,005*

* $p = 0,05$

Parâmetros demográficos que descrevem a expansão populacional foram calculados a partir da “*mismatch distribution*”: estimativa do tempo de expansão (τ), e o tamanho da população antes (θ_0) e depois (θ_1) da expansão. Com o modelo de Rogers e Harpending (1992), foram calculados os possíveis tempos em anos desde a expansão para cada região. Como a região de São Paulo não tem sinais de expansão, este tempo não foi calculado para essa região (Tabela 14). Os valores obtidos para o Amapá são também considerados com reservas, pois os sinais de expansão nessa região são menores e a moda da “*mismatch distribution*” não se adere muito bem à curva esperada. Com os padrões dos tempos médios de expansão podemos supor que a população do Amapá é mais antiga que as demais.

Tabela 14: Parâmetros demográficos.

P α 0,05	Rio Grande do Sul	Pantanal	Amapá
T	0,660	2,936	6,299
θ_0	3,043	2,936	0,002
θ_1	44,795	16,553	19,197
Taxas de mutação			
2%	14.078	62.627	134.364
6%	4.692	20.875	44.788
10%	2.815	12.525	26.872
Tempo médio em anos	7.195	32.009	68.674

5.8 Rede haplotípica e *Nested Clade Phylogeographical Analyses* (NCPA)

A figura 20 apresenta a rede de haplótipos completa, gerada a partir dos dados de 194 indivíduos das quatro localidades. A presença de círculos menores, ligados aos haplótipos identificados corresponde a haplótipos “intermediários” ou não amostrados (“*0-step*”). Como

já verificado por sua frequência o Hap9 mostra-se como o mais basal e a partir dele outros haplótipos surgiram.

As redes de haplótipos das populações regionais: Rio Grande do Sul (Figura 21), Pantanal (Figura 22), São Paulo (Figura 23) e Amapá (Figura 24) revelaram um padrão em formato de estrela, com exceção do Amapá que não apresenta um padrão claro. As de mais redes apresentam um haplótipo com alta frequência e diversos outros haplótipos relacionado com baixas frequências, sugerindo expansão populacional. Nota-se que alguns haplótipos considerados não amostrados em algumas localidades foram “preenchidos” em outras, como por exemplo, o Hap9 que aparece como dado não amostrado no Amapá, mas a partir da rede de haplótipos completa pode ser identificado como “0-step”.

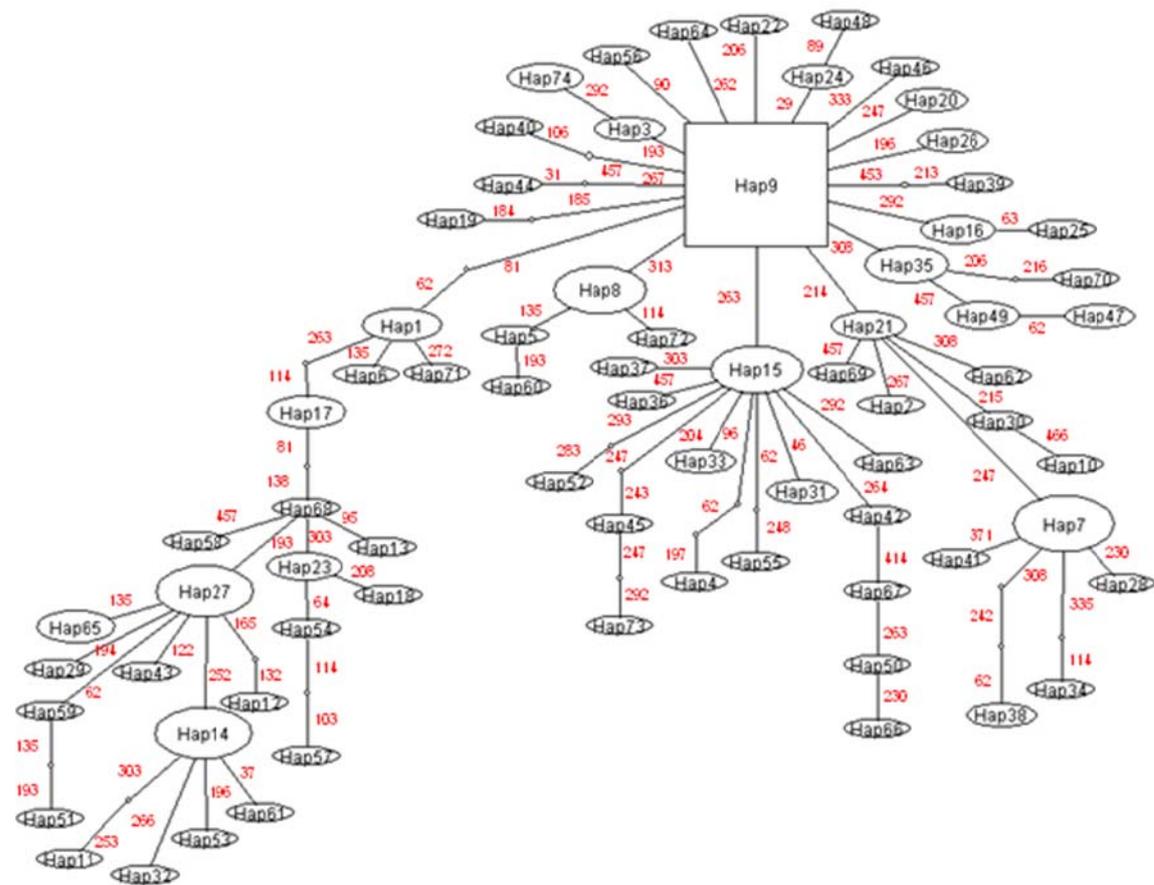


Figura 20: Rede de haplótipos completa incluindo as populações de *A. alba egretta* das quatro regiões brasileiras.

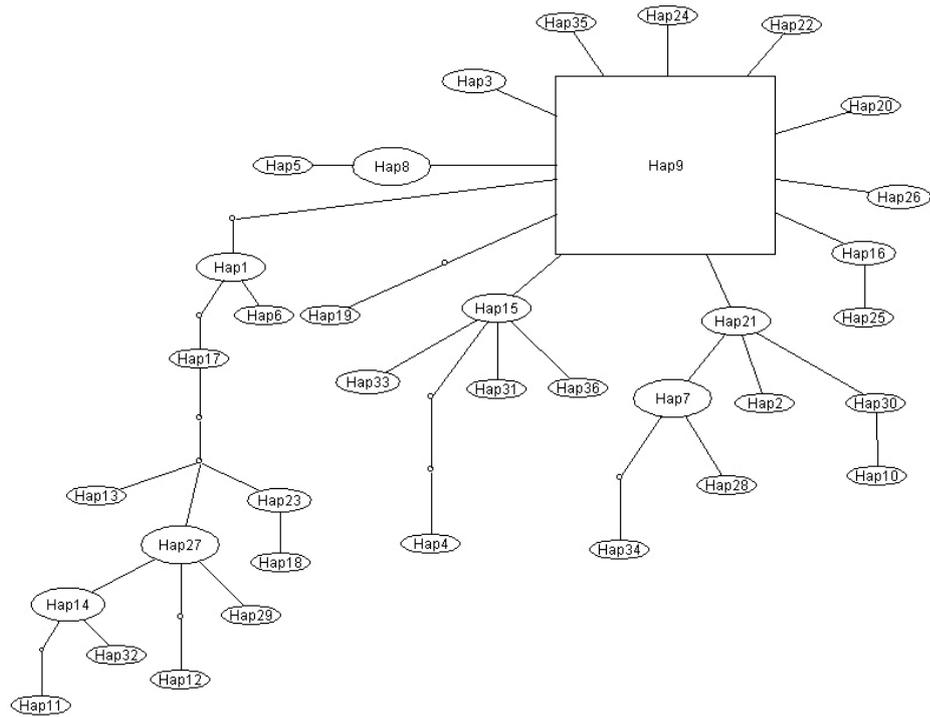


Figura 21: Rede de haplótipos observada para as amostras de *A. alba egretta* do Rio Grande do Sul.

