

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

“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL E PARENTESCO EM
TAPICURU, *PLEGADIS CHIHI* (VIEILLOT, 1817) (THRESKIORNITHIDAE), DO RIO
GRANDE DO SUL”

ANDIARA SILOS MORAES DE CASTRO E SOUZA

São Carlos, SP

2011

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

ANDIARA SILOS MORAES DE CASTRO E SOUZA

“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL E PARENTESCO EM
TAPICURU, *PLEGADIS CHIHI* (VIEILLOT, 1817) (THRESKIORNITHIDAE), DO RIO
GRANDE DO SUL”

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e
Evolução, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de mestre em Genética e Evolução.
Orientação: Profa. Dra. Silvia
Nassif Del Lama

São Carlos, SP

2011

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

S729cg

Souza, Andiará Silos Moraes de Castro e.

Caracterização genética populacional e parentesco em Tapicuru, *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (Threskiornithidae), do Rio Grande do Sul / Andiará Silos Moraes de Castro e Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Genética de populações. 2. Tapicuru. 3. Microsatélite. 4. Estrutura populacional. 5. Parentesco. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

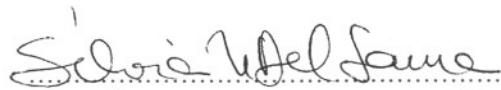
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Caracterização genética populacional e parentesco em
tapicuru, *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (Threskiornithidae),
do Rio Grande do Sul**

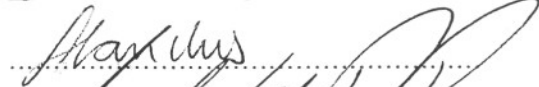
Dissertação de Mestrado de ANDIARA SILOS MORAES DE CASTRO E SOUZA

Banca Examinadora

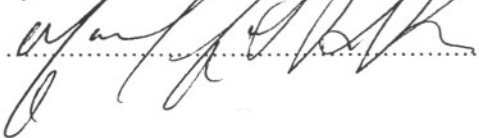
Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama



Profa. Dra. Alexandra Sanches



Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho



*Dedico este trabalho a minha amada família,
por estar sempre ao meu lado e a quem eu devo tudo o que sou.*

Amo muito cada um de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos recebidas em minha vida.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Evolução, pela oportunidade para a realização do mestrado.

À minha orientadora Silvia, pelo seu carinho, pela oportunidade, paciência, aprendizado, dedicação, presença constante e apoio tanto na vida profissional, quanto na particular.

À minha querida mãe, por todo o amor, incentivo, apoio e compreensão. Muito obrigada por tudo, a você devo tudo o que sou e tudo o que tenho. Eu te amo.

A toda a minha família, meu motivo de viver, vocês são a minha base e meu porto seguro. Agradeço imensamente cada um de vocês por todo o amor, apoio (financeiro e psicológico), estímulo, carinho, presença e alegria de viver. Vocês são o motivo da minha felicidade e das minhas realizações. Amo todos vocês!

Ao meu namorado Felipe, que tanto amo, pelo companheirismo, amizade, estímulo, paciência e confiança. Por sempre me apoiar e dar força quando tudo parecia impossível e inatingível. Sua ajuda foi de fundamental importância para esta conclusão.

À Pompeu Figueiredo de Carvalho (*in memoriam*), pelo carinho, atenção, por sempre se interessar e perguntar pelo meu trabalho e pelo exemplo de caráter.

Aos meus antigos e atuais amigos de laboratório: Thais, Juliana, Luiza, Carol, Emeline, Emmanuel, Jorge, Regiane e Cyntia, por toda a ajuda, amizade, paciência e risadas. Em especial a Carol que me ensinou desde o básico do laboratório até nas correções e sugestões. Muito obrigada!

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação e de Genética Evolutiva de Hymenoptera pela ajuda, conversas e companhias ao RU. Muito obrigada!

A todos meus amigos e amigas, de perto e de longe, que sempre me deram muito apoio, força e carinho. Muito obrigada a vocês!

Ao Marcelo Cervini pela ajuda com a genotipagem, pela atenção e paciência. Muito obrigada!

Ao seu Scherezino Scherer pela ajuda nas coletas, informações e pela boa companhia em nossa viagem de pesquisa ao Rio Grande do Sul.

Ao Centro Nacional de Pesquisas para a Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE) e ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) pela concessão das licenças para coleta e transporte das amostras utilizadas neste estudo.

A Greissi, Heloisa e Ivanildes, secretárias do Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, pelo bom atendimento concedido durante todos esses anos.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Com muito carinho, agradeço a todos que de alguma forma, me ajudaram para que eu pudesse concluir mais esta importante etapa na minha vida.

RESUMO

O tapicuru, *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (Pelecaniformes, Threskiornithidae) é uma ave aquática migratória que se reproduz em colônias no sul do Brasil. Essa espécie tem sido pouco estudada do ponto de vista genético. Nesse trabalho, nós caracterizamos geneticamente duas populações do Rio Grande do Sul e classificamos filhotes coletados no mesmo ninho em uma categoria de parentesco (irmão-completos, meio-irmãos ou não-relacionados). O DNA foi extraído a partir de penas em crescimento e tecidos musculares de amostras de 247 ninhegos e amplificado via PCR. Foram testados 44 locos de microssatélites desenvolvidos para espécies pertencentes a três famílias de aves: Threskiornithidae, Ciconiidae e Ardeidae. Os locos que amplificaram após as reações de PCR foram genotipados e seis deles se apresentaram polimórficos. O número de alelos variou de dois (NnNF5) a 10 (Aaju3) e a heterozigosidade média esperada e observada foram 0,572 e 0,552, respectivamente. Os locos NnNF5 e Eru6 foram excluídos das análises de estruturação genética por se apresentarem em desequilíbrio de ligação com os locos Eru5 e Eru4, respectivamente. A análise de AMOVA mostrou que a maior parte da diversidade está presente dentro das populações e não entre elas. O *Fst* foi pequeno, mas significativo (0,009, $p = 0,05$), mostrando uma baixa diferenciação genética entre as duas colônias. Os resultados sugerem que as populações estão pouco estruturadas e que ocorre fluxo gênico entre elas. A sexagem molecular não detectou desvio da razão observada entre machos e fêmeas em relação à razão esperada (1:1). O grau de parentesco foi determinado para 106 pares de ninhegos retirados do mesmo ninho, com os dados dos locos Aaju3, Eru2, Eru4, Eru5 e Eru6, sendo possível a classificação de 55% dos pares numa categoria de parentesco. Dentre os pares de ninhegos que foram classificados: 62% são irmãos-completos, 5% meio-irmãos e 33% não-relacionados. Esses padrões de parentesco evidenciam que o sistema de acasalamento não é apenas monogâmico, mas que também pode estar ocorrendo fertilização extra-par e parasitismo de ninho, em menor escala.

Palavras chave: TAPICURU. *PLEGADIS CHIHI*. MICROSSATÉLITE. ESTRUTURA POPULACIONAL. PARENTESCO.

ABSTRACT

The white-faced ibis, *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (Pelecaniformes, Threskiornithidae) is a migratory waterbird that breeds in colonies in the southern of Brazil. In point of view of genetics, this species was not studied. In this study we genetically characterized two populations from Rio Grande do Sul, and we classified nestlings sampled inside the same nests in one category of relatedness (full-siblings, half-siblings or unrelated). We extracted DNA from 247 nestlings (either from growing feathers or muscle tissue) and amplified it by PCR. We screened 44 microsatellite heterologous loci developed for species belonging to: Threskiornithidae, Ciconiidae and Ardeidae families. Individuals were genotyped at successfully amplified loci, and six loci proved to be polymorphic. The number of alleles per locus ranged from two (NnNF5) to 10 (Aaju3), and average expected and observed heterozygosities were 0.572 and 0.552, respectively. NnNF5 and Eru6 were excluded from the analysis of genetic structure since they are in linkage disequilibrium with Eru5 and Eru4, respectively. The AMOVA analysis showed that most of the genetic diversity is distributed within populations, and not between populations. The F_{ST} value, although small, was significant (0.009, $p = 0.05$), indicating that there is low differentiation between colonies studied. The results suggest that populations are structured and that little gene flow occurs between them. The ratio between males and females in our samples was not different from the expected 1:1. One hundred and six pairs of nestlings taken from the same nests, using Aaju3, Eru2, Eru4, Eru5 e Eru6 loci, were inspected for relatedness. Our analytical procedure allowed us to identify the kinship of 55% of the pairs. Among the classified pairs of nestlings we found: 62% of full-siblings, 5% of half-siblings and 33% of unrelated nestlings. Relatedness categories found between pairs of nestlings are showing that genetic monogamy is not the only mating system, but extra-pair fertilization and brood parasitism can be occurring.

Key words: WHITE-FACED IBIS. *PLEGADIS CHIHI*. MICROSATELLITE. POPULATION STRUCTURE. KINSHIP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Locos de microssatélites heterólogos testados, a sequência de cada um dos oligonucleotídeos, repetição do motivo e a temperatura de anelamento (Ta).....	33
Tabela 2: Sexagem molecular dos indivíduos das duas populações de <i>Plegadis chihi</i>	42
Tabela 3: Locos heterólogos de microssatélites polimórficos caracterizados na espécie <i>P. chihi</i>	43
Tabela 4: Lista dos alelos e frequências alélicas em cada um dos seis locos polimórficos nas duas populações.....	45
Tabela 5: Estimativas das frequências de alelos nulos para cada loco segundo o método descrito por Oosterhout <i>et al.</i> (2004) calculada pelo programa Micro-Checker.....	46
Tabela 6: Estimativas de diversidade genética baseadas nos dados de seis locos de microssatélites heterólogos.....	47
Tabela 7: Comparação da heterozigosidade entre os sexos.....	47
Tabela 8: Valores do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) e os valores de p	48
Tabela 9: Probabilidade de ocorrência de desequilíbrio de ligação (p) entre os locos, em cada uma das populações.....	48
Tabela 10: Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total presente nas populações.....	49
Tabela 11: Valores da probabilidade de identidade (PI) e probabilidade de exclusão (PE) por loco nas duas populações.....	51
Tabela 12: Categorias de relacionamento dos pares de ninhegos amostrados dentro dos ninhos e analisados para o parentesco genético.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto de <i>Plegadis chihi</i> adulto.....	14
Figura 2: Foto de <i>Plegadis chihi</i> no período reprodutivo.....	15
Figura 3: Distribuição de <i>Plegadis chihi</i> nas Américas.....	16
Figura 4: Mapa do Brasil mostrando a localização das colônias de <i>P. chihi</i> nos municípios de Alvorada e Tapes no Rio Grande do Sul.....	29
Figura 5: Esquema da amplificação de PCR com a cauda M13	35
Figura 6: Fotografia mostrando as bandas do DNA genômico extraído em gel de agarose 1% comparadas com o marcador de peso molecular <i>MassRuler</i> TM DNA ladder (Fermentas).....	41
Figura 7: Fotografia do gel de poliacrilamida 9% mostrando os fragmentos de amplificação dos íntrons do gene CHD específicos para os cromossomos W e Z.....	42
Figura 8: Eletroferogramas mostrando o padrão de alguns dos alelos e o polimorfismo em cada um dos locos de microssatélites heterólogos utilizados nesse trabalho.....	44
Figura 9: Gráfico apresentando a distribuição dos alelos e as frequências alélicas nas duas populações.....	45
Figura 10: Eletroferograma do loco Eru6 mostrando um pico em que ficou duvidoso se o genótipo era de um homozigoto ou de um heterozigoto.....	46
Figura 11: Gráfico mostrando a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações.....	49
Figura 12: Gráfico traçado pelo programa Structure com mais alto valor de probabilidade para K=2, resultante da análise de agrupamento não-orientado (<i>burn-in</i> 10000 e 100000 réplicas.....	50
Figura 13: Gráfico apresentando o padrão alélico das populações.....	50
Figura 14: Gráfico mostrando o valor médio de parentesco entre os indivíduos das duas populações.....	52
Figura 15: Distribuição dos valores de parentesco par-a-par segundo Queller e Goodnight (1989) para pares simulados de relacionamentos (roxo – não-relacionados, marrom – meio-irmãos, verde – irmãos-completos) e com base nos dados desse trabalho (em azul).....	52

Figura 16: Gráfico apresentando as porcentagens das categorias de relacionamentos estimados nesse trabalho..... **56**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A espécie estudada: <i>Plegadis chihi</i>	13
1.1.1 Sistemática.....	13
1.1.2 Morfologia	14
1.1.3 Distribuição e Migração	15
1.1.4 Habitat e Alimentação.....	17
1.1.5 Reprodução.....	17
1.2 Caracterização Genética Populacional.....	18
1.2.1 Ameaças à Conservação de Espécies e Populações	18
1.2.2 Análise de Estruturação Genética baseada em Microsatélites	20
1.3 Parentesco Genético	20
1.4 Justificativa.....	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos Gerais	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Área de estudo: o Rio Grande do Sul.....	28
3.2 Amostras.....	28
3.3 Extração de DNA total	30
3.4 Sexagem Molecular.....	31
3.5 Amplificação dos Locos de Microsatélites e Genotipagem.....	32
3.6 Análises Estatísticas	36
3.7 Parentesco Genético	38
4 RESULTADOS	41
4.1 Extração de DNA total	41
4.2 Sexagem Molecular.....	41
4.3 Variabilidade Genética	43
4.4 Estruturação Genética	49
4.5 Parentesco Genético	50
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Sexagem Molecular.....	57
5.2 Amplificação de Locos Heterólogos	57

5.3 Variabilidade Genética	60
5.4 Diferenciação Populacional	60
5.5 Parentesco Genético	62
6 CONCLUSÃO	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

As aves aquáticas incluem espécies ecologicamente dependentes de áreas úmidas para forragear, reproduzir ou morar. Geralmente voam em grandes agrupamentos e representam um dos maiores indicadores da riqueza e da diversidade desse ecossistema. Segundo Wetlands International (2006), as famílias que abrangem aves aquáticas são: Ardeidae, Anhimidae, Anatidae, Anhingidae, Aramidae, Balaenicipitidae, Burhinidae, Charadriidae, Ciconiidae, Dromadidae, Gaviidae, Glareolidae, Gruidae, Eurypygidae, Ibidorhynchidae, Jacanidae, Haematopodidae, Heliornithidae, Laridae, Pedionomidae, Pelecanidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Podicipedidae, Rallidae, Recurvirostridae, Rostratulidae, Rynchopidae, Scopidae, Scolopacidae, Sternidae, Threskiornithidae e Thinocoridae. Nesse estudo, enfocaremos uma espécie da família Threskiornithidae denominada popularmente como tapicuru, com distribuição geográfica restrita ao sul do país.

1.1 A espécie estudada: *Plegadis chihi*

1.1.1 Sistemática

A espécie *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (tapicuru) é uma ave aquática pertencente à família Threskiornithidae, até recentemente classificada na ordem Ciconiiformes (SICK, 1997), mas revista por Chesser *et al.* (2010a) como pertencente à ordem Pelecaniformes. Nessa nova classificação, as famílias Threskiornithidae e Ardeidae foram incluídas na ordem Pelecaniformes e apenas a família Ciconiidae permaneceu na ordem Ciconiiformes (CHESSER *et al.*, 2010a). A família Threskiornithidae tem sido subdividida, de acordo com a morfologia do bico, em duas subfamílias: a Threskiornithinae (íbis) com o bico estreito e curvo, e a Plataleinae que possui o bico achatado na ponta, em forma de colher (MATHEU; DEL HOYO, 1992). A primeira inclui o guará, o tapicuru e as curicacas, enquanto que, a subfamília Plataleinae compreende os colhereiros. Essa subdivisão não tem sido evidenciada em estudos recentes baseados em dois genes do DNA mitocondrial, os quais revelam que o grupo Threskiornithinae parece ser mais basal

em relação à Plataleinae (CHESSER *et al.*, 2010b). Os primeiros fósseis desta família datam de 60 milhões de anos no Eoceno.

A maioria dos taxonomistas considera o tapicuru como espécie, *Plegadis chihi*, entretanto, outros o classificam como uma subespécie do íbis preto (*Plegadis falcinellus*) (PALMER, 1962; PARKES, 1955; MATHEU; DEL HOYO, 1992). Há controvérsias na taxonomia interna de toda a família e mais estudos são necessários para solucionar estas questões.

1.1.2 Morfologia

O tapicuru é uma ave pernalta de porte médio, o comprimento total varia de 46 a 56 cm, sua altura média é de 53 cm com peso variando entre 450 e 525 g (RYDER; MANRY, 1994). O corpo é alongado, mas robusto e o pescoço é longo. Seu bico é caracteristicamente longo, fino e curvo, perfeitamente adaptado para submergir na água ou lama. Possui plumagem de cor castanho chocolate, suas asas e cauda são coloridas de verde violáceo-purpúreo (SICK, 1997), o bico e os pés são escuros, os loros nus e a íris vermelha (Figura 1). As asas são relativamente longas e largas e permitem uma batida de voo rápido e forte. Voam em grandes bandos em longas filas ou em formações cuneiformes, o que aparentemente dá ao grupo algumas vantagens aerodinâmicas.



Figura 1: Foto de *Plegadis chihi* adulto. Nota-se a plumagem castanho chocolate; os loros nus; bico longo, fino e curvo; e a íris avermelhada.

A plumagem no período reprodutivo muda na cabeça, pescoço, parte das costas e da asa para um castanho escuro com verde metálico e bronze luminoso; a pele facial torna-se avermelhada, as asas arroxeadas e plumagem branca aparece separando a testa da face (Figura 2). A plumagem juvenil é geralmente mais escura do que a dos adultos, com pequenas partes nuas na cabeça.



Figura 2: Foto de *Plegadis chihi* no período reprodutivo. Suas asas estão coloridas de um castanho escuro, com verde e bronze metálicos, as pernas avermelhadas e a uma plumagem branca aparece separando a testa da face.

Nesta espécie há duas mudas por ciclo. A muda pré-reprodutiva tende a ser parcial, envolvendo apenas algumas áreas do corpo, enquanto que a muda pós-reprodutiva é completa (MATHEU; DEL HOYO, 1992).

1.1.3 Distribuição e Migração

Estas aves migratórias ocorrem na América do Norte nos Estados Unidos (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003) e no México (RYDER; MANRY, 1994). No período reprodutivo são encontradas nos Estados Unidos, no norte da Califórnia, leste de Oregon, sul de Idaho, oeste e sudeste de Wyoming, sul de Alberta, Montana, e norte e sul de Dakota; no México ocorrem ao noroeste de Iowa, sul de Durango, Jalisco e nos lagos Tampico e Tabasco (DARK-SMILEY E KEINATH, 2003). Na América do Sul, ocorrem principalmente na Bolívia central, Paraguai, no extremo sul do Brasil (PETRY; FONSECA, 2005; SICK, 1993), do sul até o centro do Chile, na Argentina (RYDER; MANRY, 1994) e no Uruguai (ACOSTA *et al.* 2010) (Figura 3).

Ocasionalmente ocorrem na Guatemala e na Costa Rica (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003). No Brasil podem ser avistados também nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso (SICK, 1997).