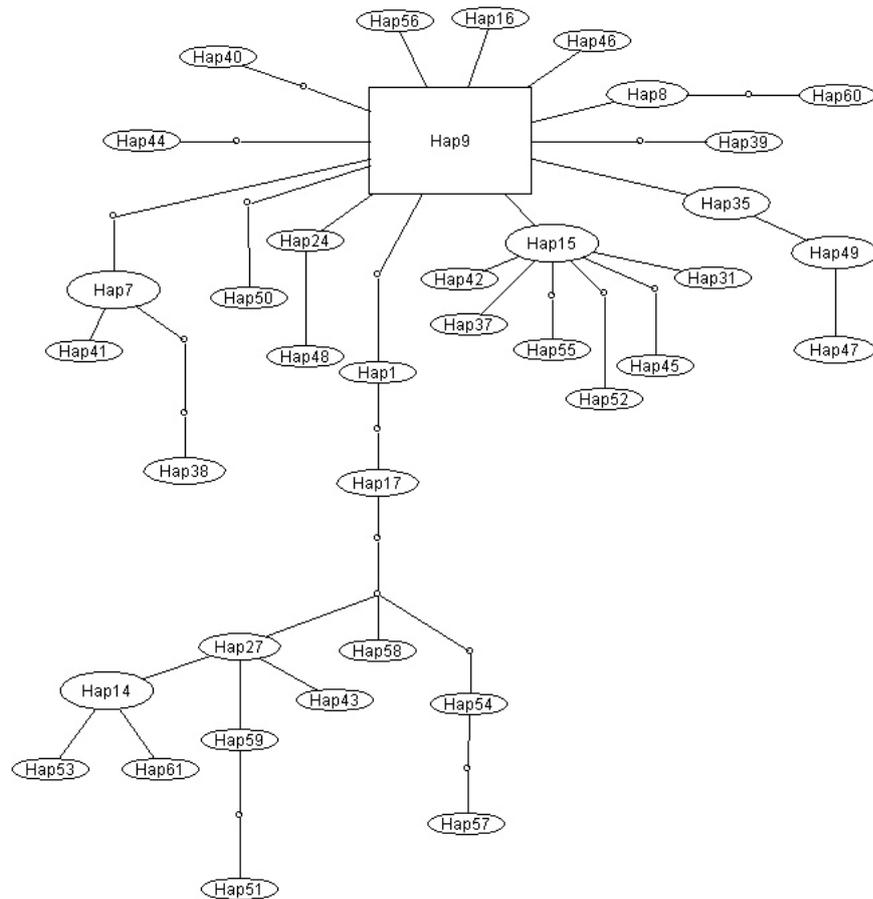


Figura 22: Rede de haplótipos observada para as amostras de *A. alba egretta* do Pantanal.

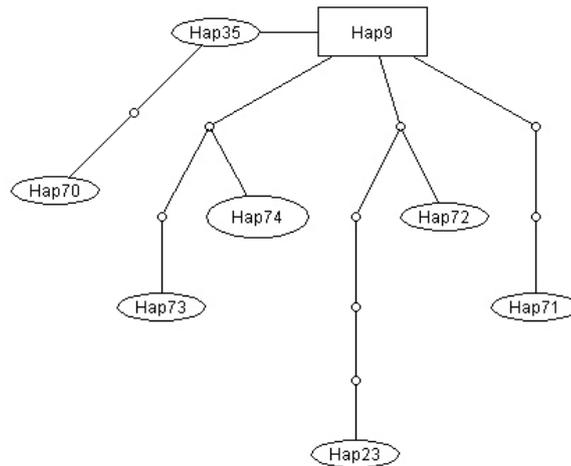


Figura 23: Rede de haplótipos observada para as amostras de *A. alba egretta* de São Paulo.

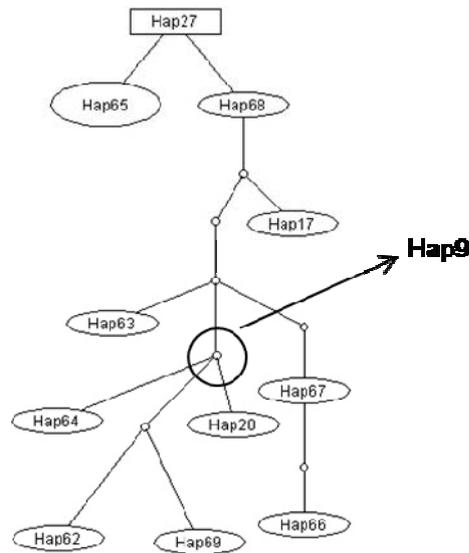


Figura 24: Rede de haplótipos observada para as amostras de *A. alba egretta* do Amapá.

A partir da rede de haplótipos do fragmento do Domínio I e dos agrupamentos utilizados na NCPA apresentados na figura 25, foram observados 36 clados em quatro níveis, incluindo o cladograma total. Associação significativa entre os clados e a distribuição geográfica foi observada em quatro clados (Tabela 15). Utilizando-se a chave de inferências, foram observados indicativos de expansão contínua para o clado 1.1. Os clados 1.31 e 3.2 os quais incluíam indivíduos apenas do Rio Grande do Sul, Pantanal e Amapá apresentaram

fluxo gênico restrito com isolamento por distância. Em apenas um dos clados (3.3) não foi possível obter resultado conclusivo, como apresentado na tabela 15.

Tabela 15: Teste exato de contingência do NCPA. Interpretação dos resultados significativos obtidos na NCPA dos dados apresentados na figura 25.

Clado	Qui-quadrado	Chave de inferências	Evento demográfico
1.1	54.3328 (p = 0.0100)	1 N, 2 N, 11 S e 12 N	Expansão Contínua
1.31	17.0625 (p = 0.0100)	1 N, 2 S, 3 N e 4 N	Fluxo Gênico Restrito com Isolamento por Distância
3.2	8.0385 (p = 0.0120)	1 N, 2 S, 3 N e 4 N	Fluxo Gênico Restrito com Isolamento por Distância
3.3	17.5885 (p = 0.0120)	1 N, 2 N, 11 N e 17 N	Resultado Inconclusivo

N = Não; S = Sim

5.9 Análise filogenética por Neighbour-joining (NJ)

Na construção da árvore filogenética com os 74 haplótipos encontrados foram utilizadas três espécies como grupo externo: *Bubulcus ibis*, *Ardea novaehollandiae* e *Egretta eulophotes*. Nenhum padrão filogeográfico foi associado à árvore traçada pelo método Neighbour-joining. A árvore com todos os haplótipos amostrados enraizou com “bootstrap” elevado para as espécies usadas como “outgroup”, evidenciando uma maior proximidade da *A. alba egretta* com *B. ibis*, corroborando o estudo filogenético realizado por Sheldon e cols. (2000) baseado no citocromo b (Figura 26).