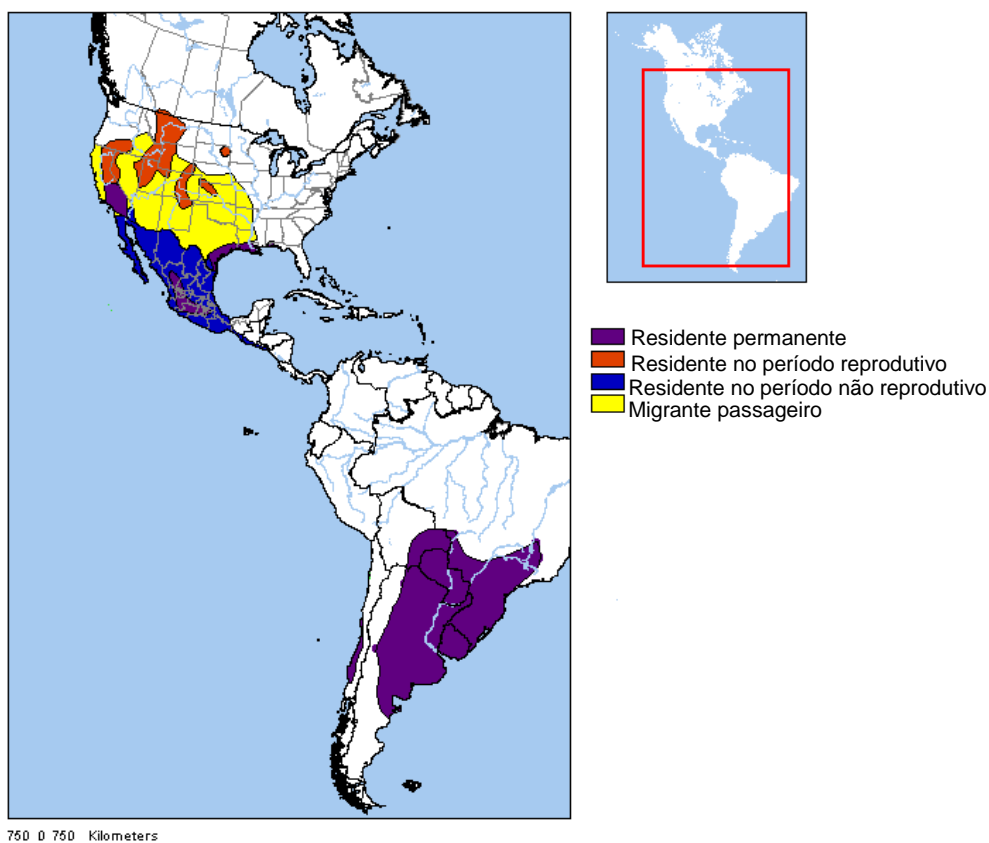


Figura 3: Distribuição de *Plegadis chihi* nas Américas
Fonte: NatureServe, 16/12/2010

O tapicuru é uma espécie altamente móbil e é considerado nômade quando não está se reproduzindo. Todas as populações de *Plegadis chihi*, após o período reprodutivo, apresentam algum movimento de adultos. No hemisfério norte, as populações dos Estados Unidos migram em direção ao sul para passar o inverno na América Central (MATHEU; DEL HOYO, 1992). Algum movimento do leste para o oeste também já foi evidenciado pela recuperação de duas aves anilhadas em Utah e Nevada, recuperadas na Califórnia (RYDER; MANRY, 1994). Há poucas informações sobre as populações desta espécie na América do sul, o que se sabe é que elas não migram, mas movimentos irregulares locais foram reportados como, por exemplo, a descoberta de aves anilhadas em Santa Fé (Argentina) encontradas no mesmo ano no Rio Grande do Sul (Brasil) (SICK, 1997). Os movimentos irregulares em níveis regionais são interpretados como uma resposta às mudanças

sazonais (padrões de chuva e níveis de água), porque esses fatores influenciam o suprimento de alimento e a disponibilidade dos locais de nidificação (MATHEU; DEL HOYO, 1992).

1.1.4 Habitat e Alimentação

Esta espécie habita principalmente ambientes alagados de água doce, como pântanos pouco profundos, lagoas e banhados, mas é encontrada também, em estuários e áreas costeiras. Prefere áreas com vegetação do tipo junco (*Scirpus* spp.) ou taboa (*Typha* spp.). Os poleiros são normalmente em árvores, mas algumas vezes no chão, podendo estar localizados a vários quilômetros de onde as aves forrageiam. Descansam em poleiros próximos ou dentro da colônia vários dias antes do início da nidificação (ALFORD, 1978).

Como as outras aves do grupo íbis são altamente gregários. Os poleiros são comunitários e os bandos se locomovem entre as áreas de alimentação, reprodução e descanso, assim como, durante a migração. Alimentam-se durante o dia, principalmente em campos inundados agrícolas (alfafa, arroz, grão, cevada e aveia) e em outros campos alagados (RYDER; MANRY, 1994). Ocupam regularmente certas áreas no inverno e durante a reprodução, mas vagueiam comumente dependendo das condições de água e alimento disponível (RYDER, 1967).

Os principais alimentos consumidos são invertebrados aquáticos, especialmente, larvas de insetos, crustáceos, minhocas, sanguessugas e moluscos, mas consomem também, pequenos peixes e plantas aquáticas. Forrageiam inserindo o bico no solo úmido ou apanhando a presa na superfície da água.

1.1.5 Reprodução

Nidificam anualmente em grandes colônias reprodutivas, formadas às vezes em companhia de outras aves aquáticas, principalmente garças e cegonhas. No Brasil costumam nidificar juntamente com *Phimosus infuscatus*. As colônias estão usualmente em vegetação emergente (taboa ou junco), em árvores baixas sobre a água rasa ou no chão, em pequenas ilhas. Colônias sobre a água ou em ilhas oferece alguma proteção contra predadores terrestres. A dinâmica dos ninhos pode

ser altamente assincrônica e, no meio de um ciclo reprodutivo, podem ser encontradas dentro de uma mesma colônia, aves fazendo a corte, outras construindo ninhos, filhotes menores e outros já voando (IVEY; SEVERSON, 1984). Os ninhos são construídos com o acúmulo de diversos materiais, tal como grama, junco e ramo.

A filopatria ao local da colônia é baixa, como a de outros íbis, pois nidificam onde encontram maior disponibilidade alimentar (RYDER, 1967). Alguns locais de colônias, entretanto, são usados repetidamente por vários anos (IVEY *et al.*, 1988). Na América do Norte, o período reprodutivo começa na primavera e se estende de abril a junho, enquanto que, na América do Sul, ocorre no período de novembro a janeiro.

O sistema de acasalamento é pouco conhecido, mas pesquisadores acreditam ser monogâmico (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003; RYDER; MANRY, 1994). A postura ocorre geralmente de manhã, em um período de cinco a oito dias (CAPEN, 1977). Cada casal produz uma ninhada por período reprodutivo, com as fêmeas colocando geralmente de três a quatro ovos por ninhada. Ninhadas com um ou dois ovos podem estar incompletos (abandonados) ou podem refletir perda de ovos não detectados (CAPEN, 1977; KANEKO, 1972; STEELE, 1980). Apenas dois filhotes sobrevivem, na maioria das vezes, principalmente devido ao tamanho da postura e as condições climáticas (frio, umidade e altas temperaturas). Os ovos são incubados durante vinte dias. Ambos os adultos participam da construção do ninho e cuidam da prole, alimentando seus filhotes através de regurgitação, até a terceira semana de vida (altriciais). Jovens usualmente voam com 28 dias e saem da colônia com seis a sete semanas de vida para forragear próximo ao ninho. A ninhada se torna independente com oito semanas de vida (KOTTER, 1970).

1.2 Caracterização Genética Populacional

1.2.1 Ameaças à Conservação de Espécies e Populações

A diversidade biológica do planeta está sendo rapidamente reduzida como consequência direta e indireta das atividades humanas. Todos os dias a biodiversidade é perdida a uma taxa 1000 vezes maior que a taxa natural,

ultrapassando a velocidade com que novas espécies são descobertas. A extinção de espécies e de populações se deve principalmente à destruição do habitat, à mudança da paisagem com o crescimento da agricultura, à super exploração dos recursos naturais, à poluição e ao aumento de espécies invasoras. Mudanças climáticas induzidas por humanos também contribuem para acelerar essas perdas, alterando o padrão de migração das aves e outros comportamentos. Estatísticas demonstram que a abundância de espécies no mundo diminuiu em 40% entre os anos de 1970 e 2000. Espécies presentes em rios, lagos e pântanos declinaram ainda mais (50%). Essa maior susceptibilidade das espécies dessas áreas ocorre porque as áreas alagáveis estão entre os ecossistemas mais biodiversos do mundo e estão entre os mais ameaçados (IUCN, 2010).

A América do Sul possui o maior contínuo de áreas alagáveis do mundo, com aproximadamente 1.000.000 Km² (NEIFF, 2001). No sul do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul contém uma das maiores diversidades de aves aquáticas do país, tendo sido registradas 123 espécies pertencentes a 20 famílias (VELEZ, 1997), o que corresponde a 14,8% das espécies de aves aquáticas do mundo (ROSE; SCOTT, 1994). Parte desta diversidade é explicada pelo fato do estado estar no caminho de uma importante rota migratória de aves (BELTON, 1994) e parte por possuir grandes áreas alagáveis.

A aplicação de ferramentas pela genética da conservação permite resolver questões práticas como definir as unidades de manejo dentro dos limites da distribuição de uma espécie e, identificar populações em risco, caso esteja ocorrendo redução da diversidade genética (FRANKHAM *et al.*, 2004). Esta área do conhecimento também contribui para o entendimento da biologia das espécies, com o esclarecimento de detalhes importantes das histórias de vida dos organismos, como por exemplo: seu sistema de acasalamento, a fonte de novos fundadores, indicação de locais de reintrodução, taxas de dispersão (FRANKHAM, 2004), parâmetros esses difíceis de serem determinados de maneira direta, pela observação.

1.2.2 Análise de Estruturação Genética baseada em Microssatélites

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações. Esta estrutura é determinada pela somatória da ação de diversos fatores que acentuam as diferenças ou homogeneizam as populações: mutação, migração, seleção e deriva genética. Em populações naturais, outros fatores podem influenciar na distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações, entre os quais podemos destacar as barreiras ambientais, os processos históricos e os históricos de vida (TEMPLETON, 2006), além do sistema de acasalamento, tamanho populacional e estrutura etária dos indivíduos (AVISE, 2006).

A determinação da estrutura genética das populações pode ser obtida com o uso de marcadores moleculares. Uma grande variedade desses marcadores está disponível para análises genéticas, por exemplo: alozimas, DNA mitocondrial, AFLP (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNP (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*), RAPD (do inglês, *Random Amplification of Polymorphic DNA*), microssatélites e minissatélites. Dentre os critérios considerados na escolha desses marcadores estão às características da espécie em estudo, o problema a ser abordado e a disponibilidade de tempo e dinheiro por parte do pesquisador (SCHLÖTTERER, 2004).

Os microssatélites são os marcadores genéticos mais comumente utilizados nesse tipo de análise e foram escolhidos para ser empregado neste trabalho. Os microssatélites são constituídos de pequenas unidades repetidas e justapostas (de um a seis pares de bases), com distribuição uniforme por todo o DNA nuclear (TAUTZ, 1989). Estas unidades repetitivas podem ser constituídas de dímeros, trímeros, tétrades e ainda uma combinação destes (compostos).

A popularidade dos microssatélites se deve a sua taxa alta de polimorfismo e à codominância que permite a fácil distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos para um determinado loco (ZANE *et al.*, 2002). Além disso, esses marcadores são considerados seletivamente neutros, no sentido de que não codificam, na maioria dos locos, nenhum produto que é visualizado pela seleção natural, permitindo a avaliação da variabilidade genética individual e populacional,

do fluxo gênico e da estrutura populacional (SELKOE; TOONEN, 2006; WEBSTER, 2002).

A análise dos locos de microssatélites, é realizada por meio da técnica de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) (POWELL *et al.*, 1996), utilizando oligonucleotídeos iniciadores complementares (de 18 a 30 pares de bases) às regiões que flanqueiam as sequências que apresentam a variação (HOSHINO *et al.*, 2002). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentre os indivíduos de uma mesma espécie e até mesmo entre espécies filogeneticamente próximas (MORGANTE; OLIVIERI, 1993).

Este marcador apresenta uma taxa alta de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, sendo que a maioria são ocasionadas por alterações no número das unidades repetitivas (EISEN, 1999). Esta instabilidade é explicada pelo mecanismo específico de mutação chamado deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) que ocorre durante a replicação do DNA e que conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições (TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994). Outro fator que pode explicar porque essa taxa de mutação é alta nos microssatélites é o fenômeno de *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas sequências nos quiasmas (EISEN, 1999).

Frequências alélicas determinadas nos locos dos microssatélites embasam a caracterização genética de populações, sem que se conheça seu tamanho, densidade e sem que se saiba se a espécie está estruturada em *demes* definidos ou se apresenta uma distribuição mais ou menos contínua (SLATKIN, 1985).

Informações acerca da distribuição da variabilidade genética nas populações são de fundamental importância para a definição de Unidades de Manejo (UM) da espécie ao longo da sua área de distribuição. O nível de isolamento entre as populações de uma espécie implica em estratégias de manejo distintas. Se as populações estão isoladas, medidas precisam ser tomadas no sentido de se garantir a manutenção de todas as adaptações locais. Por outro lado, se há fluxo intenso entre as populações, um enfoque menos abrangente poderá ser adotado visando manter a qualidade do habitat (SOLÉ-CAVA, 2001).

1.3 Parentesco Genético

Estimativas do grau de parentesco genético são feitas entre indivíduos nos estudos de biologia, em populações naturais, quando se objetiva responder questões relativas: ao reconhecimento entre parentes, seus sistemas de acasalamento, os padrões de dispersão de gametas e indivíduos, o grau de vagilidade e de filopatria, a dispersão sexo-diferencial e os processos populacionais histórico-demográficos (AVISE, 2004).

Um aspecto importante da biologia reprodutiva das aves refere-se aos tipos de seus sistemas de acasalamento. Quatro tipos principais de sistemas foram propostos, conforme o número de fêmeas ou machos por unidade reprodutiva (EMLEN; ORING, 1977; SHUSTER; WADE, 2003): a monogamia, com uma fêmea e um macho por unidade reprodutiva; a poligamia, incluindo mais de uma fêmea (poliginia e poliginandria) ou mais de um macho (poliandria e poliginandria); e o sistema promíscuo, no qual não se estabelece uma união estável entre os membros dos dois sexos. A maioria das espécies de aves é considerada socialmente monogâmica, ou seja, um indivíduo une-se somente a um parceiro durante um determinado ciclo reprodutivo (LACK, 1968). Na espécie *Plegadis chihi*, o sistema de acasalamento é descrito como socialmente monogâmico (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003), embora essa informação esteja baseada apenas em observação ecológicas.

A fertilização extra-par (PEP) pode ser comum entre as aves socialmente monogâmicas (GRIFFITH *et al.*, 2002) e é definida como a produção de uma progênie com mais de um parceiro. A fertilização extra-par entre indivíduos de *Plegadis chihi* ainda não foi reportada (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003; RYDER; MANRY, 1994). Outro tipo de comportamento que pode acontecer durante o ciclo reprodutivo é o do parasitismo de ninho intraespecífico (PNI), que ocorre quando uma fêmea faz postura de ovos em ninhos de outras fêmeas da mesma espécie (ZINK, 2000). O tamanho comum das ninhadas em *P. chihi* é de 3-4 ovos, portanto, ninhadas apresentando de seis a oito ovos podem ser indicativas de parasitismo intraespecífico (KANEKO, 1972; KOTTER, 1970). Ovos co-específicos depositados experimentalmente nos ninhos foram aceitos e encubados pelos “pais” (KOTTER, 1970).

As técnicas da genética molecular permitiram evidenciar que o número de parceiros sociais nem sempre corresponde ao número de parceiros sexuais (GRIFFITH *et al.*, 2002). Em aves, estudos das relações de parentesco baseados em ferramentas da genética molecular têm auxiliado na investigação e caracterização dos sistemas de acasalamento de várias espécies (AVISE, 1996). Esses resultados têm demonstrado que as estratégias reprodutivas das aves são bem mais complexas do que se pensava anteriormente com inferências baseadas apenas em observações comportamentais (LIGON, 1999).

O uso de marcadores moleculares tornou-se necessário para se conhecer os genótipos dos indivíduos envolvidos e se calcular o grau de parentesco entre eles (BLOUIN, 2003). Os microssatélites são considerados marcadores ideais para estimar o parentesco e se estudar sistemas genéticos de acasalamento em populações naturais (BLOUIN, 2003). Esse marcador tem sido escolhido porque apresenta alto grau de polimorfismo (TAUTZ, 1989) e possui herança biparental e codominante, permitindo a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, possibilitando comparações diretas dos genótipos entre indivíduos relacionados.

Em termos da conservação de espécies e populações, as estimativas de parentesco genético têm tido uma aplicação prática, auxiliando programas de translocação de populações naturais e de manejo em cativeiro e, dessa forma, contribuindo para a preservação da variabilidade genética desses grupos (LACY, 1994; RUSSELLO; AMATO, 2004; DE WOODY, 2005). Além disso, o parentesco genético tem sido investigado pela sua relação com a escolha de parceiros e a fuga da endogamia (LEHMANN; PERRIN, 2003; PUSEY; WOLF, 1996), com a dinâmica evolutiva populacional (QUADER, 2005), com a especiação (GRIFFITH, 2010) e com questões relativas à maneira em que as populações lidam com a fragmentação do habitat, à sua susceptibilidade às doenças, ao tamanho populacional efetivo, à reprodução em cativeiro (CARO, 1999) e até para definir unidades de manejo (UM) (ØKLAND *et al.*, 2009).

Há uma grande variedade de métodos estatísticos e programas computacionais que estimam o grau de parentesco entre os indivíduos com base na informação genética dos locos de microssatélites (MIÑO, 2010; PEMBERTON,

2008). Todos os métodos baseiam-se nas diferentes probabilidades com que dois indivíduos aparentados podem compartilhar alelos por “identidade-por-descendência” (IBD, do inglês, *identity-by-descent*). Dois alelos que descenderam recentemente (umas poucas gerações atrás) de um mesmo alelo ancestral são denominados “idênticos por descendência”.

1.4 Justificativa

A espécie *Plegadis chihi* de acordo com a IUCN, não está globalmente ameaçada e é abundante no Brasil. É uma espécie aquática, altamente dependente da disponibilidade de áreas alagáveis para sua reprodução e seu forrageamento. Foram contados 12.000 pares reprodutivos na Estação do Taim, no sul do país (SICK, 1993). Acosta *et al.* (2010) relata a ocorrência de 7.925 indivíduos contados em arrozais no Brasil. Como a área de nidificação e forrageamento desta espécie no Brasil está restrita a um estado do sul do país que passa por grandes transformações pelo avanço da rizicultura, é importante que essas populações sejam caracterizadas para que possam ser monitoradas caso haja grandes alterações no seu habitat.

Durante as décadas de 60 e 70 as populações de tapicuru declinaram bruscamente na América do Norte, devido ao uso de pesticidas organoclorados e à perda de áreas úmidas, provocada pela seca e drenagem (RYDER, 1967). Esse fato é um alerta para a sobrevivência da espécie em outros locais do continente como o sul do Brasil, uma região cuja paisagem tem sido grandemente modificada pela expansão das atividades de agricultura.

Para se selecionar uma estratégia de conservação e manejo mais adequada para populações que vivem em ambientes ameaçados é importante se ter um sólido entendimento de sua diversidade genética (SCHWARTZ *et al.*, 2007). A definição de uma estratégia de conservação para populações que vivem, por exemplo, em áreas alagáveis são mais facilmente definidas quando se conhece seus níveis atuais da diversidade genética e como eles estão distribuídos nas populações.

Estudos investigando a diferenciação genética entre populações de colônias ou regiões não foram ainda desenvolvidos nessa espécie. Como outros íbis, os

tapicurus abandonam o local onde as condições para a reprodução são desfavoráveis e se dispersam para outras áreas disponíveis. A proximidade geográfica das colônias extintas e novas sugere que um evento de extinção é seguido por um de recolonização. Essa possível dinâmica metapopulacional das colônias de tapicuru não foi ainda investigada. Considerando a ampla distribuição dos ibises e sua baixa filopatria natal, espera-se encontrar um alto grau de miscigenação entre as populações regionais ou vizinhas (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003).

Como não foram descritos locos de microssatélites na espécie, serão usados locos descritos nas espécies filogeneticamente próximas (amplificação heteróloga) (MOORE *et al.*, 1991). Serão usados locos descritos para as famílias Threskiornithidae, Ardeidae e Ciconiidae. A taxa de sucesso da amplificação heteróloga tem mostrado estar diretamente relacionada à distância genética entre a espécie em que o loco foi isolado (a espécie original) e a espécie na qual o loco foi aplicado (a espécie alvo). Muitos trabalhos estão utilizando a amplificação heteróloga entre espécies próximas (ESTOUP *et al.*, 1993; FIELDS; ACRIBNER, 1997; ISHIBASHI *et al.*, 2000; JOHNSEN *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 1991; PAINTER *et al.*, 1997; PALO *et al.*, 2001; PRIMMER *et al.*, 2005; ZARDOYA *et al.*, 1996).

Em termos de estimativas do grau de parentesco genético entre indivíduos, a falta de correspondência entre a monogamia social e a monogamia genética detectada na maioria das espécies de aves comprova que inferências sobre o sistema genético de acasalamento de aves não podem ser feitas com base somente no sistema social de acasalamento (MIÑO, 2006). Embora numerosos estudos tenham sido conduzidos para se investigar sistemas genéticos de acasalamento em aves, a maioria foi realizada em espécies de Passeriformes que ocorrem em regiões temperadas. Os poucos artigos ecológicos (GILL *et al.*, 2007; STUTCHBURY *et al.*, 2007) e genéticos (CAPARROZ, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006) disponíveis em aves Neotropicais demonstram que os seus sistemas de acasalamento são também complexos e variáveis.

Na espécie *Plegadis chihi*, o sistema de acasalamento é descrito como socialmente monogâmico, embora essa informação esteja baseada apenas em observação ecológicas. Evidência de parasitismo de ninho também foi evidenciada, mas estudos genéticos confirmando tais hipóteses são inexistentes. Caso o parentesco entre os ninhegos esteja dentro do valor teórico esperado para irmãos-completos, a hipótese de monogamia genética será confirmada. Contudo, se os valores de parentesco diferir significativamente do esperado para irmãos-completos, a hipótese de um sistema de acasalamento apenas monogâmico será descartada e outras causas serão supostas.

As aves aquáticas neotropicais têm sido pouco estudadas do ponto de vista da caracterização genética das populações e dos seus sistemas de acasalamento. Estudos com esses enfoques nas populações brasileiras de aves aquáticas pertencentes às ordens Pelecaniformes e Ciconiiformes têm sido desenvolvidos, mediante o uso de marcadores moleculares, no Laboratório Genética de Aves da UFSCar. Da família Threskiornithidae, apenas o colhereiro (*Platalea ajaja*) foi previamente estudado (LOPES *et al.*, 2007; MIÑO, 2006; MIÑO; DEL LAMA, 2009; SANTOS *et al.*, 2008). Os resultados nessa espécie confirmaram baixa estruturação genética e a ocorrência de filhotes meio-irmãos e não-relacionados nos mesmo ninhos (MIÑO, 2010). Não foi descrito nenhum estudo genético populacional na espécie *Plegadis chihi*, deste modo, o presente trabalho visa ampliar os estudos na espécie que são de fundamental importância para a conservação das populações brasileiras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Nosso objetivo geral foi caracterizar geneticamente as populações de duas colônias reprodutivas de *Plegadis chihi*, localizadas na região sul do país, com base nos genótipos levantados nos locos de microssatélites heterólogos. Foram determinados os níveis de diversidade e estruturação genética das populações e estimada as relações de parentesco entre os filhotes amostrados nos mesmos ninhos dessa espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar os locos de microssatélites heterólogos polimórficos para se montar um painel, a ser usado nesse estudo;
- b) Estimar os níveis de diversidade genética a partir dos genótipos nos locos de microssatélites, determinados em amostras populacionais que incluíam apenas um filhote/ninho;
- c) Realizar a sexagem molecular e calcular a razão sexual das duas populações estudadas e dentro dos ninhos;
- d) Verificar se as populações localizadas no estado do Rio Grande do Sul estão estruturadas geneticamente ou se ocorre fluxo gênico entre elas;
- e) Estimar as relações de parentesco entre os filhotes coletados nos mesmos ninhos em uma população natural da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo: o Rio Grande do Sul

O estado do Rio Grande do Sul ocupa uma área de 282.062 km², sendo banhado ao leste pelo oceano Atlântico. Possui ainda 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. A região destaca-se pela importância de seus banhados e áreas úmidas marginais, que são responsáveis pela extensa cadeia alimentar e rica biodiversidade (GETZNER, 2002).

O estado também é um dos principais produtores de arroz irrigado do Brasil, cultivando anualmente cerca de 900.000 ha deste cereal (AZAMBUJA *et al.*, 1996). Além de destruir e fragmentar habitats (70% das áreas tem menos que 1 km), o cultivo requer um volume expressivo de água para irrigação e o emprego sistemático de adubos, inseticidas e herbicidas, impactando substancialmente os ecossistemas naturais. Embora algumas espécies de aves tenham declinado com a expansão da rizicultura irrigada, outras se beneficiaram dos recursos existentes nesses banhados artificiais. Diversos estudos demonstraram a importância da rizicultura irrigada para a avifauna, principalmente como local de forrageamento, descanso e, em menor escala, reprodução (FASOLA; RUIZ, 1996). Uma das espécies mais abundantes, independentemente do sistema de cultivo, é o tapicuru (DIAS; BURGER, 2005).

3.2. Amostras

No total foram coletadas 247 amostras de pena em crescimento (pena canhão) e de músculo de filhotes de tapicuru em duas colônias reprodutivas no estado do Rio Grande do Sul. Durante o ciclo reprodutivo ocorrido em dezembro de 2008, foram coletadas amostras de pena em crescimento de 52 filhotes em uma colônia localizada no município de Alvorada/RS (29°58'54"S; 51°05'11"O). Em janeiro de 2010 foram obtidas 181 amostras de pena em crescimento e 14 amostras de tecido muscular em outra colônia reprodutiva, localizada no município de Tapes/RS (30°41'12"S; 51°23'53"O) (Figura 4). Na primeira coleta, foi amostrado

apenas um ninhego de cada ninho, totalizando 52 ninhos. Na coleta realizada em Tapes foram amostrados 87 ninhos: em sete ninhos foi amostrado apenas um ninhego, em 66 ninhos foram amostrados dois ninhegos e em 14 ninhos, três ninhegos.

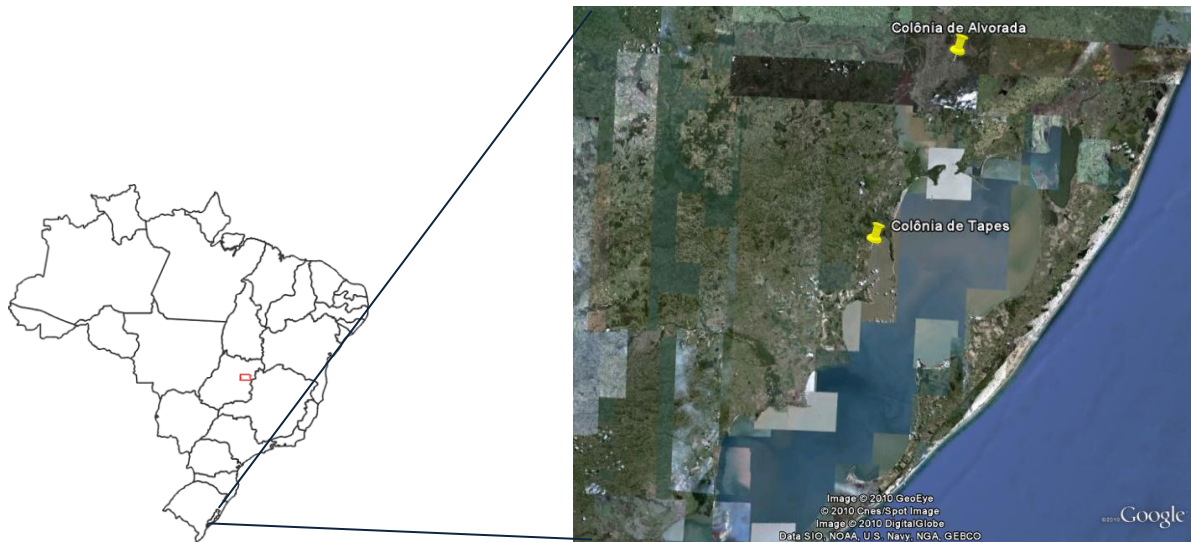


Figura 4: Mapa do Brasil mostrando a localização das colônias de *P. chihii* nos municípios de Alvorada e Tapes no Rio Grande do Sul.

As penas em crescimento cheias de conteúdo celular foram retiradas da parte axial da asa dos filhotes e as amostras de tecido muscular foram obtidas de filhotes mortos encontrados dentro dos ninhos. Cada ninhego foi retirado manualmente do ninho, anilhado, a pena em crescimento retirada e colocada em tubo com etanol 70%. Os filhotes amostrados tinham cerca de duas semanas de vida e por isso, não tinham mobilidade para se locomover entre ninhos, mas possuíam idade suficiente para que a retirada das penas. Após o manuseio, cada filhote foi devolvido ao seu ninho. As amostras de músculo foram coletadas dos filhotes mortos dentro dos ninhos e colocadas em etanol 70%.

Neste trabalho, cada colônia reprodutiva foi considerada inicialmente como sendo uma unidade populacional ou *deme*. Nas análises populacionais, cada amostra populacional foi formada a partir de amostras de um ninhego/ninho. Para as estimativas de parentesco genético, incluímos somente os ninhos em que tinham sido amostrados mais de um ninhego, todos procedentes da colônia de Tapes.

3.3 Extração de DNA total

O procedimento de extração do DNA total, assim como, toda a parte prática foi realizada no Laboratório Genética de Aves da UFSCar. Para a obtenção de DNA total a partir do conteúdo do interior das penas em crescimento e das amostras de músculo foi utilizada a mesma metodologia. O protocolo de extração iniciou-se colocando uma mistura homogeneizada de 100 µl do conteúdo das penas ou pequenos pedaços do tecido muscular, 300 µl de tampão de lise (10 mM de tris-HCl, pH 8,5 e 50 mM de KCl) e 20 µl de proteinase K (10 mg/ml) em tubos e, posteriormente, inseridos no banho-maria por três dias a 37°C. A cada dia foi adicionado mais 20 µl de proteinase K em cada um dos tubos.

A partir desse passo inicial foi utilizado o protocolo proposto por Sambrook *et al.* (2001), com modificações descritas a seguir. Após a retirada das amostras do banho-maria, adicionou-se 360 µl de fenol em cada tubo, as misturas foram agitadas durante 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm. O passo anterior foi repetido mais uma vez, adicionando 350 µl de fenol. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e 300 µl da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada, agitados por 10 minutos e centrifugados durante 10 minutos à 12000 rpm. Aos sobrenadantes foram acrescentados 300 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitados por 10 minutos e centrifugados durante 10 minutos à 12000 rpm. Os sobrenadantes resultantes deste último passo foram transferidos para novos tubos e adicionado acetato de sódio 3M (10% do volume), e em seguida, etanol absoluto gelado (250% do volume). Os precipitados após a centrifugação foram lavados com álcool 70% duas vezes e deixados à temperatura ambiente até secar. O DNA foi resuspendido em 100 µl de água destilada estéril e armazenado a 4°C.

Para se verificar a integridade e a quantidade de DNA obtido, foi realizado eletroforese em gel agarose 1% na presença de brometo de etídio (0,8 mg/µl) e quantificado visualmente por comparação com o marcador padrão *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) em um transluminador. Para determinação exata das concentrações, todas as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare), utilizando-se 1µl da solução aquosa de DNA estoque.

Após esse passo, as soluções de DNA estoque foram diluídas em água estéril, a fim de se obter uma concentração de 40 ng/μl.

3.4 Sexagem Molecular

Neste trabalho, foi realizada sexagem molecular segundo o método proposto por Griffiths *et al.* (1998) para quase todas as classes de Aves (exceção Ratitas), empregando-se dois oligonucleotídeos: P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'). Estes oligonucleotídeos hibridizam na região dos éxons, que é conservada, e que ladeia um íntron no gene CHD-W e CHD-Z. Como os íntrons Z e W não são iguais em tamanho nos dois cromossomos, o resultado da amplificação é um fragmento que difere no tamanho: o macho apresenta dois fragmentos idênticos e as fêmeas, dois fragmentos de tamanhos diferentes (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

A PCR para amplificação do fragmento intrônico tipo W e Z foi realizada num volume final de 16 μl, contendo: 30 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada oligonucleotídeo, 1U da enzima *Taq* polimerase (Biotools) e H₂O. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), com um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 3', seguido de 30 ciclos de 95°C à 30", 49°C à 30" e 72°C durante 45", finalizando com uma extensão de 72°C por 5'.

Para a separação dos fragmentos amplificados, foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida 9% aplicando-se 3 μl do produto de PCR e 7 μl do marcador de peso molecular. Após 5 horas de corrida a 200 V, o gel foi retirado da cuba vertical e corado para a visualização das bandas. O gel de poliacrilamida foi mergulhado inicialmente em 200 ml de solução fixadora, agitado durante 10 minutos e lavado em água corrente três vezes. Posteriormente, o gel foi colocado em 200 ml da solução de nitrato de prata (0,15%), agitado e lavado em água corrente três vezes. Por último, o gel foi mergulhado em uma mistura de 200 ml de solução reveladora (1,5%) e 2 ml de formaldeído (37%), e as bandas foram visualizadas no gel.

Após a sexagem de todas as amostras, foi calculada a razão sexual em cada uma das populações e dentro dos ninhos com dois ou três filhotes. A razão sexual,

expressa pela proporção dos machos pelo total de indivíduos sexados (0,5), foram testados segundo o teste de qui-quadrado no programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

3.5 Amplificação dos Locos de Microssatélites e Genotipagem

No presente trabalho foram testados 44 locos de microssatélites heterólogos sintetizados para espécies pertencentes às famílias: Threskiornithidae, Ardeidae e Ciconiidae (Tabela 1). As espécies originais dos locos testados dentro da família Threskiornithidae foram *Eudocimus ruber* (SANTOS *et al.*, 2005), *Platalea ajaja* (SAWYER, 2002) e *Nipponia nippon* (JI *et al.*, 2004). Os demais locos utilizados foram sintetizados para as espécies *Mycteria americana* (TOMASULO-SECCOMANDI *et al.*, 2003) da família Ciconiidae e *Ardea herodias* (MCGUIRE; NOOR, 2002) e *Bulbucus ibis* (CAMPANINI *et al.* 2010), da família Ardeidae.

Os protocolos inicialmente usados nas reações de PCR e as condições de amplificação no termociclador foram os descritos nos artigos que descreveram os locos e os oligonucleotídeos (JI *et al.*, 2004; MCGUIRE; NOOR, 2002; SANTOS *et al.*, 2005; SAWYER, 2002; TOMASULO-SECCOMANDI *et al.*, 2003). Todas as reações foram feitas em uma capela de fluxo laminar de uso exclusivo para esta finalidade, com todos os objetos manuseados esterilizados. Além disso, um controle negativo (sem DNA) foi incluído em todas as reações de PCR.

Tabela 1: Locos de microssatélites heterólogos testados, a sequência de cada um dos oligonucleotídeos, repetição do motivo e a temperatura de anelamento (Ta).

Espécie original	Locos testados	Sequencia do primer (5'-3')	Repetição	Ta (°C)
<i>P. ajaja</i>	Aaju1	F: GATCACCACCATCTTAAATGATAA R: CTTCTGTTTGCCTCACATGG	(GAT) ₁₅	55
	Aaju2	F: CTTGATGCAAAGGAAACATCC R: GAGGTGCTTCCAGTTTCCTG	(AACT) ₁₃ TA(CTTT) ₆ CT(CTTT) ₃	55
	Aaju3	F: CCCATGGCCACATTATAAACTT R: GCTCTGGAGTAACTTGCTGGA	(GAT) ₁₃	55
	Aaju5	F: GGCTGAACACTGTTGTGCTCT R: GAACCAAGCCTCCCTGAATA	(GAT) ₁₆ (TAT) ₄	58
<i>N. nippon</i>	NnNF5	F: TTTGAAGGCAGGTGGAGAAGT R: AGCTGAAAAGAAGATAATTAGGA	(TAGA) ₂ TA(CA) ₈	57
	NnCE11	F: GAGTAGCAGAAGCGTGAGT R: GGGTGGCACAAGGGTGTC	(CTG) ₈	59
	NnHB12	F: AAAGACGGTGGTGACAGGA R: TCTGCTGTACCTTTTGGGGA	(GT) ₈	59
	NnDD9	F: GAACTGCTTTTGGCCAGGA R: TAGGGTTGGAATATGTTAAGA	(CAT) ₇	59
<i>E. ruber</i>	Eru2	F: TTTGACAGAGCCTCAAGCTG R: GCATTTCTCTCCCCATATCTCC	(GA) ₇ (A) ₄ (GA) ₁₀	53
	Eru3	F: GGAAGAGCATTAAAAAGG R: AGCCTGGAAGTAGCATTGG	(AG) ₂₁	53
	Eru4	F: AGTATACCATAAGATTTCCCTTTGC R: GTGATAGATGGGCCGATAG	(TC) ₁₁ (C) ₃ (TC) ₉	62,5
	Eru5	F: TTTAGCAGCAACTTAGGTTTATTCAC R: TGCGCATATCAAACCTGTGAG	(CA) ₁₅ (AT) ₂ (CA) ₃	65
	Eru6	F: TTCTGTTGCTCTTGGCTTCC R: AATGAGTGGCCTGGAGAAAG	(CT) ₂₀	57
	Eru7	F: ACAATTCCGCTGAGAAAAGC R: GAGGCAGCTCAGGTAATTGG	(CT) ₆ AG(CT) ₆ TC(CT) ₁₀	62,5
	Eru8	F: CGCAGTCTTGACAGTGTGTG R: TTCCCTGTCCTCACCAAAG	(GA) ₈ GCAAGT(GA) ₉	63
	Eru9	F: TTTCAATTGCTTGCACATCC R: CAGCGTAGTGTACCCTGTG	(GA) ₂₄	62,5
	Eru10	F: CGGCCAGTGAATTGTAATACG R: GCCAGCAAACCTGGAGTG	(GAAGA) ₁₈	48
	Eru11	F: ACTGGGACCGAGATGTTGAC R: TGTCCAGCTTCGTTTCACTG	(AG) ₁₀	62,5
	<i>A. herodias</i>	Ah211	F: GCTCATCAGGAGTTGAATCTGGC R: TCTGTCATTACAGCAATGGACC	(CA) ₁₃
Ah217		F: GCTCAGGCTCTGCTTTGTCTAC R: CACAGATTCAAACAAGCACCATGC	(CA) ₁₀	59
Ah320		F: AGGAGCAAGATTTTAAAGAAGGTGC R: AAGTGCTGGGTCATACTGGAATAG	(AC) ₁₃	57,7
Ah414		F: CATTCCAGCTGCTCTTCATTCTTG R: GGCAAAGCAACTAGGGGC	(AC) ₂₂	57,9
<i>M. americana</i>	WS3	F: AGAAGCCAAATTGATTAGA R: ACAAAGTTGCGGAGAA	(AG) ₁₂	60
	WS4	F: TCATGTGTACACATAGGAAAAAGT R: GGCAAAGCAACTAGGGGC	(GT) ₁₅	60
	WS8	F: TGTCTTTCCAGGTAGTTTT R: TACAACGTTCGTGCTTT	(AC) ₉	60
	WS9	F: GGTAACAGCGAGTTGGAT R: TAATGCCAATAAGTGCTTAG	(AAC) ₇	60