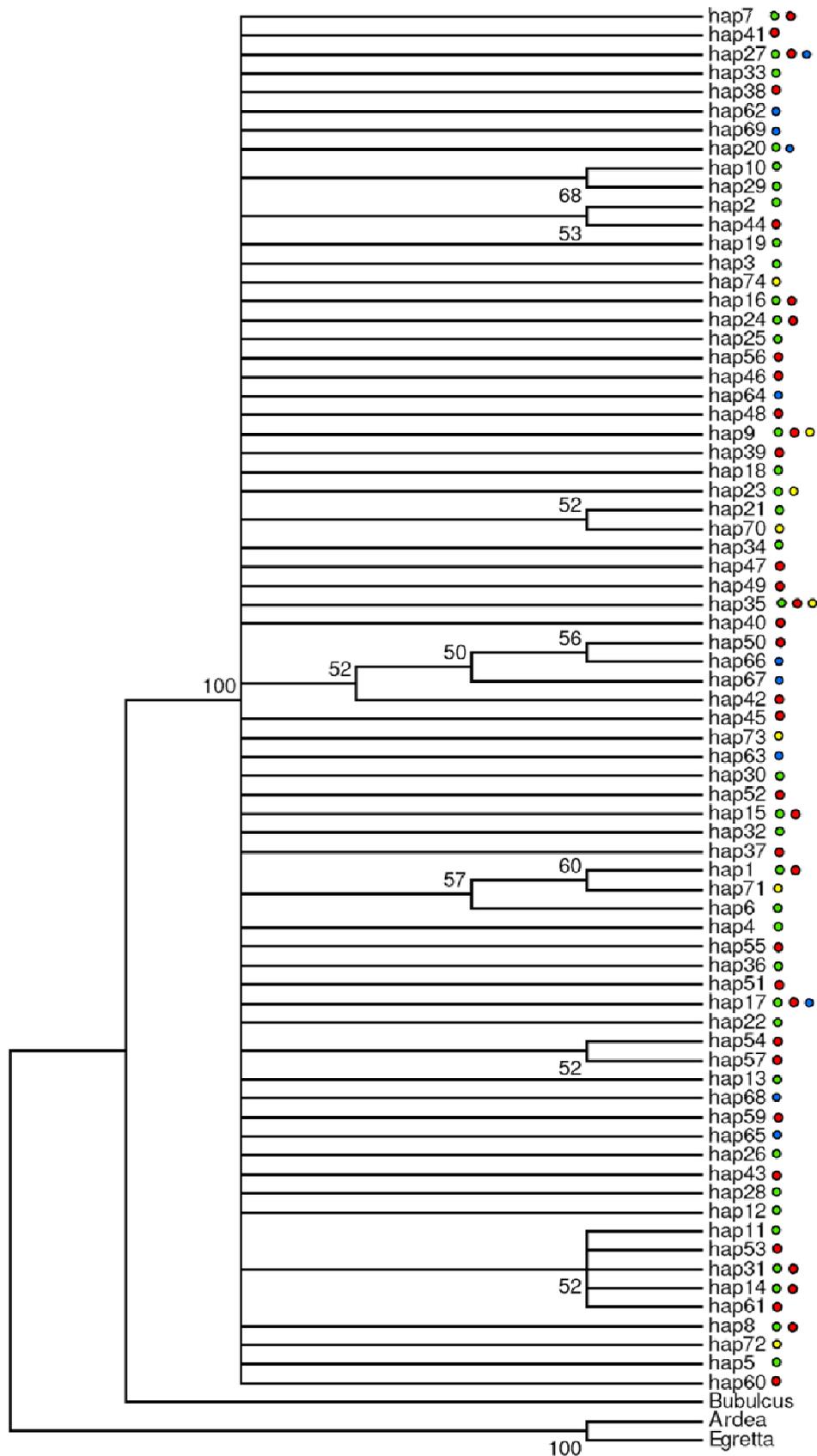


Figura 26: Árvore de Neighbour-joining de 586pb da região controladora de *A. alba egretta*. Grupo externo *Bubulcus ibis*, *Ardea novaehollandiae* e *Egretta eulophotes*. Valor dos ramos acima do *bootstrap* de 50%. Verde- Rio Grande do Sul; Vermelho- Pantanal; Amarelo- Santos-Cubatão; Azul- Amapá.

6 Discussão

6.1 Uso do DNAmít nos estudos de filogeografia e histórico demográfico

O conjunto de oligonucleotídeos espécie-específicos desenvolvidos neste trabalho proporcionou ampliações com bons rendimentos, permitindo que as reações de seqüenciamento fossem feitas em condições ótimas. Essa estratégia de amplificar genes vizinhos à região *D-loop* com iniciadores já descritos e de redesenhar os iniciadores é uma das formas de se evitar a amplificação dos NUMTs. Apenas uma única banda foi amplificada com o uso desses oligonucleotídeos. A semelhança na composição das bases nitrogenadas com outras reportadas na literatura, o alto grau de similaridade com as seqüências da região controladora das espécies *Ardea novaehollandiae* e *Egretta eulophotes* e o seqüenciamento do RNAt^{Glu}, gene vizinho à região *D-loop*, são evidências de que o fragmento utilizado nas análises não foi um gene incorporado na região nuclear e sim uma porção da região controladora do DNAmít.

Este conjunto de oligonucleotídeos foi testado numa amplificação heteróloga, na espécie *B. ibis*, resultando em ampliações de qualidade e mostrando-se apropriado para possíveis estudos em genética de populações nesta espécie.

O nível de variação do Domínio I da região controladora do DNAmít se mostrou adequado para responder às questões pretendidas neste estudo, contribuindo para investigação do histórico demográfico dessas populações e na verificação de associação entre os haplótipos e a distribuição geográfica da espécie. Os dados gerados contribuem para um melhor entendimento da distribuição da variação genética intra-específica das populações brasileiras de *A. alba egretta* e determina os padrões histórico-demográficos dessas populações.

6.2 Diversidade Genética entre colônias e regiões

Uma grande diversidade haplotípica foi encontrada para as populações de *A. alba egretta* ($0,9079 \pm 0,0005$), totalizando 74 haplótipos nas populações das quatro regiões brasileiras analisadas. A diversidade haplotípica reflete a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso serem diferentes em uma população, já a diversidade nucleotídica (π) reflete a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos, escolhidos ao acaso, serem diferentes em uma população. Esse último índice de diversidade é menos influenciado pelo tamanho amostral do que a diversidade haplotípica (NEI; LI, 1979) e, por este motivo, é um índice mais adequado para a comparação da variabilidade genética entre populações e entre espécies diferentes.

Quando comparamos a diversidade nucleotídica entre as colônias analisadas, verificamos que as colônias Tucum (Pantanal) e Se Cria (Amapá) apresentam as maiores diversidades, enquanto que, a menor diversidade nucleotídica foi observada na colônia de Santos-Cubatão (São Paulo). É interessante notar que as maiores diversidades ocorreram em regiões mais preservadas e o menor índice foi detectado em uma região altamente degradada como a de Cubatão (OLMOS; SILVA, 2003). Na análise entre as regiões amostradas fica evidente que a região do Amapá é a mais diversa (Tabela 6), sendo a diversidade nucleotídica de suas colônias estatisticamente diferente da encontrada para as colônias do Rio Grande do Sul, segundo teste-t. A distribuição da diversidade em ordem decrescente do Amapá > Pantanal > São Paulo > Rio Grande do Sul confirma o padrão esperado para uma maior diversidade nas regiões equatoriais. Segundo hipótese levantada, as regiões equatoriais apresentam vestígios dos supostos refúgios para essas populações durante os períodos glaciais e apresentariam os maiores índices de diversidade. Os resultados encontrados apóiam tal suposição.