WS13	F: AGGGCTCATCAATAGTGT R: GTTTGCCCACTGTGTCAACT	(AC) ₁₀	60
WS14	F: AAATGAGCACGGTATT R: GTTTCTGTGTTAGTGGCTAAG	(AAGG) ₇	60
WS18	F: CATATACTAACTGGGTTTAATC R: GTTGTTCTGCGTTATTC	(AAGG) ₆ (AAAG) ₅ (AAGG) ₈	55
WS23	F: TTTTGGTGGGATTCATA R: ATAAAAGGGTTAGAAAGACT	(AGAT) ₆	55
WS24	F: GTAAGGCATGAGAGACTAAG R: GTGTGATTTAGGATTGTT	(AG) ₁₃	55
Bi1	F: GAGCCCAGTGAATTGTTTAG R: GAGAGTGGCAGGTGTATAGG	(GT) ₁₁	57
Bi2	F: GGAGTCTTGAAAGGTCTTCC R: TGATGGAAGTACTGAACCCT	(TC) ₅	57
Bi5	F: ACAGATACTACCAAACCCCA R: TGCAAACCTACACTGAAAGA	(TTTG) ₄	56
Bi6	F: AAGACCTTCTCTTCCCACTC R: ATGGTTCAGATCCTGAGATG	(AGC) ₄	58
Bi7	F: GCATGCTGTAGTACTTTGAGTT R: GGAATAGTGGGACCAACAG	(TA) ₅	56
Bi8	F: AGTCAGCTCTTGCCTCTCTC R: AACTCAAAGTACTACAGCATGC	(TTGG) ₄	59
B. ibis Bi9	F: CGAAGAGCGGAGGAAATC R: CTCTCCGGGCTCATCACA	(CT) ₄ (TTC) ₂ (TC) ₄	58
Bi10	F: GATTCAGGGTGCCAACTT R: CGGATGCTAATCAAATACCT	(AC) ₅ AA(AC) ₄	58
Bi11	F: TGCTGTTTAGAGGGACCTAA R: GTTACGGTTCAGAAATACCC	(GT) ₄	60
Bi12	F: CAGCTGAGCAAACACCTTG R: TCGCAGTTTGCATATACTCTG	(CA) ₄ (TC) ₂	59
Bi13	F: CTAATCCCGTATTCCCTTT R: CACAGGCAGATGAGCAGTG	(AC) ₄ (CT) ₂ (GT) ₂	59
Bi14	F: CCTAGATTCTAACCATTGCC R: GAACTGAGGCTGTCTGGAC	(CA) ₂ (TC) ₄	48
Bi15	F: GGGCTTGTATGATGAACTTT R: TTTCTCCACTCTAGTTGCTGT	(TTCC) ₂ (AG) ₄	56

Houve uma adição de 18 pb em todos os oligonucleotídeos iniciadores *forward*, referente a cauda do M13.

As reações de PCR foram, em seguida, otimizadas para cada um dos oligonucleotídeos, variando-se as concentrações dos componentes (MgCl₂, DNA, dNTP, oligonucleotídeos e *Taq* polimerase) e a temperatura de anelamento. O termociclador utilizado em todos os testes foi o Eppendorf Mastercycler Gradient® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e o rendimento dos produtos da PCR foi avaliado em eletroforese com gel de agarose 1%.

Foi utilizado um sistema capilar com detecção a laser para a identificação dos genótipos dos indivíduos a partir do tamanho dos produtos amplificados. Para isso, nas reações de PCR, um dos oligonucleotídeos (*forward* ou *reverse*) devem estar

marcados com alguma fluorescência [6-carboxi-fluorescine (FAM), hexacloro-6-carboxi-fluorescine (HEX) ou tetracloro-6-carboxi-fluorescine (TET)]. Neste trabalho, utilizou-se o método de Schuelke (2000) que usa na amplificação dos produtos de PCR um oligonucleotídeo iniciador que não é marcado, mas leva uma cauda complementar ao M13 que é marcado com fluorescência, podendo o mesmo M13 ser utilizado com vários marcadores. Essa técnica barateia o custo da síntese dos oligonucleotídeos.

Deste modo, em cada reação de PCR foram incluídos três oligonucleotídeos: um oligonucleotídeo *forward* de sequência específica com a cauda complementar ao M13 na ponta 5', um oligonucleotídeo *reverse* de sequência específica e um oligonucleotídeo com fluorescência (M13) de sequência universal (Figura 5). Com esse procedimento, a quantidade de oligonucleotídeo iniciador *forward* nas reações de PCR é menor que a metade do oligonucleotídeo iniciador *reverse*. Os locos descritos para a espécie *Platalea ajaja* já possuíam a fluorescência FAM ligada ao oligonucleotídeo *forward*, portanto, não foi necessário adicionar o M13 fluorescente à reação.

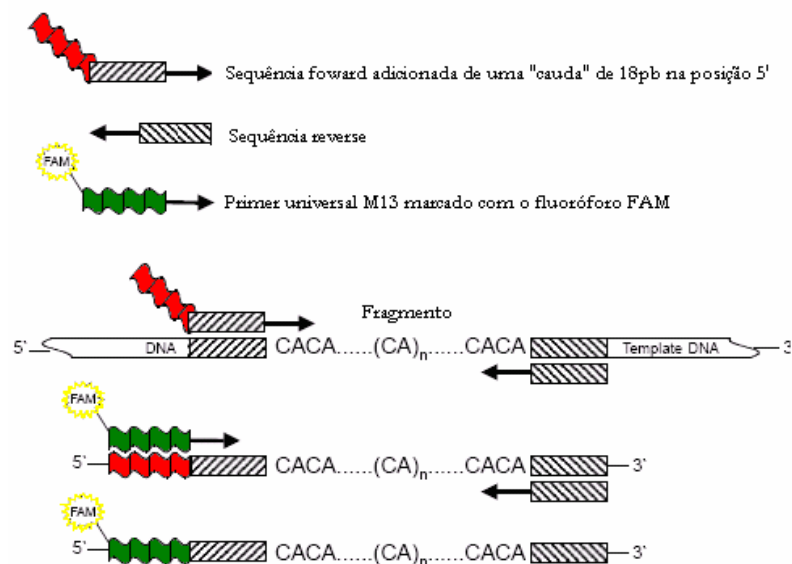


Figura 5: Esquema da amplificação de PCR com a cauda M13 (Schuelke, 2000).

Com a finalidade de se verificar a ocorrência de polimorfismo nos locos testados foram genotipados em média, 20 indivíduos, que amplificaram nas reações de PCR. Para isso, os produtos de PCR foram diluídos até 20x, dependendo do rendimento, e colocados em uma placa de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 2

μl do produto de PCR diluído, 8,2 μl de Tween 0,1% e 0,26 μl do marcador ET550-R Size Standard (MegaBace™, GE Healthcare), exigido pelo sequenciador.

A separação dos fragmentos e a leitura da fluorescência incorporada nos fragmentos foi realizada pelo sequenciador automático MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences). Os eletroferogramas resultantes da genotipagem foram analisados no programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science), com a utilização de um filtro de pico definido para cada loco com os seguintes parâmetros: padrão do alelo (tipo de unidade repetitiva), tamanho mínimo do alelo segundo os artigos que descreveram o loco, tamanho máximo do alelo e tipo de fluorescência. A definição do tamanho do alelo foi feita comparando-se os picos visualizados nos eletroferogramas com os tamanhos esperados descritos nos artigos referentes a cada um dos locos. Após a definição dos alelos, foi elaborada uma planilha contendo os genótipos de todos os indivíduos com seus respectivos alelos.

3.6. Análises Estatísticas

A planilha montada inicialmente com os genótipos das duas populações (um indivíduo de cada ninho) foi primeiramente submetida ao programa Micro-Checker 2.2.3 (OOSTERHOUT *et al.*, 2004) para averiguação da ocorrência de erros na genotipagem e suposta presença de alelos nulos e alelos *dropout*. Há vários métodos para estimar a frequência dos alelos nulos a partir de uma aparente deficiência de heterozigotos, a escolha do método varia dependendo se algumas amostras falharam na amplificação e se essas não amplificações representam homozigotos dos alelos nulos. Os métodos de Chakraborty *et al.* (1992) e Brookfield (1996) assumem que essa deficiência é causada por alelos nulos e não por erros de genotipagem ou desvios de panmixia. Já o método de Oosterhout *et al.* (2004) assume que não existem homozigotos nulos e considera todas as amostras não amplificadas como originárias de um DNA degradado ou erro humano. A frequência dos alelos nulos nessa abordagem é estimada a partir do cálculo prévio das frequências alélicas de todos os alelos detectados, supondo que o alelo nulo possui um único tamanho. Esse estimador permite uma melhor aproximação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e, por esse motivo, foi o selecionado para nossa análise.

O programa GenAlex 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para estimar as frequências alélicas, avaliar a heterozigotidade esperada (H_e) e observada (H_o), a probabilidade de identidade (PI) e de exclusão (PE), fazer o teste de qui-quadrado do equilíbrio de Hardy-Weinberg, verificar a distribuição da variação genética por análise molecular de variância (AMOVA) e para estipular o padrão alélico das populações. No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores de p foram corrigidos pela correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989).

Pelo programa GENEPOP 4.0.10 (ROUSSET, 2008) foi feita uma estimativa multilocus do número efetivo de migrantes (N_m) (SLATKIN, 1985; SLATKIN; BARTON, 1989). No software Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi verificado se ocorria desequilíbrio de ligação entre os locos e avaliado o coeficiente de endogamia (F_{IS}), partindo-se da hipótese nula de união aleatória dos gametas. A avaliação do grau de diferenciação genética específica para microssatélites (R_{ST}) e o valor de p foi estimado no programa RST CALC 2.2.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada um dos locos foi estimado pelo programa Cervus 3.0.3 (KALINOWSKI *et al.*, 2007), a partir dos genótipos e das frequências alélicas. No programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007) foi feito o teste G de contingência para comparar as duas populações em termos de heterozigotidade esperada e do número de amostras.

Foram estimados pelo programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995): a riqueza alélica (R_a), diversidade gênica (DG) de acordo com Nei (1987) e o grau de diferenciação populacional (F_{ST}). Em geral, estimativas baseadas em F_{ST} apresentam um melhor desempenho do que aquelas baseadas em R_{ST} quando os tamanhos amostrais (10 indivíduos) e/ou número de locos são pequenos (cinco locos) (GAGGIOTTI *et al.*, 1999). O coeficiente F_{ST} foi calculado, conforme o modelo de mutação de alelos infinitos (KIMURA; CROW, 1964) que considera que cada mutação sempre cria um novo alelo à uma determinada taxa de mutação μ , não admitindo homoplasia. No mesmo programa, foi feita a comparação das heterozigosidades observadas entre machos e fêmeas.

A estrutura populacional baseada no genótipo dos indivíduos foi examinada usando-se o procedimento Bayesiano baseado no modelo implementado no

programa STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Por meio deste programa foi possível determinar do número de populações genéticas (K), com base nos genótipos fornecidos, sem que sejam dadas informações prévias sobre os locais de origem dos indivíduos analisados.

A ocorrência de gargalo populacional genético recente foi investigada pelo *software* BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996) através do teste de Wilcoxon (LUIKART *et al.*, 1998). O teste de Wilcoxon é relativamente robusto e pode ser usado em amostras pequenas e com poucos locos (ANMARKRUD *et al.*, 2008). Esta análise assume três modelos mutacionais: IAM (modelo de alelos infinitos) que assume que as mutações nos microssatélites podem criar um número infinito de alelos; SMM (modelo de mutação “stepwise”) que admite a mesma probabilidade das mutações causarem ganho ou perda de uma unidade repetitiva; e TPM (modelo “two phase”) que é um modelo misto que considera a probabilidade da mutação envolver os dois modelos mutacionais anteriores (ANMARKRUD *et al.*, 2008). Populações que passaram por um gargalo genético recente tendem a perder alelos raros e conseqüentemente, aumenta a frequência dos alelos comuns (resultando em um excesso de heterozigotos). Neste trabalho foi adotado o modelo TPM (70% de mutações de passo simples e 30% de mutações de múltiplos passos), pois esse modelo mutacional parece ser mais conservativo (LUIKART; CORNUET, 1998). Para todos os testes estatísticos, foi considerada uma significância de 5% ($p < 0,05$).

O programa NeEstimator 1.3 (PEEL *et al.*, 2004) foi utilizado para calcular o tamanho efetivo populacional (N_e) das duas colônias empregadas neste trabalho. As análises foram feitas a partir da geração zero e pelo método de desequilíbrio de ligação, por ser o mais comumente usado e o melhor avaliador de amostra única (HILL, 1981).

3.7. Parentesco Genético

O grau de parentesco genético (estimativa r) entre dois indivíduos baseia-se na probabilidade de que dois alelos que eles possuem sejam idênticos-por-descendência (IBD, LYNCH; WALSH, 1998). Três classes de relacionamentos podem ser supostas para filhotes em um mesmo ninho: irmãos-completos (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (U). Os valores teóricos médios esperados de

r são 0,5 para irmãos completos, 0,25 para meio-irmãos e 0,0 para indivíduos não-relacionados (RUSSELO; AMATO, 2004). Em populações naturais, uma variação considerável é observada em torno dessas médias, devido principalmente à natureza estocástica da seleção genética durante a reprodução sexual, ao pequeno número de locos de marcadores moleculares e as proporções reais de díades nas categorias de parentesco diferentes na população (RUSSELO; AMATO, 2004). Por esse motivo o programa IRel 1.0 (GONÇALVES DA SILVA; RUSSELO, 2010) foi aplicado, baseado nas frequências alélicas observadas na população e na simulação de díades (10000 interações), determinando valores médios entre as três classes de relacionamentos (FS, HS e UR) mais próximos aos observados nas nossas amostras populacionais.

Abordagens metodológicas baseadas em dados de microssatélites para a inferência de parentesco genético entre indivíduos podem ser classificadas em duas categorias. A primeira categoria utiliza o estimador de “momentum”, uma quantidade contínua, definida em termos de probabilidade de alelos idênticos-por-descendência (QUELLER; GOODNIGHT, 1989). A segunda categoria usa a abordagem de verossimilhança para determinar os prováveis relacionamentos (GOODNIGHT; QUELLER, 1999). Considerando-se as limitações dos métodos e empregando-se as devidas correções, disponíveis na maioria dos programas utilizados, é possível obter estimativas adequadas das relações de parentesco entre indivíduos em populações naturais (BLOUIN, 2003).

A estimativa de parentesco genético (r) entre os filhotes coletados no mesmo ninho foi feita primeiro pelo estimador de “momentum” no programa KINGROUP (KONOVALOV *et al.*, 2004), de acordo com Queller e Goodnight (1999). Quanto mais negativo for o valor determinado de r , maior a certeza de que os indivíduos que estão sendo avaliados não são relacionados, já que esses indivíduos apresentam um menor número de alelos idênticos-por-descendência do que o esperado (KONOVALOV; HEG, 2008). Além disso, esses valores negativos podem ajudar a detectar indivíduos que carregam novos alelos (KONOVALOV; HEG, 2008).

O programa ML Relate (KALINOWSKI *et al.*, 2006) baseado na estimativa de máxima verossimilhança foi utilizado para se detectar as prováveis relações de

parentesco entre os indivíduos, supondo a presença ou ausência de alelos nulos. Este programa permitiu também fazer testes específicos de hipóteses entre todos os pares de ninhegos. Neste caso, a hipótese putativa considerada como a verdadeira foi a de que os pares de ninhegos são irmãos-completos (considerando-se o sistema de acasalamento monogâmico). Quando o valor de p for pequeno ($p < 0,05$), a hipótese putativa estará mais de acordo com os dados genéticos do que a hipótese nula. Caso o valor de p seja grande, não se tem dados para se confirmar tal hipótese e a hipótese nula não será rejeitada. Todas as provas foram conduzidas com 10.000 permutações de genótipos/relacionamento.

A classificação final do relacionamento entre os pares de ninhegos foi realizada utilizando parte do procedimento descrito por Miño (2010). Primeiramente foi estimado o valor de parentesco (QUELLER; GOODNIGHT, 1989) segundo o programa KINGROUP. Em seguida, foram realizados testes de hipóteses para se estabelecer o provável relacionamento de acordo com os valores de r nos programas KINGROUP e ML-Relate. O uso conjunto destes dois programas foi justificado pelo fato de que o ML Relate faz as análises de parentesco considerando a presença de alelos nulos, enquanto que o programa KINGROUP não disponibiliza esta opção. As prováveis categorias de relacionamento fornecidas pelos programas foram confrontadas com os valores de corte dados pelo programa IRel 1.0. Chegou-se à identificação final de uma classe de relacionamento entre os ninhegos (UR, HS e FS) somente quando os resultados fornecidos por essas metodologias foram concordantes. Quando não houve concordância entre as metodologias, os pares de ninhegos foram considerados não classificados.

Comparações entre os valores médios de parentesco obtidos dentro dos ninhos e entre ninhos foram realizadas no programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007), utilizando-se o teste t com duas amostras independentes.

4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA total

O protocolo de extração de DNA utilizado neste trabalho resultou na obtenção de DNA de boa qualidade em todas as amostras. O DNA extraído apresentou pouca degradação o que ficou evidenciado pela ausência de “rastros no gel” de agarose 1% (Figura 6), padrão esse que indicaria a fragmentação do DNA molde. As soluções foram quantificadas e as concentrações foram suficientes para todas as reações de PCRs.

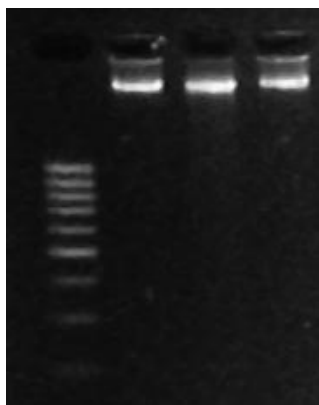


Figura 6: Fotografia mostrando as bandas do DNA genômico extraído em gel de agarose 1% comparadas com o marcador de peso molecular *MassRuler™ DNA ladder* (Fermentas).

No geral, os resultados obtidos com as amostras de DNA extraídas de tecido muscular foram melhores do que com as amostras de DNA extraídas das penas em crescimento nas duas populações, tanto em relação à qualidade como à quantidade de DNA. As concentrações de DNA das extrações de penas em crescimento variaram de 45 a 2606 ng/ μ l, apresentando uma média de 870 ng/ μ l. A quantificação das extrações de DNA de tecido muscular mostrou uma variação de 746 a 3333 ng/ μ l e uma média de 1705 ng/ μ l de DNA extraído. A solução aquosa de DNA estoque foi diluída para a concentração de 40 ng/ μ l e essas soluções foram utilizadas posteriormente em todas as PCRs.

4.2 Sexagem Molecular

A sexagem molecular foi bem sucedida, resultando na identificação das fêmeas, o sexo heterogamético, com a amplificação de dois fragmentos intrônicos

(ZW), e na identificação dos machos, o sexo homogamético, com amplificação de fragmentos de tamanhos idênticos referentes ao cromossomo Z. Esses fragmentos só puderam ser separados em gel de poliacrilamida 9% (Figura 7), pois a pequena diferença de tamanho entre eles não permitiu sua separação em gel de agarose 3%. O tamanho do fragmento intrônico do gene CHD observado para o cromossomo Z foi 372 pb e o cromossomo W apresentou 360 pb .