A partir da regressão linear entre as diversidades nucleotídicas e latitude (Figura 18) que as maiores diversidades são encontradas em latitudes menores. Uma tendência semelhante foi observada por Brito (2005) em *Strix aluco*, quando foram propostos possíveis refúgios para esta espécie de coruja. Os menores níveis de diversidade genética seriam esperados nas populações do Pantanal, São Paulo e Rio Grande do Sul, segundo a hipótese de que estas populações seriam descendentes das populações que permaneceram posicionadas na região equatorial (Amapá). Logo, o padrão observado em populações de maior latitude seria esperado porque apenas parte da diversidade genética existente na população original estaria representada nas populações colonizadas (CHEVIRON et al., 2005; PETERS et al., 2009).

Na região do Amapá onde foi encontrada maior diversidade genética pela análise de DNAmít, as populações da espécie podem ter permanecido estáveis e as possíveis reduções populacionais não foram tão intensas durante o período glacial. As populações desta região (ou latitude) merecem ser mais estudadas, com um aumento do número de indivíduos analisados, para se esclarecer, pelo uso do DNAmít ou dos marcadores nucleares, se a hipótese de uma maior estabilidade populacional devido a uma menor intensidade nas modificações climáticas está correta. O fato do haplótipo ancestral (Hap9) ser mais frequente no Rio Grande do Sul, no Pantanal e em São Paulo e não ter sido observado na amostra estudada do Amapá aponta para um déficit amostral da região.

Souza (2008), baseando-se em dados de sete locos de microssatélites, demonstrou não haver diferenças significantes entre as heterozigosidades esperadas (He) determinadas nas colônias amostradas (Rio Grande do Sul, Co-Sud = Pantanal e São Paulo, Amapá). Uma tendência maior de diversidade no sul foi encontrada por Souza (2008), com um maior valor médio de He ($He = 0,515$) e um valor menor para a região norte ($He = 0,434$). Como os testes estatísticos demonstraram que estas diferenças não foram significativas esses resultados não contradizem os achados pelo DNAmít.

Foi realizada uma análise comparativa entre a diversidade nucleotídica determinada nesse estudo e as de outras espécies aquáticas pertencentes à mesma ordem. Foram considerados apenas dados referentes às populações de aves do Pantanal em estudos que analisaram a mesma região, Domínio I, do *D-loop*. Verificou-se que a diversidade observada na população de *A. alba egretta* ($\pi = 0,006$) é maior que a de *P. ajaja* ($\pi = 0,004$, SANTOS et al., 2008) e a de *Jabiru mycteria* ($\pi = 0,004$, LOPES et al., 2007), e similar à observada em *M. americana* ($\pi = 0,006$, AVELAR, 2008). Quando comparamos estes valores de diversidade ao censo populacional dessas espécies no Pantanal, encontramos uma relação entre as espécies que apresentam o maior número de indivíduos e os maiores índices de diversidade. Em censos realizados no Pantanal, por exemplo, estima-se que existam de 19.960 (Mato Grosso) (YAMASHITA; VALLE, 1990) a 12.715 indivíduos (Mato Grosso do Sul) (MORRISON et al., 2008) de *A. alba egretta*, 2.495 indivíduos de *P. ajaja*, 27.445 indivíduos de *M. americana* (YAMASHITA; VALLE, 1990) e 6.790 indivíduos de *J. mycteria* (MORRISON et al., 2008).

6.3 Estruturação populacional

A baixa estruturação encontrada dentro do estado do Rio Grande do Sul neste estudo com DNAmít está em concordância com Souza (2008) que utilizou a mesma base amostral e dados de sete locos de microssatélites. Segundo os conjuntos de dados, nucleares e mitocondriais, as colônias da região sul podem ser consideradas como pertencentes a uma única população.

As colônias do Pantanal não apresentaram estruturação genética entre elas, desta forma a região pode ser considerada como uma população única. Um resultado semelhante foi obtido na região norte onde focou evidenciada a ausência diferenciação intra-colônias do Amapá. O estado de São Paulo apresentou uma baixa estrutura entre suas duas colônias, mas

devido ao baixo número de indivíduos amostrados e colônias não podemos descartar a hipótese de considerar estas colônias pertencentes a uma mesma população.

Baseando-se nos dados de DNAmít foi detectada estruturação genética avaliada pelo *Fst* par-a-par e pela AMOVA apontando diferenciação genética entre o Amapá e as demais regiões estudadas. Por outro lado, as regiões do Pantanal, São Paulo e Rio Grande do Sul não apresentaram diferenciação entre si.

Souza (2008) utilizou microssatélites para investigar a diversidade genética e a estruturação populacional das populações *A. alba egretta* em quase todas as colônias incluídas nesse estudo. Verificou-se que as populações do Rio Grande do Sul se diferenciavam de São Paulo e de Mato Grosso, mas São Paulo e Mato Grosso não se diferenciavam entre si, e a amostra do estado do Amapá não se diferenciou das demais (SOUZA, 2008).

Como explicar a não concordância entre os resultados de diferenciação encontrados pelo estudo do DNAmít e pelos microssatélites?

A ausência de diferenciação genética encontrada entre a população do Amapá com as demais localidades descritas por Souza (2008) pode ser explicada pelo número pequeno de indivíduos amostrados (N= 5) pela autora. As comparações com o presente estudo, baseado num tamanho amostral maior (N= 14) podem ser discordantes. O fato do haplótipo mais freqüente (Hap9) nas demais regiões, não ser amostrado no Amapá evidencia um déficit amostral até para esse estudo com DNAmít que demonstrou diferenciação genética com outras regiões. Supõe-se, portanto, que um panorama diferente poderá ser encontrado nas análises utilizando microssatélites com a ampliação do número de indivíduos analisados.

A diferenciação genética encontrada por Souza (2008) para o Rio Grande do Sul em relação às demais populações está baseada nos dados de um único loco de microssatélites (Ah522) entre os sete analisados. Esse loco apresentou grande número de alelos, ocorrência de alelos nulos e desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em todas as colônias. A

autora demonstra que quando os dados desse loco são retirados da análise, a diferenciação genética desaparece, logo, essa diferenciação genética pode ser real ou um artefato resultante da presença dos alelos nulos em alta frequência no loco Ah522, uma condição suposta por Chapuis e Estoup (2007). Se real, essa não concordância entre os resultados dos dois marcadores quanto à diferenciação do Rio Grande do Sul poderá ser explicada pelas taxas mais altas de mutação dos locos de microssatélites ($10^{-2} - 10^{-6}$ eventos por locos por mutação) (LI et al., 2002) que levariam a detecção mais precoce de diferenciação do que pela região do DNAmIt (2% mutações por sítio por milhões de anos) (BAKER; MARSHALL, 1997).

A falta da diferenciação encontrada pelo estudo do DNAmIt entre as regiões (São Paulo, Pantanal e Rio Grande do Sul) é um padrão esperado supondo um passado histórico comum onde tais populações estiveram reunidas em uma única população. A falta de diferenciação ocorreria porque o tempo requerido para haver diferenciação detectável pelo DNAmIt não teria sido suficiente, devido à baixa taxa mutacional deste marcador em comparação com a taxa mutacional dos locos dos microssatélites.

6.4 Filogeografia

A NCPA, denominada por Templeton (2004) como filogeografia estatística, aplicada à rede de haplótipos, tem recebido algumas críticas de outros autores ao longo dos anos (e.g. KNOWLES; MADDISON, 2002; KNOWLES, 2008). Templeton (2004), entretanto, argumenta que a NCPA é eficaz nas interpretações filogeográficas onde o cenário de uma hipótese *a priori* está disponível. Além disso, Templeton (2009) demonstra que o índice de 75% de erro tipo I não tem validade lógica, pois os testes realizados por Panchal e Beaumont (2007) confundem três fontes de erro e o índice de 75% não é suportado pelas simulações de Knowles e Maddison (2002) quando usado qualquer versão da chave de inferência do NCPA desde 2003. Desta forma apenas é aceitável a taxa de cerca de 23% de erro tipo I para um

único loco, com a NCPA utilizada atualmente (TEMPLETON, 2009). Desta forma, considerando a NCPA como um método útil para descrever a distribuição geográfica dos haplótipos, a análise foi considerada neste estudo.

A NCPA revelou resolução genética suficiente para detectar o processo histórico de expansão no clado 1.1, processo esse detectado com outras análises, corroborando assim a expansão demográfica para as populações das regiões do Rio Grande do Sul, Pantanal e Amapá de *A. alba egretta*. Fluxo gênico restrito com isolamento por distância foi diagnosticado pela NCPA em dois cladogramas (Tabela 13) envolvendo haplótipos pertencentes ao Amapá, Pantanal e Rio Grande do Sul. Esse resultado está concordante com os padrões mais recentes de diferenciação identificados também pelo DNAmis nas análises da AMOVA e *Fst* par-a-par (Tabela 7 e 8). Em estudo realizado com *Chamaea fasciata* (Passeriforme) na Califórnia, a NCPA também corroborou os dados de “*mismatch distribution*” e *Fs* de Fu, indicando expansão populacional recente, sendo a região sul o refúgio durante o Pleistoceno, os autores deste estudo também evidenciaram fluxo gênico rescrito com isolamento por distância em um clado, demonstrando uma diferenciação em um passado recente (BURNS; BARHOUM, 2006).

6.5 Histórico demográfico

Desvios foram observados nos métodos estatísticos segundo as três classes propostas por Ramos-Onsins e Rozas (2002). A força destes testes, segundo os autores, pode ser avaliada na interpretação dos resultados obtidos. Os testes de Classe I utilizam informações das frequências mutacionais de sítios segregantes (*D* de Tajima e R_2); os de Classe II utilizam informações sobre a distribuição haplotípica (*Fs* de Fu); e os de Classe III utilizam a distribuição das diferenças par a par das seqüências (“*mismatch distribution*”).

Supondo que o fragmento do Domínio I da região controladora do DNAmít analisado nesse estudo não está sob o efeito de seleção, pode-se interpretar os desvios observados como resultantes de mudanças no tamanho demográfico das populações estudadas. Desvios nos testes de F_s de Fu, D de Tajima, R_2 e análises da distribuição das diferenças pareadas apontaram para sinais de expansão demográfica nas populações do Rio Grande do Sul e do Pantanal. Uma evidencia paralela dessa expansão é a forma da rede haplotípica encontrada (formato de estrela) nas amostras das regiões do Rio Grande do Sul e Pantanal, padrão esse indicativo de crescimento populacional. Uma grande congruência entre os resultados dos testes foi observada para as regiões avaliadas, sendo São Paulo a única localidade na qual sinais de expansão demográfica não foram verificados. O sinal de expansão identificado no Amapá foi menor, pois apenas os desvios de F_s de Fu e as análises da distribuição das diferenças par-a-par foram significativos. Por se tratar de uma amostra pequena, o teste de maior força para identificar este sinal no Amapá seria o teste de R_2 que não foi significativo (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002).

Nas populações do Rio Grande do Sul e Pantanal, os testes de neutralidade F^* e D^* de Fu e Li (FU; LI, 1993) apresentaram desvios significativos. Como esses testes são mais sensíveis aos desvios decorrentes da seleção (“*background selection*”) (PECK; CONGDON, 2004) do que aos da expansão, não ficou descartada a possibilidade de que esses desvios observados sejam decorrentes a seleção, como também pela expansão populacional ou da somatória de ambos. Quando comparamos os desvios obtidos nas demais análises (R_2 e “*mismatch distribution*”) verificamos que os sinais de expansão populacional são mais pronunciados, principalmente no Pantanal e Rio Grande do Sul.

Se as mudanças climáticas ocorridas no Amapá não foram tão intensas as populações presentes são prováveis descendentes das populações que permaneceram na região equatorial. Segundo esse modelo, mudanças climáticas teriam sido menores no Pantanal e São Paulo do

que no Rio Grande do Sul. Assim o esperado seria que a espécie em estudo deveria ter recolonizado a região do Pantanal a mais tempo do que o Rio Grande do Sul. A utilização do DNA mitocondrial como marcador genético, permitiu comprovar esta hipótese, de que colonização do Pantanal foi mais antiga que no Rio Grande do Sul (Tabela 12). Outra evidência paralela desse processo foi a detecção de um gradiente de diversidade genética no sentido menor- maior latitude das populações, segundo o parâmetro diversidade nucleotídica (Tabela 6).

Outras espécies de aves aquáticas da América do Sul que tiveram seu histórico demográfico investigados apresentaram padrões similares aos encontrados no presente estudo em *A. alba egretta*. O estudo realizado com populações tuiuiús (*J. mycteria*) e cabeças-secas (*M. americana*) no Pantanal revelou um histórico compatível com deslocamentos das populações durante as mudanças climáticas do Pleistoceno e uma expansão demográfica recente na região. O tempo médio de expansão no Pantanal foi determinado em 30.843 anos antes do presente para *M. americana* e 14.233 para *J. mycteria* (LOPES et al., 2007). Outro trabalho também realizado no Pantanal com o colhereiro (*P. ajaja*) identificou um tempo médio de expansão de 25.733 anos antes do presente (SANTOS et al., 2008). Esses dados estão concordantes com o tempo encontrado para a mesma região no presente estudo, cujo tempo médio de expansão foi de 32.009 anos antes do presente. Segundo os tempos estimados para as diversas espécies, *A. alba egretta* teria sido a primeira a expandir sua população no Pantanal, após o período de glaciação. Essa hipótese está concordante com a biologia da espécie em questão, pois dentre as mencionadas ela é a que suporta as temperaturas mais baixas. Se verificarmos a distribuição geográfica atual da espécie, vamos observar que ela está presente em regiões desde o norte dos Estados Unidos (KUSHLAN; HANCOCK, 2005) até o Chile onde as temperaturas são menores (Figura 5). Na figura 27 pode se observar que a distribuição atual das espécies *M. americana*, *P. ajaja* e *J. mycteria* é menor do que a

distribuição da *A. alba egretta*. É interessante notar *A. alba egretta* resiste temperaturas mais baixas chegando a se reproduzir em latitudes altas na América do Norte. Essa característica corrobora os tempos de expansão encontrados, pois as quatro espécies possivelmente colonizaram a região do Pantanal em épocas diferentes, sendo afetadas diferentemente durante o período glacial.

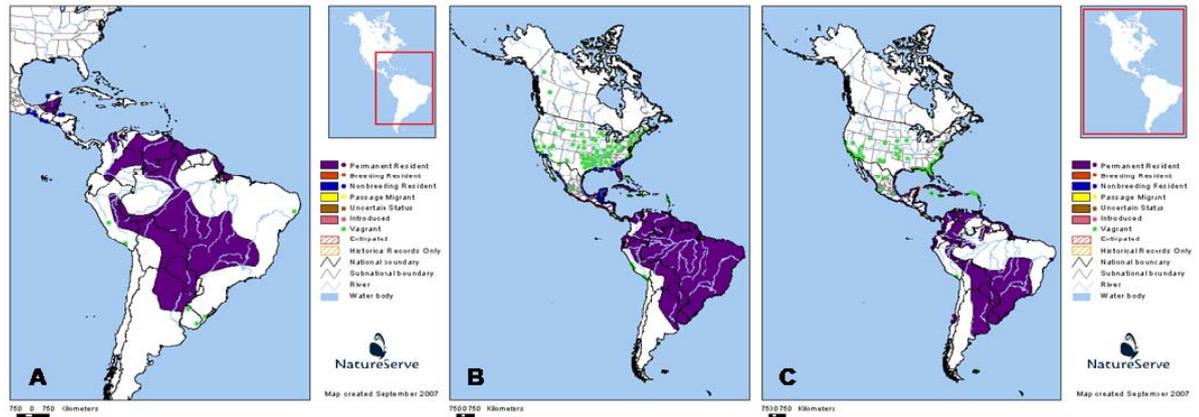


Figura 27: Distribuição no continente Americano das espécies: *Jabiru mycteria* (A); *Mycteria americana* (B); *Platalea ajaja* (C) (NatureServe: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>. Acesso: Setembro 2009).