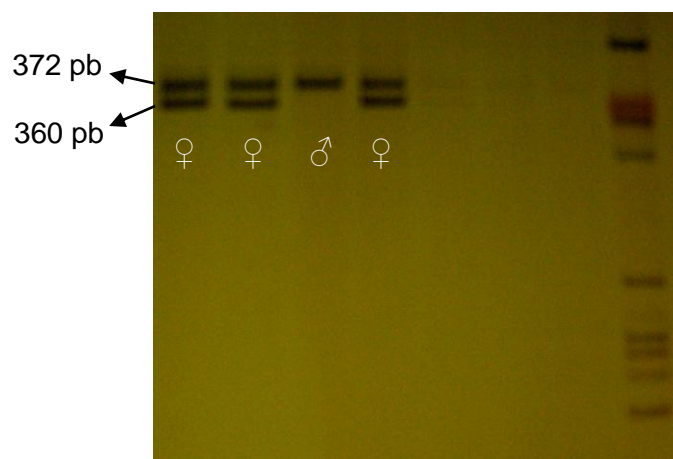


Figura 7: Fotografia do gel de poliacrilamida 9% mostrando os fragmentos de amplificação dos introns do gene CHD específicos para os cromossomos W e Z. Fêmea (♀) e macho (♂).

A razão sexual das populações foi expressa pela razão entre os machos e o total de indivíduos sexados. Desvios significativos do valor esperado (0,5) não foram observados (Tabela 2). A razão sexual observada dentro dos ninhos com dois filhotes (25% duas fêmeas, 25% dois machos e 50% um macho e uma fêmea) e com três filhotes (16% três fêmeas, 8% três machos, 42% uma fêmea e dois machos, 34% duas fêmeas e um macho) também demonstrou uma diferença não significativa, esperado para populações panmíticas.

Tabela 2: Sexagem molecular dos indivíduos das duas populações de *Plegadis chihi*.

Populações	Machos	Fêmeas	Razão sexual observada	Razão sexual esperada	Valor de p Teste χ^2
Alvorada	21	27	0,437	0,500	0,386
Tapes	45	42	0,517	0,500	0,747
Total	66	69	0,477	0,500	0,566

$p > 0,05$

4.3 Variabilidade Genética

Dentre os 44 locos de microssatélites heterólogos testados (Tabela I), 25 resultaram na amplificação satisfatória de um fragmento de tamanho esperado após reações de PCR: Aaju3, Aaju5, NnNF5, NnCE11, NnDD9, NnHB12, Eru2, Eru3, Eru4, Eru5, Eru6, Eru7, Eru8, Eru9, Eru11, WS3, WS4, WS9, Bi1, Bi5, Bi7, Bi9, Bi10, Bi11 e Bi12. Nos locos em que não houve amplificação, foram feitas tentativas de modificação da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, da concentração de MgCl₂ e da quantidade de DNA, mas mesmo com tais alterações não se obteve sucesso na amplificação.

Foram considerados monomórficos após as análises dos eletroferogramas os locos: Aaju5, NnCE11, NnDD9, NnHB12, Eru3, Eru7, Eru8, Eru9, Eru11, WS3, WS4, WS9, Bi1, Bi5, Bi7, Bi9, Bi10, Bi11 e Bi12. O número de alelos e o tamanho dos fragmentos obtidos para os seis locos polimórficos em *P. chihi* foram comparados aos valores publicados para os mesmo locos nas espécies na qual foram descritos (Tabela 3).

Tabela 3: Locos heterólogos de microssatélites polimórficos caracterizados na espécie *P. chihi*. O número de alelos (Na) e o tamanho dos fragmentos amplificados nesse estudo são comparados aos resultados obtidos nas espécies onde os polimorfismos foram descritos. PIC: Conteúdo de informação polimórfica dos locos com dados desse trabalho.

Locos	Na espécie original	Na nesse estudo	Tamanho dos fragmentos na espécie original	Tamanho dos fragmentos nesse estudo	PIC nesse estudo
Aaju3	7	10	137 - 203	171 - 202	0,746
Eru2	4	4	161 - 167	119 - 141	0,367
Eru4	5	4	176 - 184	200 - 206	0,409
Eru5	6	3	184 - 198	218 - 222	0,545
Eru6	17	9	207 - 241	239 - 255	0,599
NnNF5	3	2	115 - 130	126 - 128	0,325

A figura 8 apresenta os eletroferogramas ilustrando o polimorfismo em cada um dos seis locos, assim como os padrões característicos de seus alelos.

Considerando-se todos os locos, o número de alelos nesse trabalho variou de dois (NnNF5) a 10 (Aaju3) com uma média de 5,33 alelos por loco (Tabela 4). Na população de Alvorada foram detectados ao todo 29 alelos, sendo três deles apenas encontrados nesta população (alelos privados). Em Tapes, foram detectados

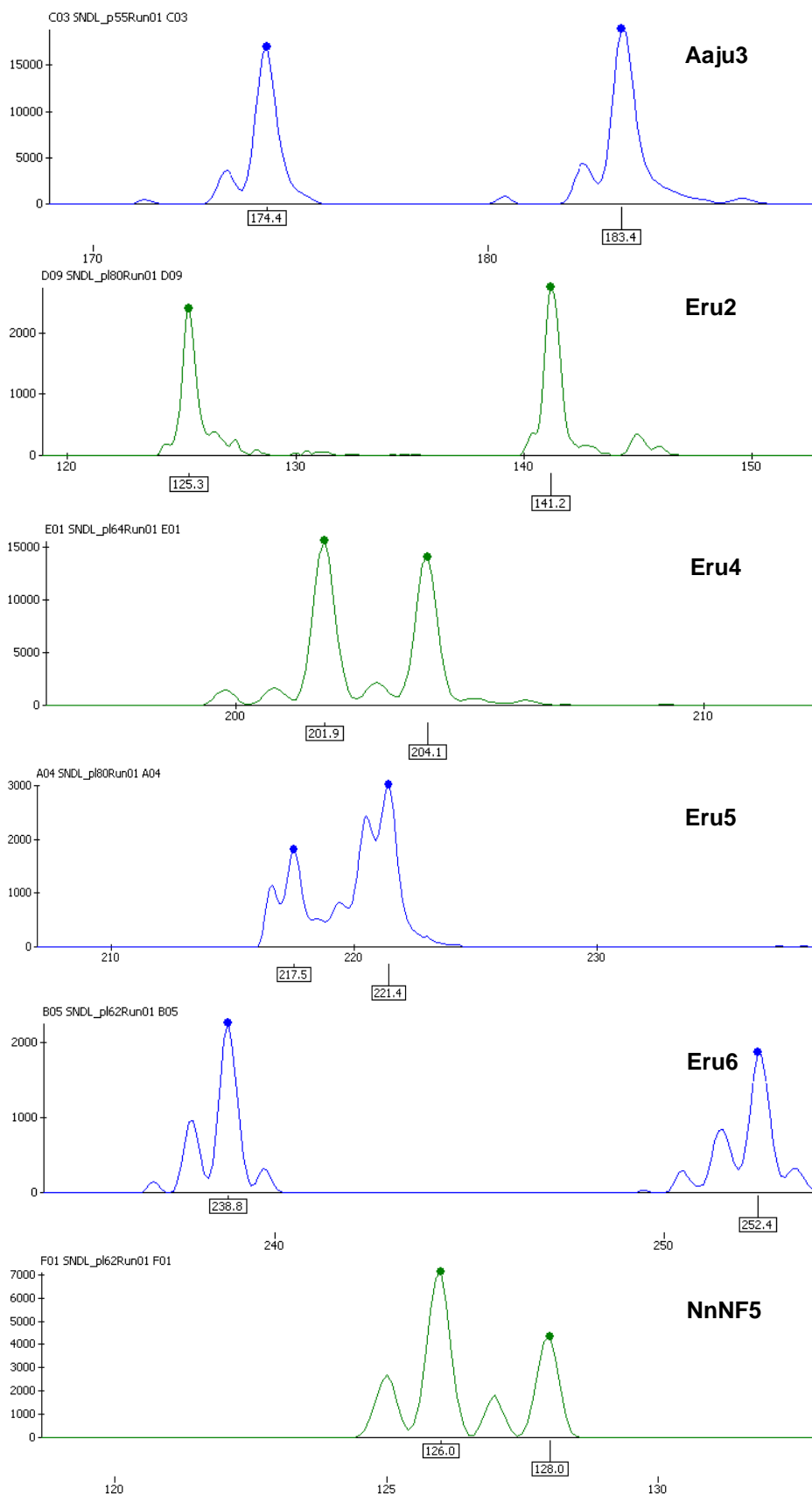
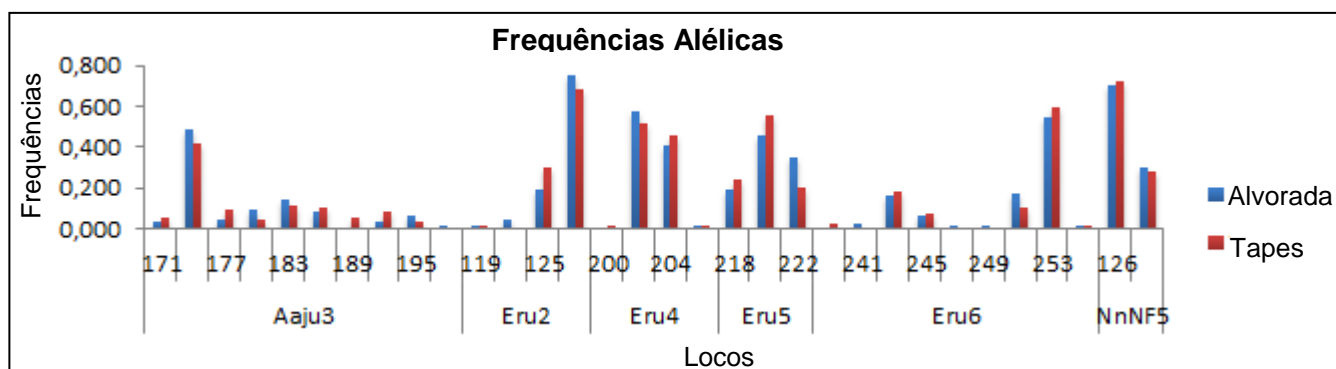


Figura 8: Eletroferogramas mostrando o padrão de alguns dos alelos e o polimorfismo em cada um dos locos de microssatélites heterólogos utilizados nesse trabalho.

Tabela 4: Lista dos alelos e frequências alélicas em cada um dos seis locos polimórficos nas duas populações.

Locos	Alelos	Populações	
		Alvorada	Tapes
Aaju3	171	0,034	0,057
	174*	0,489	0,414
	177	0,045	0,092
	180	0,091	0,040
	183	0,148	0,115
	186	0,080	0,103
	189	0,000	0,057
	192	0,034	0,080
	195	0,068	0,034
	201	0,011	0,006
Eru2	119	0,014	0,012
	121	0,041	0,000
	125	0,189	0,304
	141*	0,757	0,685
Eru4	200	0,000	0,017
	202*	0,580	0,517
	204	0,409	0,454
	206	0,011	0,011
Eru5	218	0,193	0,238
	220*	0,455	0,558
	222	0,352	0,203
Eru6	239	0,000	0,023
	241	0,023	0,006
	243	0,159	0,186
	245	0,068	0,076
	247	0,011	0,000
	249	0,011	0,000
	251	0,170	0,105
	253*	0,545	0,593
	255	0,011	0,012
NnNF5	126*	0,705	0,720
	128	0,295	0,280

*Alelo mais comum nas duas populações

**Figura 9:** Gráfico apresentando a distribuição dos alelos e as frequências alélicas nas duas populações.

também 29 alelos, com outros três alelos privados. Os alelos apresentaram uma frequência similar nas duas populações (Figura 9).

O programa Micro-Checker 2.2.3 constatou excesso de genótipos homozigotos no loco Eru6 (Tabela 5) e atribuiu esses padrões à ocorrência de bandas fantasmas (*stuttering*) nos eletroferogramas. Este resultado foi sugerido devido a uma deficiência de heterozigotos em que os alelos diferem por uma simples repetição ou por um excesso dos homozigotos dos alelos maiores (porque *stuttering* é mais severo para alelos maiores). Nesse loco, especificamente, por vezes os picos dos diferentes alelos apresentavam-se muito próximos um do outro no eletroferograma, impossibilitando a sua distinção. É provável, portanto, que mesmo após checagem cuidadosa dos eletroferogramas, tenha ocorrido a classificação errônea de indivíduos heterozigotos como homozigotos, explicando assim a presença de alelos nulos e o excesso de homozigotos na maioria das classes dos alelos (Figura 10). Nos outros locos esse tipo de ocorrência não foi detectada, nem foram detectados alelos nulos ou amplificação alelo-preferencial.

Tabela 5: Estimativas das frequências de alelos nulos para cada loco segundo o método descrito por Oosterhout *et al.*(2004) calculado pelo programa Micro-Cheker.

Locos	Presença de Alelo nulo	Oosterhout
Aaju3	não	-0,059
Eru2	não	-0,266
Eru4	não	-0,048
Eru5	não	-0,090
Eru6	sim	0,125*
NnNF5	não	-0,112

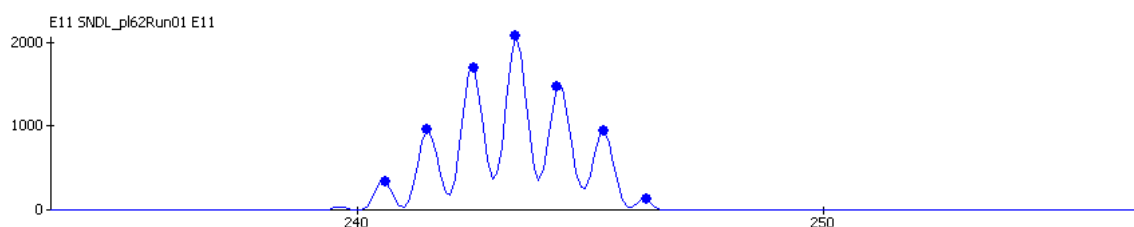


Figura 10: Eletroferograma do loco Eru6 mostrando um pico em que ficou duvidoso se o genótipo era de um homozigoto ou de um heterozigoto. Ver na Figura VIII que cada alelo nesse loco apresenta quatro picos ou mais.

O número de indivíduos analisados (N), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), os valores de riqueza alélica (R_a), a diversidade gênica (DG) e os

valores de p no teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{EHW}) para cada loco, estão apresentados na Tabela 6. As proporções genotípicas estão de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas duas populações, já que nenhum loco apresentou valor de p significativo nos testes, após a correção sequencial de Bonferroni.

Tabela 6: Estimativas de diversidade genética baseadas nos dados de seis locos de microssatélites heterólogos. O número de indivíduos analisados (N), a heterozigotidade observada (Ho), heterozigotidade esperada (He), riqueza alélica (Ra), diversidade gênica (DG) segundo Nei (1987) e o valor de p obtido no teste de χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{EHW}).

	Locos	N	Ho	He	Ra	DG	P_{EHW}
Alvorada	Aaju3	44	0,773	0,716	8,834	0,723	0,849
	Eru2	37	0,486	0,390	4,000	0,394	0,701
	Eru4	44	0,545	0,497	2,841	0,502	0,583
	Eru5	44	0,727	0,632	3,000	0,638	0,043*
	Eru6	44	0,477	0,643	7,499	0,652	0,097
	NnNF5	44	0,500	0,416	2,000	0,420	0,182
Tapes	Aaju3	87	0,839	0,780	9,366	0,785	0,111
	Eru2	84	0,560	0,439	2,688	0,441	0,059
	Eru4	87	0,460	0,526	3,484	0,529	0,338
	Eru5	86	0,547	0,590	3,000	0,594	0,057
	Eru6	86	0,512	0,596	6,004	0,600	0,057
	NnNF5	84	0,440	0,403	2,000	0,405	0,394
MÉDIA		-	0,572	0,552	4,560	0,557	-

* Valor não significativo após a correção sequencial com Bonferroni ($p > 0,05$)

A heterozigotidade esperada nas duas populações variou de 0,390 (Eru2) a 0,780 (Aaju3) e a heterozigotidade observada variou de 0,440 (NnNF5) a 0,839 (Aaju3). A riqueza alélica por loco, baseada no tamanho mínimo amostral (37 indivíduos) variou de dois para o loco NnNF5 a 9,366 para o loco Aaju3. Os valores de heterozigotidade esperada nas duas populações foram semelhantes (teste G de contingência: $p = 0,975$). A diversidade gênica observada variou desde 0,394 (Eru2) até 0,785 (Aaju3). A heterozigotidade parece estar distribuída igualmente entre os sexos, conforme comparação das estimativas de diversidade genética entre os mesmos, baseada em 1000 randomizações (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação da heterozigotidade entre os sexos. N: Número de indivíduos analisados, Ho: Heterozigotidade observada

	N	Ho
Fêmea	65	0.629
Macho	66	0.509
Total	131	0.569

O tamanho populacional efetivo estimado pelo programa NeEstimator sugere 11,9 indivíduos reprodutivos na colônia de Alvorada e 28,5 na colônia de Tapes.

Segundo o *software* BOTTLENECK, não há evidência de redução recente do tamanho populacional nas populações (teste de Wilcoxon, Alvorada: $p = 0,43$; Tapes: $p = 0,10$). Os valores de F_{IS} mostram que apenas no loco Eru6 o excesso de genótipos homozigotos é significativo (Tabela 8), concordando com os resultados apresentado pelo Micro-Checker.

Tabela 8: Valores do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) e os valores de p .

Locos	F_{IS}	Valor de p
Aaju3	-0,069	0,976
Eru2	-0,259	0,999
Eru4	0,061	0,257
Eru5	0,002	0,522
Eru6	0,190	0,0007*
NnNF5	-0,123	0,946

* Valor significativo ($p < 0,05$)

O teste exato de desequilíbrio de ligação demonstrou que há associação ($p < 0,05$) entre os locos Eru4+Eru6 em Alvorada e Eru5+NnNF5 em ambas populações (Tabela 9).

Tabela 9: Probabilidade de ocorrência de desequilíbrio de ligação (p) entre os locos, em cada uma das populações.

Locos	Valor de p (Alvorada)	Valor de p (Tapes)
Aaju3 x Eru2	0,817	0,460
Aaju3 x Eru4	0,516	0,126
Eru2 x Eru4	0,641	0,231
Aaju3 x Eru5	0,567	0,352
Eru2 x Eru5	0,283	0,091
Eru4 x Eru5	0,474	0,191
Aaju3 x Eru6	0,182	0,733
Eru2 x Eru6	0,358	0,534
Eru4 x Eru6	0,049*	0,835
Eru5 x Eru6	0,195	0,455
Aaju3 x NnNF5	0,170	0,770
Eru2 x NnNF5	0,587	0,532
Eru4 x NnNF5	0,592	0,585
Eru5 x NnNF5	0,018*	0,022*
Eru6 x NnNF5	0,189	0,472

*Significativo $p < 0,05$

4.4 Estruturação Genética

As análises de estruturação genética supõem que os locos incluídos não estejam em desequilíbrio de ligação. Para atender essa exigência, os locos Eru6 e NnNF5 foram excluídos dessas análises, pois se apresentaram em desequilíbrio de ligação com os locos Eru4 e Eru5, respectivamente. O loco Eru6 foi também selecionado para ser excluído, por ter apresentado alelos nulos.