Os tempos médios de expansão distintos encontrados para o Rio Grande do Sul, Pantanal e Amapá apóiam a hipótese de que nas regiões mais próximas ao Equador foram menos afetadas durante o período glacial e ali as condições climáticas foram mais estáveis. A recolonização e estabelecimento das populações de garça-branca-grande nas regiões posicionadas em latitudes maiores, ocorreu só quando houve o retorno de condições ambientais mais favoráveis. No sul do país é suposto que ondas intensas de frio atingiram seu máximo aproximadamente 19 mil anos antes do presente, e após esta data o degelo iniciou-se (CRUZ et. al., 2006). O tempo de 7.195 para o restabelecimento da população nessa região corrobora que as populações demoraram mais para se expandir nessa área que permaneceu por mais tempo, mais fria e menos úmida.

6.6 Implicações conservacionistas e perspectivas futuras

O alto índice de diversidade nucleotídica encontrado e a diferenciação genética entre as populações *A. alba egretta* do norte com as populações do centro-oeste, sudeste e sul do país, recomenda uma atenção especial para a população da região do norte do país. O monitoramento e a proteção das áreas de forrageamento e reprodução da espécie devem ser realizados, com intuito de preservar sua diversidade já que a região é detentora da maior diversidade genética de *A. alba egretta* do Brasil. Apesar da ausência de estruturação entre as populações do Pantanal, São Paulo e Rio Grande do Sul, estas regiões não deveriam ser tratadas *a priori* como uma unidade única, pois a utilização de apenas uma abordagem (genética) pode ser insuficiente para isso. De acordo com Allendorf e Luikart (2007), muitas informações, incluindo as características ambientais, devem ser integradas para a identificação de unidades de conservação. Como cada região apresenta características ambientais muito distintas, estas populações podem mostrar adaptações ecológicas.

Com a ampliação do número de amostras de outras localidades, em especial do norte do país poderá se confirmar a hipótese de que essas populações são as ancestrais das demais e de se traçar um panorama filogeográfico mais claro para a espécie. Além disso, caso existam outras unidades populacionais distintas, essas poderão ser identificadas, como a detectada neste trabalho para a população do Amapá.

Uma questão interessante a ser abordada em trabalhos futuros será a investigação do nível de diversidade das populações de garça-branca-grande na América do Norte, e se estas populações estão estruturadas com relação às populações sul-americanas. Além disso, como os limites da distribuição das subespécies não estão muito claros, estudos filogeográficos globais poderão ser desenvolvidos para esclarecer como diferem as subespécies da Europa e da África com relação à subespécie americana.

7 Conclusão

- Os oligonucleotídeos espécie-específicos desenvolvidos no presente trabalho, Ardea L3 e Ardea H1, para a amplificação do Domínio I da região controladora (*D-loop*) do DNAmít permitiram a amplificação de um fragmento de uma região com nível de variabilidade compatível com a proposta de investigação do histórico demográfico e filogeografia da espécie em estudo, *A. alba egretta*.
- Foi evidenciada grande diversidade genética nas populações estudadas de *A. alba egretta*, totalizando 74 haplótipos nas quatro regiões do país. A diversidade nucleotídica evidenciou que a região do Amapá foi a mais diversa. A distribuição da diversidade em ordem decrescente foi Amapá > Pantanal > São Paulo > Rio Grande do Sul confirmam o padrão esperado de uma maior diversidade nas regiões equatoriais, prováveis refúgios para essas populações durante os períodos glaciais.
- Foi detectada diferenciação genética pelo DNAmít entre o Amapá e as demais localidades estudadas, enquanto que as regiões do Pantanal, São Paulo e Rio Grande do Sul não se diferenciaram entre si. A falta da diferenciação entre as regiões (São Paulo, Pantanal e Rio Grande do Sul) pode ser explicada supondo um passado histórico comum dessas populações. A conservação da população do Amapá merece atenção especial por sua divergência genética e por apresentar alta diversidade.
- Os estudos de histórico demográfico evidenciaram sinais de expansão nas populações do Rio Grande do Sul e Pantanal e um sinal menor para o Amapá. Os tempos de expansão para as populações posicionadas em latitudes diferentes de *A. alba egretta* indicaram que elas foram afetadas diferentemente pelas glaciações durante o Pleistoceno. A espécie parece ter sido a primeira a recolonizar as áreas de maior latitude, em comparação com outros ciconídeos.

8 Bibliografia

- AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, v. 3, p. 1-19, 1977.
- AB'SABER, A. N. Amazônia Brasileira: um macrodomínio. In: _____. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. 4 ed. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003. p. 66.
- ALEIXO, A. Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: a case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 89, p. 383-395, 2006.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Units of conservation. In: _____. **Conservation and the genetics of populations**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007. p. 380-420.
- AMERICAN ORNITHOLOGISTS' UNION (AOU). **Check list of North American birds**. 7 ed. Washington: American Ornithologists' Union, 1998. 829p.
- ASSINE, M. L.; SOARES P. C. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. **Quaternary International**, v. 114, p. 23-34, 2004.
- AVELAR, L. H. **Estrutura genética e histórico demográfico de populações de *Mycteria americana* (Linnaeus 1758) (Aves: Ciconiiformes: Ciconiidae)**. 2008. 90p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36. p. 3-15, 2009.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2 ed. New York: USA Sinauer Associates, 2004. 684p.
- AYRES, M., et al. **BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 324p.
- BANCROFT, T. G.; GAWLIK, D. E.; RUTCHEY, K. Distribution of wading birds relative to vegetation and water depths in the Northern Everglades of Florida, USA. **Waterbirds**. v. 25, n. 3, p. 265-391, 2002.
- BAKER, A. J.; MARSHALL, H. D. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: MINDELL, D. P. **Avian molecular evolution and systematics**. San Diego, California: Academic Press, 1997. p. 51-79.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 279-744, 2004.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grassland during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 177, p. 19-27, 2002.

- BEHLING, H., et al. Late Quaternary araucaria forest, grassland (campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambara do Sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 203, p. 277-297, 2004.
- BENCKE, G. A. et al. Capítulo 22 – Aves. In: BECKER, F. G.; RAMOS R. A.; MOURA, L. A. **Biodiversidade: regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente –MMA / SBF, 2006. p. 316-355.
- BERLIN, S.; SMITH, N. G. C.; ELLEGREN, H. Do Avian Mitochondria Recombine?. **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, p. 163-167, 2004.
- BEZERRA, M. A. O. **O uso de multi-traçadores na reconstrução do Holoceno no Pantanal Matogrossense, Corumbá**. 1999. 88p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.
- BIOTA-FAPESP. **Guia da diversidade paulista: Mapa - Para o verde renascer (2006)**. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/info/wap2006>>. Acesso em: 12 novembro 2007.
- BONNIE, J. P.; MEDEIROS, M. J. Unequal food distribution among Great Egret *Ardea alba* nestlings: parental choice or sibling aggression?. **Journal of Avian Biology**, v. 35, p. 399-404, 2004.
- BRITO, P. H. The influence of Pleistocene glacial refugia on tawny owl genetic diversity and phylogeography in western Europe. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3077-3094, 2005.
- BURNS, K. J.; BARHOUM, D. N. Population-level history of the wrenit (*Chamaea fasciata*): Implications for comparative phylogeography in the California Floristic Province. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, p. 117-129, 2006.
- BUSH, M. B., et al. Amazonian paleoecological histories: one hill, three watersheds. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 214, p. 359-393, 2004.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, p. 73-84, 2007.
- CABANNE, G. S., et al. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 760-773, 2008.
- CAPARROZ, R.; MIYAKI, C. Y.; BAKER, A. J. Contrasting phylogeographic patterns in mitochondrial DNA and microsatellites: evidence of female philopatry and male biased gene flow among regional populations of the Blue-and-yellow macaw (Psittaciformes: *Ara ararauna*) in Brazil. **The Auk**, v. 126, n. 2, p. 359-370, 2009.
- CHANG, Q., et al. Phylogenetic relationships among 13 species of herons inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. **Acta Zoologica Sinica**, v. 49, p. 10-205, 2003.

- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n 3, p. 621-631, 2007.
- CHEVIRON, Z.A.; HACKETT, S. J.; CAPPARELLA, A. P. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 338-357, 2005.
- CLAPPERTON, C. M. Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 101, p. 189-208, 1993.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. 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**, v. 19, p. 141-169, 2000.
- COLINVAUX, P. A.; DE OLIVEIRA, P. E. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 166, p. 51-63, 2001.
- COMITE BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS - CBRO. Resolução nº 118. **Nattereria**, v. 8, p. 1, 2003.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- COUTO, A. A., et al. Controle da transmissão da malária em área de garimpo no Estado do Amapá com participação da iniciativa privada. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 897-907, 2001.
- CRUZ, F. W. Jr., et al. A stalagmite record of changes in atmospheric circulation and soil processes in the Brazilian subtropics during the Late Pleistocene. **Quaternary Science Reviews**, v. 25 p. 2749-2761, 2006.
- DE ARAUJO, H. F. P.; NISHIDA, A. K. Considerações sobre colônias de garças (Ciconiiformes, Ardeidae) no Estado da Paraíba, Brasil. **Ornithologia**, v. 2, n. 1, p. 34-40, 2007.
- DESJARDINS, P.; MORAIS, R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates. **Journal Molecular Biology**, v. 212, p. 599-634, 1990.
- DWYER, M. W. Breeding biology of Great Egret in Sedwick Co., Kansas, Kan. **Ornithological Society Bulletin**, v. 39, p. 21-26, 1988.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005.

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUARTO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.
- FERRAZ-VICENTINI, K. R.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Palynological analysis of a palm swam in central Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 9, p. 207-219, 1996.
- FRIESEN, V. L.; BURG, T. M.; McCOY, K. D. Mechanisms of population differentiation in seabirds. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1765-1785, 2007.
- FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.
- GIBB, G. C., et al. Mitochondrial genomes and avian phylogeny: complex characters and resolvability without explosive radiations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 1, p. 269-280, 2007.
- GLADSTONE, D. E. Promiscuity in monogamous colonial birds. **The American Naturalist**, v. 114, p. 545-577, 1979.
- GRIFFITHS, R., et al. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1071-1075, 1998.
- GRÜLL, A.; RANNER, A. Populations of the Great Egret and Heron in relation to ecological factors in the Reed Belt of the Neusiedler See. **Colonial Waterbirds**, v. 21, n. 3, p. 328-234, 1998.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMILTON, S. K.; SIPPEL, S. J.; MELACK, J. M. Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 137, p. 1-23, 1996.
- HARPENDING, R. C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**, v. 66, p. 561-600, 1994.
- HARPENDING, H. C., et al. Genetic structure of ancient human populations. **Current Anthropology**, v. 34, p. 483-496, 1993.
- HELLMAYR, C. E.; CONOVER, B.. Catalogue of birds of the Americas and adjacent islands. **Field Museum Natural History Publications. Zoological Series 13**, v. 1, n. 3, p. 1-383, 1948.
- HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL J. Family Ardeidae. In: _____. **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx, 1992. v.1. p. 376-429.

HULL, J.; GIRMAN, D. J. Effects of Holocene climate change on the historical demography of migrating sharp-shinned hawks (*Accipiter striatus velox*) in North América. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 159-170, 2005.

INFONATURA. Animals and Ecosystems of Latin America [web application]. 2007. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): **NatureServe**. Disponível em: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>. Acesso em: 25 julho 2009.

INFONATURA. Animals and Ecosystems of Latin America [web application]. 2007. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): **NatureServe**. Disponível em: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>. Acesso em: 3 setembro 2009.

IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1.2008. *Gorsachius magnificus*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 4 setembro 2009.

IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1.2008. *Egretta eulophotes*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 4 setembro 2009.

IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1.2008. *Tigrisoma fasciatum*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 2 julho 2009.

JOSEPH, L.; WILKE, T. Lack of phylogeographic structure in three widespread Australian birds reinforces emerging challenges in Australian historical biogeography. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 612-624, 2007.

JUNK, W. J., et al. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Sciences**, v. 68, p. 278–309, 2006.

JUNK, W. J. Tropical/subtropical wetland biodiversity: status of knowledge, threats and sustainable management. In: BERNARD, T.; MOSPELE, K.; E RAMBERG, L. **Environmental monitoring of tropical and subtropical wetlands**. Maun: Okavango Report Series - Harry Oppenheimer Okavango Research Centre and University of Botswana, 2003, p. 45-69.

KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2623-2635, 2002.

KNOWLES, L. L. Why does a method that fails continue to be used?. **Evolution**, v. 62, p. 2713-2717, 2008.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Mega3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

KUSHLAN, J.A.; HANCOCK, J. A. **Hérons**. New York: Oxford University Press, 2005. 433p.

LEDRU, M. P., et al. The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. **Paleogeography, Paleoclimatology, Palaeocology**, v. 123, p. 239-257, 1996.

- LI, Y-C., et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DNAsp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LOPES, I. F.; MIÑO, C. I.; DEL LAMA, S. N. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 849-857, 2007.
- LOPES, I. F., et al. Demographic history of wood stork (*Mycteria americana*) Brazilian Pantanal colonies revealed by mitochondrial DNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 241-250, 2006.
- LOPES, I. F. **Diferenciação genética entre populações de cabeça-seca (*Mycteria americana*)**. 2002. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.
- MACHADO A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2. 1420p.
- MARCHANT, J. H., et al. The BTO heronries census of England and Wales 1928–1998: new indices and a comparison of analytical methods. **Ibis**, v. 146, p. 323-334, 2004.
- MARTHINSEN, G., et al. No phylogeographic structure in the circumpolar snowy owl (*Bubo scandiacus*). **Conservation Genetics**, v.10, p. 923-933, 2009.
- McCRACKEN, K. G.; SHELDON, F. H. Molecular and osteological heron phylogenies: sources of incongruence. **The Auk**, v. 115, p. 127-141, 1998.
- McCRIMMON Jr. D. A.; OGDEN J. C., BANCROFT T. G. Great Egret (*Ardea alba*). **The Birds of North America Online**, 2001. Disponível em: <<http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/570>>. Acesso em: 8 maio 2007.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R. **A guide to the birds of South America**. Narbeth: Livingston. 1970. 498p.
- MOCK, D. W.; DRUMMOND, H.; STINSON, C. H. Avian Siblicide: Killing a brother or a sister may be a common adaptive strategy among nestling birds, benefitind both the surviving offspring and the parents. In: SHERMAN, P. W., et al. **Exploring Animal Behavior**. 4ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2005. p. 236-247.
- MORALES, G. Herons in South America. In: KUSHLAN J. A; HAFFER H. **Heron Conservation**, London. Academic Press, 2000. p. 177-199.
- MORENO, A. B.; LAGOS, A. R.; ALVES, M. A. S. Water depth selection during foraging and efficiency in prey capture by the egrets *Casmerodius albus* and *Egretta thula* (Aves, Ardeidae) in an urban lagoon in Rio de Janeiro State, Brasil. **Iheringia Série Zoológica**, v. 95, n. 1, p. 107-109, 2004.