As análises demonstraram um grau baixo, mas significativo de diferenciação genética entre as duas populações ($F_{ST} = 0,009$, $p < 0,05$; $R_{ST} = 0,0024$, $p < 0,24$). A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a distribuição da maior parte da variação genética presente nas populações pode ser explicada pela diferença entre os indivíduos dentro das populações e só apenas 2% da variação é explicada pelas diferenças entre elas (Tabela 10; Figura 11).

Tabela 10: Análise AMOVA da distribuição dos componentes da variabilidade genética total presente nas populações. Apresenta o grau de liberdade (df), a soma dos quadrados (SS), a média da soma dos quadrados (MS), a estimativa da variância e a porcentagem da variância total (%).

Origem	df	SS	MS	Estimativa da Variância	%
Entre populações	1	5,541	5,541	0,054	2%
Dentro das populações	129	309,528	2,399	2,399	98%
Total	130	315,069		2,453	100%

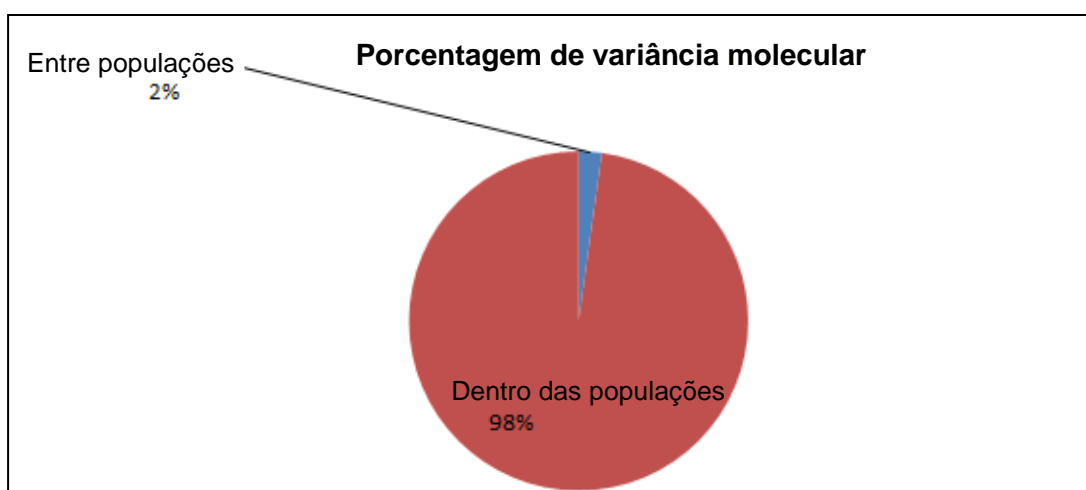


Figura 11: Gráfico mostrando a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações.

A abordagem Bayesiana do STRUCTURE mostrou que, aparentemente, as duas amostras estudadas pertencem a uma única unidade populacional (Figura 12).

Usando o método dos alelos privados, após a correção para o tamanho amostral, o N_m foi estimado como sendo 1,689, indicando uma possível existência de fluxo gênico entre as populações. O padrão alélico das duas populações (Figura 13) confirma que elas são bastante similares.

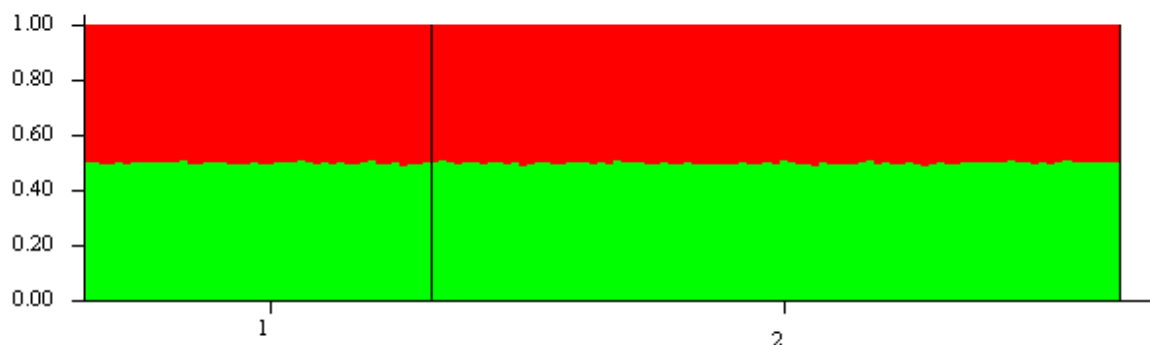


Figura 12: Gráfico traçado pelo programa Structure com mais alto valor de probabilidade para $K=2$, resultante da análise de agrupamento não-orientado (*burn-in* 10000 e 100000 réplicas). As barras representam, para cada indivíduo, as probabilidades de pertencimento aos grupos inferidos. A barra preta separa as duas populações, Alvorada (1) e Tapes (2).

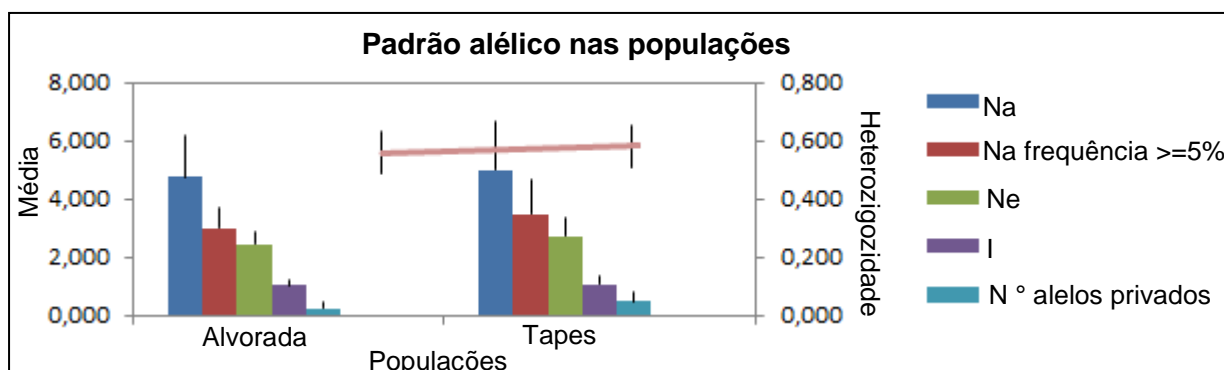


Figura 13: Gráfico apresentando o padrão alélico das populações. O número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), índice de Shannon (I) e o número de alelos privados.

4.5 Parentesco Genético

O loco $NnNF5$ foi excluído das análises de parentesco genético por estar em desequilíbrio de ligação com o loco $Eru5$ em Tapes e por ser o menos informativo, em relação ao número de alelos (2 alelos). O loco $Eru6$ (9 alelos) mesmo possuindo alelos nulos, foi incluído nas análises de parentesco genético, pois segundo Wagner *et al.* (2006) essas análises são mais robustas se locos com alelos nulos são incluídos nelas, principalmente quando esses possuem um número grande de alelos.

A probabilidade média de identidade (PI) foi 0,0005 em Alvorada e 0,0004 em Tapes, e a probabilidade combinada de exclusão para todos os locos (PE) (não conhecendo nenhum dos pais) foi 0,975 em Alvorada e 0,979 em Tapes (Tabela 11).

Tabela 11: Valores da probabilidade de identidade (PI) e probabilidade de exclusão (PE) por loco nas duas populações.

Populações	Locos	PI	PE
Alvorada	Aaju3	0,104	0,737
	Eru2	0,416	0,317
	Eru4	0,366	0,299
	Eru5	0,211	0,49
	Eru6	0,165	0,614
	Tapes	Aaju3	0,067
Eru2		0,401	0,281
Eru4		0,335	0,336
Eru5		0,234	0,471
Eru6		0,201	0,565

As análises populacionais e de parentesco genético inicial basearam-se em 52 indivíduos provenientes da colônia de Alvorada. Os resultados revelaram, entretanto, que alguns pares de indivíduos dessa população apresentavam altos valores de parentesco genético ($r > 0,6$), desviando-se assim do esperado para populações panmíticas (o esperado quando se coleta um filhote/ninho é que esses indivíduos sejam não-relacionados). Esse resultado nos alertou quanto à possibilidade da presença de irmãos-completos que tivessem sido incluídos erroneamente na amostra populacional. Na procura de uma explicação para tal achado, contatamos o colaborador que tinha executado a coleta dessas amostras e nos foi relatado que a coleta tinha sido realizada após uma grande tempestade no Rio Grande do Sul. Em consequência, alguns filhotes foram encontrados no chão e amostrados, sem que se soubesse qual seu ninho de procedência. Como existia uma possibilidade real de que esses pares de ninhegos com valor alto de parentesco genético fossem verdadeiros irmãos, optou-se por eliminar da amostra populacional um dos ninhegos dos pares prováveis “irmãos-completos”. Após a retirada de um filhote dos oito pares de filhotes identificados com valores altos de parentesco genético todas as análises foram refeitas. Após esse expurgo, o valor médio de parentesco genético entre os indivíduos da colônia de Alvorada foi 0,007 e em Tapes foi -0,008 (Figura 14).

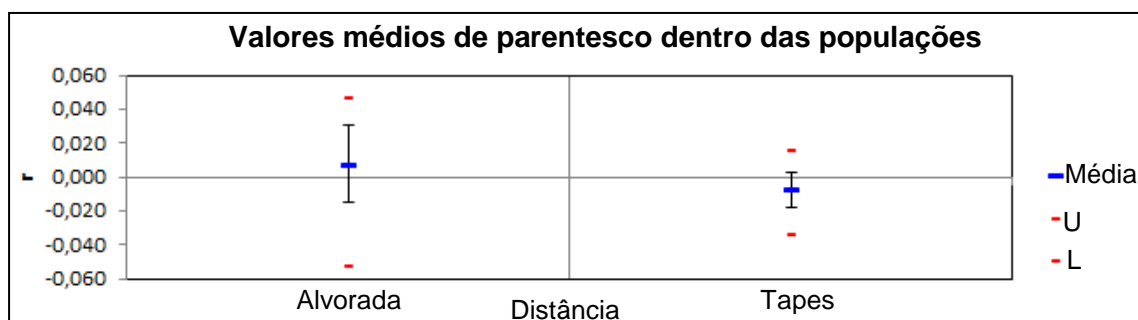


Figura 14: Gráfico mostrando o valor médio de parentesco entre os indivíduos das duas populações. Limites de confiança superior (U) e inferior (L) vinculados ao intervalo de confiança de 95% em torno da hipótese de “nenhuma diferença” entre as populações, conforme determinado pela permutação.

Os valores de corte para se distinguir entre categorias de relacionamento genético (QUELLER E GOODNIGHT, 1989) foram calculados pelo programa IRel 1.0. Para se distinguir entre não-relacionados e meio-irmãos o valor de corte foi 0,122 e para se distinguir entre meio-irmãos e irmãos-completos, o valor foi 0,336. Assim, pares de ninhegos com valores de r abaixo de 0,122 foram classificados como não-relacionados, os que possuíam valores de r entre 0,122 e 0,336 como meio-irmãos e os que possuíam valores de r maiores que 0,336 foram classificados como irmãos-completos. A figura 15 apresenta quatro curvas traçadas pelo IRel 1.0: três demonstrando a distribuição dos valores de r (QUELLER; GOODNIGHT, 1989), para os pares simulados de FS, HS e U, e uma curva traçada com base nas frequências alélicas observadas nas nossa amostra populacional (procedimento sugerido em MIÑO 2010).

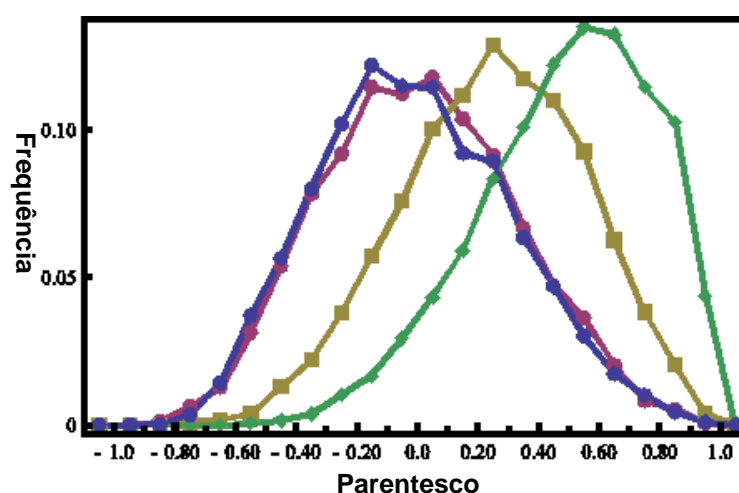


Figura 15: Distribuição dos valores de parentesco par-a-par segundo Queller e Goodnight (1989) para pares simulados de relacionamentos (roxo – não-relacionados, marrom – meio-irmãos, verde – irmãos-completos) e com base nos dados desse trabalho (em azul).

A categoria de relacionamento mais provável para cada par de filhotes amostrados dentro dos ninhos foi obtida com base no procedimento descrito por Miño (2010). O programa ML-Relate fez as análises com as frequências alélicas corrigidas para ocorrência de alelos nulos nos locos Aaju3 e Eru6 (Tabela 12).

Tabela 12: Categorias de relacionamento dos pares de ninhegos amostrados dentro dos ninhos e analisados para o parentesco genético. Para cada par, apresenta-se o valor de parentesco genético segundo Queller e Goodnight (1989) (Q&Gr), a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança (ML-Relate) e para o estimador de “momentum” (KINGROUP), e a categoria de relacionamento mais provável para cada par de ninhego. Os traços representam os pares de ninhegos que não tiveram uma categoria de relacionamento confirmada. FS: irmãos-completos; HS: meio-irmãos; U: não-relacionados.

Ninho	Pares	(r Q&Gr) categoria de relacionamento	ML-Relate categoria de relacionamento	KINGROUP categoria de relacionamento	Diagnóstico final da categoria de relacionamento
2	Tp3 - Tp2	(0,024) U	FS	FS	-
3	Tp5 - Tp4	(0,505) FS	FS	FS*	FS
4	Tp7 - Tp6	(0,521) FS	FS	U	-
5	Tp9 - Tp8	(0,485) FS	HS	HS	-
6	Tp11 - Tp10	(0,611) FS	FS	FS*	FS
7	Tp13 - Tp12	(0,175) HS	U	U	-
8	Tp15 - Tp14	(0,288) HS	FS	FS*	-
9	Tp17 - Tp16	(0,723) FS	FS	FS***	FS
10	Tp19 - Tp18	(0,480) FS	FS	U	-
11	Tp21 - Tp20	(0,761) FS	FS	FS***	FS
12	Tp23 - Tp22	(0,245) HS	FS	FS*	-
13	Tp25 - Tp24	(0,692) FS	FS	FS***	FS
14	Tp27 - Tp26	(0,534) FS	HS	HS	-
15	Tp29 - Tp28	(-0,101) U	HS	U	-
16	Tp31 - Tp30	(-0,069) U	FS	U	-
17	Tp33 - Tp32	(0,057) U	HS	HS	-
18	Tp35 - Tp34	(0,158) HS	U	U	-
19	Tp37 - Tp36	(0,253) HS	U	U	-
20	Tp39 - Tp38	(0,134) HS	HS	HS	HS
21	Tp41 - Tp40	(0,093) U	HS	HS	-
22	Tp43 - Tp42	(-0,259) U	U	U	U
23	Tp45 - Tp44	(0,500) FS	FS	U	-
24	Tp47 - Tp46	(0,645) FS	FS	FS*	FS
25	Tp49 - Tp48	(0,350) FS	HS	HS	-
26	Tp51 - Tp50	(-0,189) U	FS	FS*	-
27	Tp53 - Tp52	(0,827) FS	FS	FS***	FS
29	Tp57 - Tp56	(0,121) U	U	U	U
30	Tp59 - Tp58	(0,207) HS	HS	HS	HS
31	Tp61 - Tp60	(0,609) FS	FS	FS*	FS
32	Tp63 - Tp62	(0,526) FS	HS	HS	-

33	Tp65 - Tp64	(0,002) U	HS	HS	-
34	Tp67 - Tp66	(0,441) FS	FS	U	-
36	Tp70 - Tp69	(0,217) HS	FS	FS**	-
37	Tp72 - Tp71	(0,518) FS	FS	FS*	FS
38	Tp74 - Tp73	(0,654) FS	FS	FS*	FS
39	Tp76 - Tp75	(-0,209) U	FS	FS*	-
40	Tp78 - Tp77	(0,373) FS	FS	U	-
41	Tp80 - Tp79	(0,736) FS	FS	FS**	FS
43	Tp83 - Tp82	(0,696) FS	FS	FS***	FS
44	Tp85 - Tp84	(0,578) FS	FS	U	-
45	Tp87 - Tp86	(0,385) FS	FS	FS*	FS
46	Tp89 - Tp88	(0,570) FS	FS	U	-
47	Tp91 - Tp90	(-0,023) U	U	U	U
48	Tp93 - Tp92	(0,575) FS	FS	FS*	FS
51	Tp98 - Tp97	(0,367) FS	FS	FS**	FS
52	Tp101 - Tp99	(0,477) FS	FS	U	-
52	Tp101 - Tp100	(0,451) FS	HS	HS	-
52	Tp100 - Tp99	(0,232) HS	FS	U	-
53	Tp103 - Tp102	(0,249) HS	FS	FS**	-
54	Tp105 - Tp104	(0,113) U	U	U	U
55	Tp107 - Tp106	(-0,075) U	U	U	U
56	Tp109 - Tp108	(0,669) FS	FS	FS*	FS
57	Tp111 - Tp110	(0,558) FS	FS	U	-
58	Tp113 - Tp112	(0,255) HS	FS	U	-
59	Tp115 - Tp114	(0,595) FS	FS	FS*	FS
59	Tp116 - Tp114	(0,207) HS	FS	U	-
59	Tp116 - Tp115	(-0,039) U	U	U	U
60	Tp118 - Tp117	(0,839) FS	FS	FS*	FS
61	Tp120 - Tp119	(0,614) FS	FS	FS*	FS
61	Tp121 - Tp120	(0,610) FS	FS	FS**	FS
61	Tp121 - Tp119	(0,443) FS	FS	U	-
62	Tp123 - Tp122	(0,401) FS	FS	U	-
63	Tp126 - Tp125	(0,434) FS	FS	FS*	FS
64	Tp128 - Tp127	(0,293) HS	FS	FS*	-
64	Tp129 - Tp127	(-0,304) U	U	U	U
64	Tp129 - Tp128	(-0,504) U	U	U	U
66	Tp132 - Tp131	(0,322) HS	FS	U	-
67	Tp134 - Tp133	(0,414) FS	U	U	-
68	Tp136 - Tp135	(0,219) HS	FS	U	-
69	Tp138 - Tp137	(0,503) FS	FS	U	-
70	Tp140 - Tp139	(0,501) FS	FS	FS*	FS
71	Tp142 - Tp141	(1,000) FS	FS	FS*	FS
71	Tp143 - Tp141	(0,084) U	U	U	U
71	Tp143 - Tp142	(-0,283) U	U	U	U
72	Tp145 - Tp144	(0,278) HS	U	U	-

73	Tp148 - Tp146	(0,547) FS	FS	FS*	FS
73	Tp148 - Tp147	(-0,149) U	U	U	U
73	Tp147 - Tp146	(-0,175) U	HS	HS	-
74	Tp150 - Tp149	(-0,685) U	U	U	U
75	Tp152 - Tp151	(0,022) U	U	U	U
76	Tp154 - Tp153	(0,176) HS	U	U	-
77	Tp156 - Tp155	(0,647) FS	FS	FS**	FS
78	Tp158- Tp157	(0,512) FS	FS	FS**	FS
79	Tp160 - Tp159	(0,497) FS	FS	U	-
79	Tp161 - Tp160	(0,497) FS	FS	U	-
79	Tp161 - Tp159	(1,000) FS	FS	FS***	FS
80	Tp163 - Tp162	(0,712) FS	FS	FS*	FS
81	Tp165 - Tp164	(0,473) FS	FS	U	-
81	Tp166 - Tp165	(0,840) FS	FS	FS**	FS
81	Tp166 - Tp164	(0,671) FS	FS	FS**	FS
82	Tp169 - Tp168	(-0,004) U	U	U	U
82	Tp169 - Tp167	(0,415) FS	FS	U	-
82	Tp168 - Tp167	(0,604) FS	FS	FS**	FS
83	Tp172 - Tp171	(-0,181) U	HS	HS	-
83	Tp172 - Tp170	(0,027) U	FS	U	-
83	Tp171 - Tp170	(0,678) FS	FS	FS**	FS
84	Tp175 - Tp173	(-0,121) U	U	U	U
84	Tp175 - Tp174	(-0,071) U	U	U	U
84	Tp174 - Tp173	(0,846) FS	FS	FS*	FS
85	Tp178 - Tp177	(0,567) FS	FS	FS*	FS
85	Tp177 - Tp176	(0,801) FS	FS	FS**	FS
85	Tp178 - Tp176	(0,820) FS	FS	FS**	FS
86	Tp181 - Tp179	(0,126) HS	FS	U	-
86	Tp180 - Tp179	(0,019) U	U	U	U
86	Tp181 - Tp180	(0,004) U	U	U	U
87	Tp183 - Tp182	(-0,013) U	U	U	U

Ao todo, foram analisados 106 pares de ninhegos, sendo possível definir o provável parentesco de 58 pares (55%), dos quais: 36 foram classificados como irmãos completos, três como meio-irmãos e 19 como não-relacionados (Figura 16). Os pares de ninhegos restantes não tiveram a relação de parentesco definida devido a não concordância entre os métodos utilizados neste trabalho. Dentre as classes de métodos que apresentaram conflito, a maior porcentagem (35%) é explicada pela concordância entre o valor de r e a categoria apontada pelo programa ML-Relate (FS), mas que discorda da categoria dada pelo programa KINGROUP (U). As oito classes restantes de não concordância representaram cada uma delas menos do que 10% do total. Se o critério adotado nesse estudo não fosse conservador,

poderíamos estar diagnosticando um maior número de pares de filhotes como irmãos-completos, já que o ML-Relate é mais confiável do que o KINGROUP porque considera as frequências alélicas corrigidas para alelos nulos.