- MILA, B., et al. Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. **Proceedings of the Royal Society, Proceeding B**, v. 267, p. 1033-1040, 2000.
- MINDELL, D. P.; SORENSON, M. D.; DIMCHEFF, D. E. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 18, p. 10693-10697, 1998.
- MIÑO, C. I.; Del LAMA, S. N. Molted feathers as DNA source for population genetic studies in waterbirds. **Waterbirds**, v. 32, n. 2, p. 322-329, 2009.
- MIÑO, C. I.; Del LAMA, S. N. Genetic structure in Brazilian breeding colonies of the Roseate spoonbill (*Platalea ajaja*, Aves: Threskiornithidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 238-247, 2007.
- MORRISON, R. G., et al. **Aves migratórias no Pantanal: distribuição de aves limícolas neárticas e outras espécies aquáticas no Pantanal = Migratory birds in the Pantanal: distribution of nearctic shorebirds and water species in the Pantanal**. Coords. SERRANO, I./ Brasília: Iniciativa WWF-Brasil. 2008. 99p.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.
- OLMOS, F.; SILVA, R. S. **Guará: ambiente, flora e fauna dos manguezais de Santos-Cubatão**. São Paulo: Empresa das Artes, 2003. 216p.
- PALMER, R. S. **Handbook of North American birds**. New Haven, CT: Yale University Press, 1962. 567p.
- PANCHAL, M. The automation of nested clade phylogeographic analysis. **Bioinformatics**, v. 23, p. 509-510, 2007.
- PANCHAL, M.; BEAUMONT, A. The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. **Evolution**, v. 61, p. 1466-1480, 2007.
- PAVLOVA, A., et al. Pleistocene evolution of closely related sand martins *Riparia riparia* and *R. diluta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48 p. 61-73, 2008.
- PAVLOVA, A., et al. Different post-Pleistocene histories of eurasian parids. **Journal of Heredity**. v. 97, n. 4, p. 389-402, 2006.
- PAYNE, R. B.; RISLEY, C. J. Systematics and evolutionary relationships among the herons (Ardeidae). **Miscellaneous Publications Museum of Zoology University of Michigan**, v. 150, p. 1-115, 1976.

- PECK, D. R.; CONGDON, B. C. Reconciling historical processes and population structure in the sooty tern *Sterna fuscata*. **Journal of Avian Biology**, v. 35, p. 327-335, 2004.
- PEREIRA, S. L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4 p. 745-752, 2000.
- PESSENDA, L. C. R., et al. Holocene fire and vegetation changes in southeastern Brazil as deduced from fossil charcoal and soil carbon isotopes. **Quaternary International**, v. 114, p. 35-43, 2004.
- PINTO, O. M. O. Catalogo das aves do Brasil e lista dos exemplares que as representam no Museu Paulista: 1. parte. Aves não Passeriformes e Passeriformes não Oscines excluida a Família Tyrannidae e seguintes. **Revista do Museu Paulista**, v. 22, p. 1-566, 1938.
- PHELPS, W.; PHELPS, W. Jr. Lista de las aves de Venezuela y su distribución. No Passeriformes. **Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales**. v. 19, p 1-317, 1958.
- PRANCE, G. T. A Review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. **Annual Meeting of the Botanical Garden**, v. 5, p. 365-378, 1982.
- 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**, v. 9, n. 4, p. 487-488, 2000.
- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.
- RANDI, E.; LUCCHINI, V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, p. 449-462, 1998.
- RICHLY, E.; LEISTER, D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1081-1084, 2004.
- ROBERTSON, B. C., et al. Phylogeography of the New Zealand blue duck (*Hymenolaimus malacorhynchos*): implications for translocation and species recovery. **Conservation Genetics**, v. 8, p. 1431-1440, 2007.
- ROGERS, A. J.; HARPENDING, H. Population growth makers waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 552-569, 1992.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTOS, M. H.; LOPES I. F.; DEL LAMA, S. N. Population genetic study of mitochondrial DNA in Roseate Spoonbill (Aves; Platalea ajaja) breeding colonies from the Pantanal Wetlands, Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 46, p. 492-505, 2008.
- SEGELBACHER, G.; PIERTNEY, S. Phylogeography of the European capercaillie (*Tetrao urogallus*) and its implications for conservation. **Journal of Ornithology**, v. 148, p. 269-274, 2007.

- SELKOE, K. A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters** v. 9, p. 615-629, 2006.
- SHELDON, F. H.; JONES, C. E.; McCracken, K. G. Relative patterns and rates of evolution in heron nuclear and mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 437-450, 2000.
- SHELDON, F. H.; McCracken, K. G.; STUEBING, K. D. Phylogenetic relationships of the zigzag heron (*Zebrilus undulatus*) and white-crested bittern (*Tigrionis leucolophus*) estimated by DNA-DNA hybridization. **The Auk**, v. 112, p. 672-679, 1995.
- SHELDON, F. H. Rates of single-copy DNA evolution in herons. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 56-69, 1987.
- SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E. **Phylogeny and classification of birds**. New Haven, Connecticut: Yale University Press, 1990.
- SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997. 912p.
- SIGRIST, T. **Aves do Brasil: uma visão artística**. São Paulo: Avis Brasilis, 2006. 672p.
- SMITH, A. L., et al. Global phylogeography of the band-rumped storm-petrel (*Oceanodroma castro*; Procellariiformes: Hydrobatidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 755-773, 2007.
- SORENSEN, M. D., et al. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 105-114, 1999.
- SOUZA, J. R. **Estrutura Genética Populacional da garça-branca-grande revelada pelo uso de Microssatélites (*Ardea alba egretta*, Aves: Ciconiiformes)**. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- SOUZA, E. A., et al. **Aves do Parque Nacional do Cabo Orange: guia de campo**. Amapá: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: ICMBio/Cemave, 2008. 81p.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.
- TEMPLETON, A. R. Why does a method that fails continue to be used? the answer. **Evolution**, v. 63, n. 4, p. 807-812, 2009.
- TEMPLETON, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference error. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 789-809, 2004.
- TEMPLETON, A. R. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 381-397, 1998.

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**, v. 140, p. 767-782, 1995.

THOMPSON, L. G.; MOSLEY-THOMPSON, E.; HENDERSON, K. A. Ice-core palaeoclimate records in tropical South America since the Last Glacial Maximum. **Journal of Quaternary Science**, v. 15, n. 4, p. 377-394, 2000.

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

WIESE, J. H. Courtship and pair formation in the Great Egret. **The Auk**, v. 93, n. 4, p. 709-724, 1976.

ZINK, R. M.; BARROWCLOUGH, G. F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**. v. 17, p. 2107-2121, 2008.

ZHOU, X., et al. A set of primer pairs for amplifying the complete mitochondrial DNA of endangered Chinese egret (Aves, Ardeidae, *Egretta eulophotes*). **Molecular Ecology**, v.8, n. 2, p. 412-414, 2008.