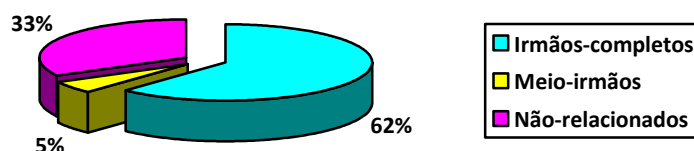


Figura 16: Gráfico apresentando as porcentagens das categorias de relacionamentos estimados nesse trabalho.

O valor de parentesco genético médio observado dentro dos ninhos ($r = 0,334$) e entre ninhos ($r = -0,008$) foram consistentes com o esperado para irmãos-completos e não-relacionados, respectivamente. A diferença entre os valores médios de parentesco obtidos dentro dos ninhos e entre ninhos foi significativa ($p = 0,0189$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Sexagem Molecular

Identificar o sexo dos indivíduos nesse estudo de genética de populações foi essencial para se verificar como estava constituída a amostra populacional analisada e se ocorriam desvios nas razões sexuais das populações.

A sexagem em aves a partir de métodos diretos é bastante difícil, pois a maioria das espécies não apresentam dimorfismo sexual externo. A técnica de sexagem molecular utilizada através de DNA foi rápida e relativamente simples. Devido à diferença pequena entre os tamanhos dos fragmentos intrônicos do gene CHD-Z e CHD-W, não foi possível separá-los após eletroforese em gel de agarose 3%. Para diagnosticar o sexo foi realizada eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 9% e os resultados permitiram uma separação de maneira clara (Figura VII). A razão sexual observada entre machos e fêmeas, segundo o teste de qui-quadrado, não se desviou do esperado (0,5) para populações naturais. Essa proporção aponta para uma amostra coletada de forma aleatória e apropriada para análises populacionais.

5.2 Amplificação de Locos Heterólogos

A amplificação heteróloga foi feita a partir de locos desenvolvidos para espécies pertencentes à família Threskiornithidae e à família Ardeidae, da ordem Pelecaniformes, e à família Ciconiidae, da ordem Ciconiiformes. O sucesso na amplificação foi favorecido com a diminuição da temperatura de anelamento em todos os locos utilizados. Nos testes em que a temperatura de anelamento foi diminuída, uma maior probabilidade de amplificação/polimorfismo foi observada. Como mutações são previstas nas regiões flangeadoras dos microssatélites em espécies alvo, o abaixamento da temperatura de anelamento deve ter favorecido uma ligação mais inespecífica dos oligonucleotídeos, tornando a amplificação heteróloga possível (PRIMMER *et al.*, 2005).

Alguns fatores como a incidência de erros na genotipagem podem limitar a aplicação dos microssatélites em estudos populacionais. Esses erros podem ser

causados devido a baixa concentração de DNA na amostra (WANDELER *et al.*, 2003), ou resultante da não amplificação de um alelo ou pela amplificação preferencial de alelos menores (alelos *dropout*) (MILLER; WAITS, 2003; WATTIER *et al.*, 1998). Outro problema encontrado é o deslizamento da DNA polimerase durante a amplificação, resultando em um produto que difere do tamanho esperado para o número das unidades repetitivas (*stuttering*, SHINDE *et al.*, 2003). O *stuttering* é mais comum em locos dinucleotídeos, dificultando a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigotos. Mutações também podem ocorrer nos lugares de anelamento dos oligonucleotídeos, de tal modo que certos alelos podem não ser amplificados (alelos nulos) resultando em falsos homozigotos (SHAW *et al.*, 1999). Tais erros podem causar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido à deficiência de heterozigotos, enviesando as análises populacionais. Outras limitações deste marcador incluem a ocorrência de homoplasia, podendo dificultar e/ou levar a subestimativas da variação genética nesses locos (SCHLÖTTERER, 2003).

O loco Eru6, como apresentado na tabela V, apresentou um déficit de heterozigotos. Autores apontam como possíveis justificativas para o déficit de heterozigotos a ocorrência de alelos nulos ou outras falhas na genotipagem, efeito de *Wahlund*, endocruzamento ou erro amostral (DE LEON *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2001). No caso desse estudo, parece-nos que a ocorrência está associada ao erro na genotipagem, pois neste loco, por vezes, os picos dos diferentes alelos apresentavam-se muito próximos um do outro no eletroferograma, impossibilitando a sua distinção. Fizemos uma revisão cuidadosa dos eletroferogramas, mas ainda assim alguns heterozigotos podem ter sido mascarados, gerando o excesso de homozigotos apresentado pelos genótipos.

Os locos que se mostraram polimórficos neste trabalho foram todos descritos originalmente para espécies que pertencem à família Threskiornithidae, a mesma a que pertence à espécie *Plegadis chihi*. Este resultado está de acordo com a premissa de que a proporção de locos polimórficos, dentre aqueles que amplificaram, diminui com o aumento da distância filogenética entre a espécie analisada (a espécie alvo) e a espécie na qual foram isolados os marcadores (a espécie original) (PRIMMER *et al.*, 2005).

Neste trabalho, encontramos 57% de sucesso na amplificação dos locos heterólogos, sendo que destes, 24% apresentaram-se polimórficos. Em um amplo levantamento feito na literatura observa-se que, nas aves, as médias das taxas de sucesso da amplificação heteróloga reportadas são mais altas, variando de 67% (DAWSON *et al.*, 2000) a 84% (GALBUSERA *et al.*, 2000), enquanto que, o nível de polimorfismo variou de 39% (GALBUSERA *et al.*, 2000) a 46% (PRIMMER *et al.*, 1996). Considerando-se as porcentagens reportadas por Barbará *et al.* (2007) para amplificação de locos de microsatélites heterólogos de aves entre gêneros dentro da mesma família (62%), e entre famílias dentro da mesma ordem (38%), verificou-se que os índices dos resultados obtidos neste trabalho são maiores do que os reportados por estes autores: 84% e 57%, respectivamente. Barbará *et al.* (2007) também reportou as porcentagens de locos polimórficos, dentre aqueles que amplificaram, encontrados entre gêneros dentro da mesma família (55%) e para famílias dentro da mesma ordem (23%), sendo que os resultados obtidos neste trabalho foram: 40% e 24%, respectivamente.

Dentro da ordem Pelicaniformes, as porcentagens de amplificação heteróloga encontrada por Yeung *et al.* (2009) utilizando 23 locos sintetizados para *Platalea minor* foram menores do que os apresentadas neste trabalho em espécies dentro da mesma família (17% em *Eudocimus ruber*) e em famílias diferentes (9% em *Ardea alba*). Utilizando locos descritos para *Mycteria americana* (família Ciconiidae - ordem Ciconiiformes), Miño (2006) encontrou 31% de sucesso na amplificação heteróloga e 15,5% de polimorfismo em *Platalea ajaja* (família Threskiornithidae - ordem Pelecaniiformes), enquanto que, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores em *Jabiru mycteria* (família Ciconiidae - ordem Ciconiiformes), Lopes *et al.* (2007) encontrou 62,5% de polimorfismo. Utilizando locos de *Nycticorax nycticorax*, Chang *et al.* (2009) teve uma grande eficiência na taxa de amplificação heteróloga (variando de 54,5% em *Ardea purpurea* e *Botaurus stellaris* a 81,8% em *Egretta garzetta* e *Bubulcus ibis*), porém todas as espécies alvo pertenciam à mesma família da espécie original (Ardeidae). Santos (2005) testou cinco locos sintetizados para a espécie *Nipponia nippon* em *Eudocimus ruber*, ambas espécies pertencentes à mesma família Threskiornithidae, e encontrou 100% de sucesso na amplificação heteróloga.

A prospecção de novos locos espécie-específicos é um processo relativamente demorado e custoso. As limitações no isolamento de microssatélites nesses organismos são justificadas pelo fato de que o genoma das aves contém dez vezes menos microssatélites do que o genoma dos outros organismos (FARIA *et al.*, 2007; PRIMMER *et al.*, 1997). Os locos heterólogos de microssatélites utilizados neste trabalho possibilitaram a caracterização genética das populações dessa espécie, com a avaliação do nível de diversidade e estruturação genética das duas populações. O investimento de trabalho feito nesse passo inicial desse estudo foi alto, mas não foram custosos, porque a maioria dos oligonucleotídeos iniciadores estava disponível no laboratório e essa alternativa provou ser viável.

5.3 Variabilidade Genética

A variabilidade genética avaliada a partir dos locos heterólogos em *Plegadis chihi* foi menor (0,539/0,599) do que a observada na espécie *Eudocimus ruber*, onde foi isolada a maioria dos locos usados (SANTOS, 2005). Esse resultado está concordante com os dados da literatura que demonstram que, na maioria das vezes, os marcadores tendem a ser mais polimórficos e variáveis na espécie na qual eles foram isolados (ELLEGRÉN, 1997).

A heterozigosidade de *Plegadis chihi* foi maior do que a determinada em outras espécies de aves aquáticas com outros conjuntos de locos. Por exemplo, na espécie cabeça seca (*Mycteria americana*) foram encontrados baixos níveis de heterozigosidade num estudo com 10 locos de microssatélites espécie-específicos - 0,360 (TOMASULO-SECOMANDI, 2004) e com quatro locos de microssatélites espécie-específicos - 0,389 (VAN DEN BUSSCHE *et al.*, 1999). Na espécie *Jabiru mycteria*, o estudo foi baseado em cinco locos heterólogos e mostrou um valor de 0,410 (LOPES *et al.*, 2010).

5.4 Diferenciação Populacional

O padrão da distribuição dos alelos e o resultado da AMOVA demonstraram que a maior porção da diversidade está distribuída dentro das populações e não entre elas. O resultado do F_{ST} confirma o grau baixo de diferenciação genética entre as populações (0,009, $p < 0,05$). Esse nível baixo de diferenciação entre as

populações revela que elas não estão fortemente estruturadas geneticamente, provavelmente devido a um intenso fluxo gênico recente ou a um passado comum. O número moderado de migrantes (1,689), suposto pelo número de alelos privados aponta nessa mesma direção, pois em teoria, a migração de um único indivíduo por geração é suficiente para proporcionar uma homogeneização entre populações distintas geograficamente (HARTL; CLARK, 1989). Esse padrão mais homogêneo das duas colônias está de acordo com o esperado pela dinâmica metapopulacional, que prevê baixa diferenciação genética entre as populações das colônias reprodutivas. Estudos envolvendo um número maior de populações e um número maior de locos poderá confirmar esse padrão. Dentro da mesma família Threskiornithidae foram encontrados baixos níveis de estruturação genética entre populações de *Platalea ajaja* (MIÑO, 2006; SANTOS *et al.*, 2005), em estudos baseados no DNA mitocondrial e em microssatélites.

As duas colônias Alvorada e Tapes se formaram ambas na região de banhado, se diferenciando apenas no seu substrato vegetal, em Alvorada predomina o sarandi e em Tapes o junco. Como se diferenciaram geneticamente, essas populações não podem ser consideradas como pertencentes a uma mesma população, seu manejo, portanto, deve considerar essa característica.

O tamanho efetivo populacional (N_e) é definido como o tamanho de uma população ideal (FISHER, 1930; WRIGHT, 1931) que tem a mesma taxa de mudança das frequências alélicas ou heterozigosidade, como a população observada (LUIKART *et al.*, 2010). Os valores de N_e obtidos mostram que as colônias de Tapes e Alvorada possuem tamanhos efetivos similares. Os achados estão de acordo com o censo visual estimado em 10.000 indivíduos para cada colônia (Scherer com. pessoal), pois o censo demográfico está relacionado com o tamanho efetivo da população. O tamanho populacional efetivo (N_e) está entre os parâmetros mais importantes para a manutenção da vida e conservação, já que esse valor detecta o risco de extinção das populações (LUIKART *et al.*, 2010). Valores de N_e poderão ser recalculados no futuro para essa mesma população do Rio Grande do Sul e servirem como parâmetros para o seu monitoramento.

5.5 Parentesco Genético

Estudos de parentesco utilizando técnicas moleculares têm colaborado com as pesquisas sobre evolução e ecologia comportamental de organismos, revelando aspectos não resolvidos da biologia reprodutiva e da história natural das espécies (AVISE, 2004). A maioria dos estudos sobre sistemas de acasalamento tem sido realizados em passeriformes e espécies que habitam as regiões temperadas (STUTCHBURY; MORTON, 2008). Existe ainda uma grande lacuna com relação ao conhecimento dos sistemas genéticos de acasalamento em espécies de aves aquáticas neotropicais (MIÑO; DEL LAMA, 2009).

A probabilidade mínima de dois indivíduos serem iguais quanto aos seus genótipos multilocos (P_I) foi um em 40.000 indivíduos na população de Alvorada e de um indivíduo em 50.000 em Tapes. A probabilidade de excluir um falso pai, com o grupo de locos utilizados neste trabalho foi 98%. Em conjunto, esses valores mostram que os marcadores de microssatélites utilizados neste trabalho possuem poder para atender aos objetivos da análise e dão suporte e confiança quanto aos resultados das análises de parentesco genético.

O valor de parentesco médio entre os ninhos refletiu o esperado para uma amostra de indivíduos não aparentados. Já o valor de parentesco médio dentro dos ninhos mostrou-se mais próximo do esperado para meio-irmãos ou irmãos-completos, o que aponta para o fato de que o sistema de acasalamento do tapicuru deve ser predominantemente monogâmico, mas não se descarta a ocorrência de fertilização extra-par, porque os valores médios dentro dos ninhos estão próximos do valor esperado para meio-irmãos.

Os valores de corte observados para se distinguir entre diferentes categorias de relacionamento (0,122 e 0,336) não diferiram muito dos valores teóricos esperados para populações ideais (0,125 e 0,375), de acordo com os valores médios de parentesco entre as três classes de relacionamentos (0,5, 0,25 e 0). Esse fato indica que as amostras populacionais estudadas comportam-se de maneira semelhante às populações panmíticas.

Embora o número total de pares de filhotes para os quais se chegou numa classificação final de relacionamento genético representou 55% dos pares analisados, pode-se dizer que para esse grupo o diagnóstico foi confiável, pois o procedimento utilizado na classificação foi bastante criterioso. A impossibilidade de se amostrar adultos nos ninhos dificulta o uso de um procedimento direto de classificação baseado na comparação entre os genótipos dos filhotes e dos pais para se chegar à categoria do relacionamento genético entre os ninhegos (MIÑO, 2010).

Dentre os pares que foram adequadamente classificados numa categoria de relacionamento, 62% deles demonstraram ser irmãos-completos. Esse resultado está de acordo com um sistema de acasalamento genético de tipo monogâmico, o que, pela sua vez, concorda com estudos feitos nessa espécie a partir de observações ecológicas (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003; RYDER; MANRY, 1994). O fato do valor médio de parentesco determinado dentro dos ninhos estar mais próximo do esperado para meio-irmãos e porque meio-irmãos também foram diagnosticados em 5% dos pares diagnosticados levam a suposição de que a cópula extra-par ocorre nesta espécie, como já foi reportado para outras espécies da mesma família (MIÑO; DEL LAMA, 2009). Os 33% dos filhotes amostrados dentro dos mesmos ninhos que foram diagnosticados como não-relacionados, podem ser explicados supondo ocorrência de parasitismo de ninho intraespecífico no tapicuru. A presença de parasitismo intraespecífico nesta espécie já foi suposta com base em observações ecológicas (DARK-SMILEY; KEINATH, 2003).

A principal dificuldade na classificação dos pares de ninhegos (45%) se deu pela falta de poder estatístico para se atingir um nível adequado de significância no programa Kingroup. Exemplificando, embora os valores de parentesco pelo índice Queller e Goodnight (1989) e o relacionamento indicado pela análise de máxima verossimilhança tenham concordado para a maioria dos irmãos completos (FS), o teste de hipótese não foi significativo em alguns casos (por exemplo, pares Tp19-Tp18, Tp44-Tp45, Tp66-Tp67, Tp160-Tp161). Se considerássemos apenas o resultado do programa ML-Relate (que considera a presença dos alelos nulos) e o valor de parentesco segundo Queller e Goodnight (1989), verificaria que houve um grande número de pares irmãos-completos (35%) que não foram diagnosticados

pelo critério adotado, pois este requer concordância entre todos os métodos. Como a presença de alelos nulos é esperada nos locos heterólogos (WAGNER *et al.*, 2006), esses pares foram não classificados. Essa análise dos pares não diagnosticados revela que a monogamia pode estar presente em maior proporção, sendo o sistema predominante da espécie.

6. CONCLUSÃO

- Os seis locos de microssatélites heterólogos polimórficos identificados no presente estudo foram eficazes para a avaliação da variabilidade genética das populações, sendo cinco deles usados no estudo de parentesco genético.
- Análises a partir dos genótipos nos locos de microssatélites heterólogos evidenciaram um grau relativamente alto de variabilidade genética nas populações estudadas.
- A sexagem molecular possibilitou a clara distinção entre os sexos e detectou que a razão sexual observada entre machos e fêmeas foi igual à esperada (1:1) nas populações.
- A diferenciação genética entre as duas populações foi baixa. Esse padrão pode ser explicado por fluxo gênico recente entre elas ou um por passado comum. Essa homogeneidade está de acordo com a dinâmica metapopulacional proposta para a formação das colônias na espécie.
- Foram identificadas as categorias de relacionamentos de 55% dos pares de filhotes coletados nos mesmos ninhos. Concluiu-se que o sistema genético de acasalamento da espécie não é exclusivamente monogâmico, pois 5% dos pares foram diagnosticados como meio-irmãos e 33 % como não-relacionados, apontando para a provável ocorrência de cópula extra-par e parasitismo de ninho.

Este trabalho representa o primeiro estudo de genética de populações e parentesco genético em *Plegadis chihi* e fornece dados importantes para ampliar o entendimento da sua biologia e delinear propostas para sua conservação e manejo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M. *et al.* Birds of rice fields in the Americas. **Waterbirds**, v. 33, p. 105-122, 2010. Special Publication I.
- ALFORD, E. H. **Early nesting by White-faced Ibis in relation to habitat: an adaptive advantage.** Master's thesis, Brigham Young University, Provo, UT. 1978.
- ANMARKRUD, J. A. *et al.* Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasmy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrUJo*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n.138. 2008.
- AVISE, J. C. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. **Ibis**. v. 138, n. 1, p. 16-25. 1996.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution.** 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2004
- AYRES, M. *et al.* **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas.** Ong Mamiraua. Belém, PA. 2007.
- AZAMBUJA, I. H. V.; FAGUNDES, P. R. R.; MAGALHÃES Jr., A. M. **Importância sócio-econômica da lavoura de arroz irrigado.** MAGALHÃES Jr, A.M.; FAGUNDES, P. R. R. (Ed.). Agricultura real: arroz irrigado. Pelotas: EMBRAPA/CPACT, p. 7 - 8. 1996.
- BARBARÁ, T. *et al.* Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3759-3767. 2007.
- BARR, K. R. *et al.* Population structure in an endangered songbird: maintenance of genetic differentiation despite high vagility and significant population recovery. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3628–3639. 2008.
- BELTON, W. **Aves do Rio Grande do Sul: distribuição e biologia.** São Leopoldo, Unisinos, Brasil, 1994. 584 p.1994
- BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **Trends Ecology Evolutionary**, v. 18, p. 503–511. 2003.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 453-455. 1996.
- CAMPANINI, E. B. *et al.* **Isolamento de marcadores microssatélites em populações brasileiras de *Bubulcus ibis* (Ciconiiformes: Ardeidae).** In: 56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá (SP) - Brasil. 56 Congresso Brasileiro de Genética. Resumo. 2010.
- CAPARROZ, R. **Filogeografia, estrutura e variabilidade genética da Arara-canindé (*Ara ararauna*, Psitaciformes: Aves) no Brasil baseadas na análise de DNA mitocondrial e de DNA nuclear.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade de São Paulo.105 p. 2003.
- CAPEN, D. E. Eggshell thickness variability in the white-faced Ibis. **The Wilson Bulletin**, v. 89, p. 98-106. 1977.
- CARO, T. The behaviour-conservation interface. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 9, p. 366-369. 1999.
- CARVALHO, C. B. V.; MACEDO, R. H. E.; GRAVES, J. A. Breeding strategies of a socially monogamous Neotropical passerine extra-pair fertilizations, behaviour and morphology. **Condor** v. 108, p. 579-590. 2006.

- CHAKRABORTY, R. *et al.* Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. **Annals of Human Genetics**, v. 56, p. 45-47. 1992.
- CHANG, Q. *et al.* Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. **Conservation Genetics**, v. 10, p.1537–1539. 2009.
- CHESSER, R. T. *et al.* FiFty-First supplement to the American ornithologists' union Check-List of North American Birds. **The Auk**, v. 127(3), p.726–744. 2010.
- CHESSER, R. T. *et al.* Molecular phylogeny of the spoonbills (Aves: Threskiornithidae) based on mitochondrial DNA. **Zootaxa**, v. 2603, p. 53-60. 2010.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001-2014. 1996.
- DARK-SMILEY, D.; KEINATH D. **Species assessment for White-faced ibis (*Plegadis chihi*) in Wyoming**. 2003.
- DAVIES, N. B. **Mating systems**. In: KREBS, J.R.; DAVIES, N.B. Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach. Blackwell Scientific Publications, p. 263-294. 1991.
- DAWSON, R. J. *et al.* Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. **Heredity**, v. 79, p. 506-514. 1997.
- DE LEÓN, F. J. G.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1785). **Molecular Ecology**, v.6, p.51-56. 1997.
- DE WOODY, J. A. Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: Practical applications for wild animals. **Journal of Wildlife Management**, v. 69, n. 4, p. 1400-1418. 2005.
- DIAS, R. A.; BURGER, M. I. A assembléia de aves de áreas úmidas em dois sistemas de cultivo de arroz irrigado no extremo sul do Brasil. **Ararajuba** v.13 n.1, p. 63-80. 2005.
- EISEN, J. A.. **Mechanistic basis for microsatellite instability**. In: GOLDSTEIN, D. B. et al, (Ed.). Microsatellites: evolution and applications. Oxford: Oxford University Press. p. 34 - 48. 1999.
- ELLEGREN, H. *et al.* Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. **Molecular Biological Evolution**, v. 14, p. 854–860. 1997.
- EMLEN, S. T.; ORING, L. W. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. **Science** v. 197, n. 4300, p. 215-223. 1977.
- ESTOUP, A. *et al.* Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 1427–1431. 1993.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. v. 10, p. 564-567. 2010.
- FARIA, P. J. *et al.* Challenges and prospects of population genetic studies in terns (Charadriiformes, Aves). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, 3, p. 681-689. 2007.
- FASOLA; RUIZ, X. The value of rice fields as substitutes for natural wetlands for waterbirds in the Mediterranean region. **Colonial Waterbirds** v. 19 (special publication 1), p. 122–128. 1996.
- FIELD, R. L.; SCRIBNER, K. T. Isolation and characterization of novel waterfowl microsatellite loci: cross-species comparisons and research applications. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 199-202. 1997.

- FISHER, R. A. **The genetical theory on natural selection**. Oxford: Clarendon Press. 1930.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **A primer of Conservation Genetics**. 2004.
- GAGGIOTTI, E. O. *et al.* A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular ecology**, v.8, p.1513-1520. 1999.
- GALBUSERA, P.; VAN DONGEN, S.; MATTHYSEN, E. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. **Conservation Genetics** v1. p.163-168. 2000.
- GETZNER, M. Investigating public decisions about protecting wetlands. **Journal of Environmental Management**, v. 64, v. 237-246. 2002.
- GILL P. D.; SLATER, J. B.; GRAVES, J. A. Extra-pair paternity and song characteristics in the willow warbler *Phylloscopus trochilus*. **Journal of Avian Biology**. v. 38, n. 3, p. 291-297. 2007.
- GOODMAN, S. J. RST CALC: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 881-885. 1997.
- GONÇALVES DA SILVA, A.; RUSSELLO, M. A. iREL: software for implementing pairwise relatedness estimators and evaluating their performance. **Conservation Genetic Resources**. 2010.
- GOODNIGHT, K. F.; QUELLER, D. C. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1231-1234. 1999.
- GOUDET J. 1995. FSTAT (version 1.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486. 1995.
- GRIFFITHS, R. *et al.* A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p.1071-1075. 1998.
- GRIFFITH, S.C.; OWENS, I. P. F.; THUMAN, K. A. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 11, p. 2195-2212. 2002.
- GRIFFITH, S. C. The role of multiple mating and extra-pair paternity in creating and reinforcing boundaries between species in birds. **Emu**, v. 110, n. 1, p. 1-9. 2010.
- GROOSSEN, J. P. *et al.* Distribution and breeding status of the white-faced ibis, *Plegadis chihi*, in Canada. **Canadian field-naturalist**. Ottawa ON [CAN. FIELD-NAT.]. v. 109, n. 4, p. 391-402. 1995.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 2nd edn. Sinauer Ass. Inc. Sunderland, Massachusetts. 1989.
- HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetic Research**, v. 38, p. 209-216. 1981.
- HOSHINO, A. A. *et al.* Marcador Microsatélite na Conservação de Germoplasma Vegetal. **Biociência**, v. 29, p.146-150. 2002.
- INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE (IUCN) 2008. **Red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/news/biodiversity-crisis>> Acesso em: 16/12/2010.
- ISHIBASHI, Y.; MIKAMI, O.; ABE, S. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Japanese marsh warbler *Locustella pryeri*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 373-375. 2000.
- IVEY, G. L.; STERN, M. A.; CAREY, C. G. An increasing white-faced Ibis population in Oregon. **West. Birds**, v. 19, p. 105-108. 1998.

- IVEY, G. L.; SEVERSON D. J. White-faced Ibis nesting in the southern San Joaquin Valley of California. **Condor**, v. 86, p. 492–493. 1984.
- JI, Y. J. *et al.* Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes, Threskiornithidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 615-617. 2004.
- JOHNSON, A. *et al.* 1998. Sexual conflict over fertilizations: female bluethroats escape male paternity guards. **Behavior Ecology Sociobiological**, v. 43, p. 401- 408. 1998.
- KALINOWSKI, S. T. *et al.* Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106. 2007.
- KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER M. L. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 576-579. 2006.
- KANEKO, K. D. **Nesting of the White-faced Ibis (*Plegadis chihii*) on Utah Lake**. Master's thesis, Brigham Young University, Provo, UT. 1972.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-738. 1964.
- KONOVALOV, D. A.; HEG, D. A maximum-likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 256-263. 2008.
- KONOVALOV, D. A.; MANNING, C.; HENSHAW, M. T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kingroup assignments using genetic markers. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 779–782. 2004.
- KOTTER, B. L.. **An ecological natural history if the White-faced Ibis (*Plegadis chihii*) in northern Utah**. Master's thesis, University of Utah, Salt Lake City. 1970.
- LACY, R. **Managing genetic diversity in captive populations of animals**. In: BOWLES, M.; WHELAN, J. C. Restoration of Endangered Species: Conceptual Issues, Planning and Implementation. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1994.
- LACK, D. **Ecological adaptations for breeding in birds**. London: Methuen. 1968.
- LEHMANN, L.; PERRIN, N. Inbreeding avoidance through kin recognition: choosy females boost male dispersal. **American Naturalist**, v. 162, p. 638–652. 2003.
- LI, S.H.; YI-JIUN, H.; BROWN, J. L. Isolation of tetranucleotide microsatellites from the Mexican jay *aphelocoma ultramarina*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 499–501. 1997.
- LIGON, J. D. **The evolution of avian breeding systems**. New York: Oxford University Press. 1999.
- LOPES, I. F.; HAIG, S.; DEL LAMA, S. N. Genetic Characterization of Neotropical Jabiru Storks: Insights for Conservation. **Waterbirds** (De Leon Springs, Fla.). JCR, v. 33, p. 425-437. 2010.
- 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 Biology**, v. 7(4, Suppl.), p. 849-857. 2007.
- LUIKART, G. *et al.* Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 355-373. 2010.
- LUIKART, G. *et al.* Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heretic**, v. 89, p. 238-247. 1998.

- LUIKART, G.; CORNUET, J. M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v. 12, p. 228-237. 1998.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- MATHEU, E., DEL HOYO, J. **Family Threskiornithidae (Ibises and Spoonbills)**. In: DEL HOYO J. Handbook of the birds of the world, A. Elliott & J. Sargatal (Eds.) v. 1 p. 472-506. Lynx Edicions, Barcelona. 1992.
- MCGUIRE, H. L.; NOOR, M. A. F. Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n.2, p. 170 – 172. 2002.
- MILLER, C. R.; WAITS, L. P. **The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*)**: implications for conservation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100, p. 4334–4339. 2003.
- MIÑO, C. I. **Estrutura genética e Relações de parentesco em populações naturais de colhereiro (Aves: Threskiornithidae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. 2006.
- MIÑO, C. I.; DEL LAMA, S. N. **Sistemas de acasalamento e biologia reprodutiva em aves aquáticas neotropicais**. Oecologia Brasiliensis v. 13, p. 141-152. 2009.
- MIÑO, C. I. **Genética de Populações e Relações de Parentesco em Ciconiiformes (Aves)**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução. 2010.
- MOORE, S. S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, p. 654–660. 1991.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182. 1993.
- NEIFF, J. **Diversity in some tropical wetland systems of South America**. In: GOPAL, B.; JUNK, W.; DAVIS, J. (Ed.). Biodiversity in Wetlands: assessment, function and conservation Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, v.2, p. 157-186. 2001.
- OKLAND, J. M. *et al.* A method for defining management units based on genetically determined close relatives. **Ices Journal of Marine Science**, v. 67, n. 3, p. 551-558. 2010.
- OSTERHOUT, V. C. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538. 2004.
- PADELA, J. A. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in lesser kestrel (*Falco naumanni*) and cross-amplification in common kestrel (*Falco tinnunculus*). **Conservation Genetic**, v. 10, p.1357–1360. 2009.
- PAINTER, J. *et al.* Characterization of microsatellite loci for a co-operatively breeding honeyeater. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1103–1105. 1997.
- PALMER, R. S. **Handbook of North American birds**, Yale University Press, New Haven, CT. v. 1. 1962.
- PALO, J. U. *et al.* Microsatellite variation in ringed seals (*Phoca hispida*): genetic structure and history of the Baltic Sea population. **Heredity**, v. 86, p. 609-617. 2001.
- PARKES, K. C. **Systematic notes on North American birds**. 1. The herons and ibises (Ciconiiformes). Ann. Carnegie Mus. V. 33, p. 287-293.1955.

- PEAKALL R.; SMOUSE P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295. 2006.
- PEEL D.; OVENDEN J. R.; PEEL S. L. **Neestimator**: software for estimating effective population size. Brisbane, Australia: Queensland Government; Department of Primary Industries and Fisheries, 2004. Version 12.
- PEMBERTON, J. M. Wild pedigrees: the way forward. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 275, n. 1635, p. 613-621. 2008.
- PETRY, M. V., FONSECA, V. S. Breeding success of the colonist species *Bubulcus ibis* (Linnaeus, 1758) and four native species. **Acta Zoologica, Stockholm**, v. 86, p. 217-221. 2005.
- POWELL, G. V. N.; BJORK, R. D. **Relationships between hydrologic conditions and quality and quantity of foraging habitat for Roseate Spoonbill and other wading birds in the C 111 basin**. Homestead: South Florida Research Center; Everglades National Park Services, 1990.
- PRIMMER, C. R.; MOLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A wide range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 365-378. 1996.
- PRIMMER, C. R. *et al.* Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**, v. 7, p. 471-482. 1997.
- PRIMMER, C. R. *et al.* Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**, v. 36, p. 348-360. 2005.
- PRITCHARD, J. K. *et al.* Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959. 2000.
- PUSEY, A.; WOLF, M. Inbreeding avoidance in animals. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 201-206. 1996.
- QUADER, S. Mate choice and its implications for conservation and management. **Current Science**, v. 89, n. 7, p. 1220-1229. 2005.
- QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, n. 2, p. 258-275. 1989.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225. 1989.
- ROSE, P. M., SCOTT, D. A. **Waterfowl population estimates**. Cambridge: International Waterfowl and Wetlands. Research Bureau. 1994.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106. 2008.
- RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 9, p. 2829-2840. 2004.
- RYDER, R. A. Distribution, migration and mortality of the White-faced Ibis (*Plegadis chih*) in North America. **Bird-Banding**, v. 38, p. 257-277. 1967.
- RYDER, R. A.; MANRY, D. E. **White-faced Ibis (*Plegadis chih*)**. In: THE BIRDS of North America. No. 130 Philadelphia: The Academy of Natural Sciences; Washington, D.C.: The American Ornithologists' Union, 1994.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. 1989.
- 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.
- SAWYER, G. M. **DNA profiling of captive Roseate Spoonbill (*Ajaia ajaja*) populations as a mechanism of determining lineage in colonial nesting birds**. Tese (Doutorado em Ciências) University of North Texas. 2002.
- SCHLÖTTERER, C. Hitchhiking mapping: functional genomics from the population genetics perspective. **Trends Genetics**, v. 19, p. 32–38. 2003.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? **Nature**, London, v. 5, p. 63-69. 2004.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234. 2000.
- SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; WAPLES, R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. **Trends Ecological Evolution**, v. 22, n. 1, p. 25-33. 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.
- SHAW, P. W.; PIERCE, G. J.; BOYLE, P. R. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 407–417. 1999.
- SHINDE, D. *et al.* *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 974–980. 2003.
- SHUSTER, S. M.; WADE, M. J. **A classification of mating systems**. Pp 262-369. In: Mating Systems and Strategies. S.M. Shuster & M.J. Wade. Princeton University Press. 520 p. 2003.
- SICK, H. **Birds in Brazil**. Princeton, N.J: Princeton University Press, 1993.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 912 p.1997.
- SLATKIN, M. 1985. Gene Flow in natural populations. **Annual Review Ecology Systematic** 16: 393–430. 1985.
- SLATKIN, M.; BARTON, N. H. 1989. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, p.1349-1368. 1989.
- SOLÉ-CAVA, A. M. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. In: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Ribeirão Preto-SP, p. 172-192. 2001.
- STEELE, B. B. 1980. **Reproductive success of the Whitefaced Ibis**: effects of pesticides and colony characteristics. Unpublished master's thesis, Utah State University, Logan. 1980.
- STUTCHBURY, B. J. M.; MORTON, E. S.; WOOLFENDEN, B. Comparison of the mating systems and breeding behavior of a resident and a migratory tropical flycatcher. **Journal of Field Ornithology**, v. 78, p. 40-49. 2007.
- STUTCHBURY, B. J. M.; MORTON, E. S. Recent advances in the behavioral ecology of tropical birds. The 2005 Margaret Morse Nice Lecture. **Wilson Journal of Ornithology**, v. 120, n. 1, p. 26-37. 2008.

- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471. 1989.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. **Simple sequences**. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 4, p. 832 – 837. 1994.
- TEMPLETON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory**. Willey-Liss. New Jersey. 2006.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A. M. *et al.* Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 563-566. 2003.
- TOMASULO-SECCOMANDI, A. M. **Populações de *Mycteria americana* L. (Aves; Ciconiiformes) da América do Norte e do Pantanal brasileiro: estruturação genética, razão sexual e assimetria flutuante**. PhD teses, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004.
- VAN DEN BUSSCHE, R. A. *et al.* Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria americana*). **Auk**, v. 116, p.1083–1092. 1999.
- VÉLEZ, E. **Estrutura das comunidades de aves aquáticas no complexo de áreas úmidas de Tapes e Arambaré, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Unpublished Dissertation (Master in Ecology), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. 1997.
- WAGNER, A. P.; CREEL, S.; KALINOWSKI, S. T. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. **Heredity**, v. 97, n. 5, p. 336-345. 2006.
- WANDELER, P. *et al.* Patterns of nuclear DNA degeneration over time - a case study in historic teeth samples. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1087–1093. 2003.
- WATTIER, R. *et al.* Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus *Gv1CT* in *Gracilaria gracilis* (*Rhodophyta*). **Molecular Ecology**, v. 7, p.1569–1573. 1998.
- WEBSTER, M. T.; SMITH, N. G. C.; ELLEGREN, H. Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 8748–8753. 2002.
- Wetlands Internacional. 2006. **Waterbird population estimates**. 4th ed. Wetlands International. 239p.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97–159. 1931.
- XU, Z. *et al.* Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellite. **Aquaculture**, v. 199, p. 13-40. 2001.
- YEUNG, C. K. L. *et al.* Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. **Conservation Genetics**, v. 10, p.1081–1084. 2009.
- ZARDOYA, R. *et al.* **Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes)**. *Proc. Royal Soc. London B*, 263, p. 1589–1598. 1996.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16. 2002.
- ZINK, A. G. The evolution of intraspecific brood parasitism in birds and insects. **American Naturalist**, v. 155, n. 3, p. 395-405. 2000.