

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**ANÁLISE GENÉTICA MOLECULAR (RAPD) DE *Conopophaga melanops*, Vieillot 1818
(AVES, CONOPOPHAGIDAE), EM ESCALA FINA DA MATA ATLÂNTICA E SUA IMPLICAÇÃO
PARA A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.**

VITOR DE OLIVEIRA LUNARDI

Orientador: Prof. Dr. **PEDRO MANOEL GALETTI JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

S ã o C a r l o s
Estado de São Paulo – Brasil
Abril - 2004

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**ANÁLISE GENÉTICA MOLECULAR (RAPD) DE *Conopophaga melanops*, Vieillot 1818
(AVES, CONOPOPHAGIDAE), EM ESCALA FINA DA MATA ATLÂNTICA E SUA IMPLICAÇÃO
PARA A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.**

VITOR DE OLIVEIRA LUNARDI

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

L961ag

Lunardi, Vitor de Oliveira.

Análise genética molecular (RAPD) de *Conopophaga melanops*, Vieillot 1818 (Aves, Conopophagidae), em escala fina da Mata Atlântica e sua implicação para a conservação da espécie / Vitor de Oliveira Lunardi. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

58 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Aves. 2. RAPD. 3. Mata Atlântica. 4. Genética de populações. 5. Conservação (biologia). I. Título.

CDD: 598 (20^a)

**Dedico esta dissertação aos meus amigos
do Laboratório de Citogenética da UFSCar.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que colaboraram para a realização deste trabalho, principalmente:

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, meus sinceros agradecimentos pela orientação, confiança e por iniciar a minha formação científica. Sou grato por todos estes anos de convivência e trabalhar sob a sua orientação foi um grande privilégio e honra.

Ao grande amigo Mercival Roberto Francisco, pela sua amizade, por todos os ensinamentos em Ornitologia e todas as suas inestimáveis sugestões durante o planejamento e execução deste trabalho. Obrigado por ter me incentivado a trabalhar com genética de pássaros da Mata Atlântica.

Aos professores Luiz Antonio Carlos Bertollo e Orlando Moreira Filho por terem colaborado com a minha iniciação científica e mestrado, por todas as suas valiosas discussões, críticas e sugestões. Agradeço também os professores José Salatiel Rodrigues Pires, Nivaldo Nordi, Odete Rocha, Manoel Martins Dias Filho, Júlio Garavello, Cristiano dos Santos Neto, Marco del Lama e Mauro Galetti pelas inúmeras contribuições à minha formação acadêmica.

Às amigas Terumi Hatanaka e Patrícia Domingues de Freitas, por terem me orientado nos procedimentos laboratoriais e análise de RAPDs.

Aos queridos amigos de laboratório Terumi, Patrícia, Ana Karina, Marc, Célia, Eloize, Renata, Alexandra, Paulo, Priscila e Fernando, pela orientação, paciência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Sou grato à vocês e também aos amigos ‘citogeneticistas’ Carol, Elisângela, Liano, Wellington, Débora, Vera, Celeste, Marcelo, Karine, Rubens, Thaís e às meninas do Genoma (Mari, Carol, Kely), pelos ótimos momentos de alegria e realizações durante estes anos, e, principalmente, por terem contribuído com a minha formação profissional e humana.

Às pesquisadoras Maíra Goulart (UFMG), Daniela Lacerda (UFMG) e, especialmente, à Maria Imaculada Zucchi (USP/ESALQ), por terem me auxiliado com as análises estatísticas.

À CAPES pela bolsa de Mestrado, ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Centro de Pesquisas para a Conservação da Aves Silvestres (CEMAVE) / IBAMA, ao Conselho de Gestão ao Patrimônio Genético (CGEN) / MMA, ao Instituto Florestal de São Paulo (IF-SP), ao Parque Estadual da Serra do Mar, e à Estação Ecológica Juréia-Itatins, que possibilitaram o acesso às aves.

Às pessoas que aqui não foram relatadas, mas que tiveram, de algum modo, certa participação execução deste trabalho, agradeço o apoio e compreensão.

Sou especialmente grato:

Aos amigos Mercival, Ana Karina, Patrícia, Célia, Eloize, Alexandra e, principalmente, à Terumi e ao meu “irmão” Marc.

À minha mãe, Nilza, e à minha irmã, Nadia (seria impossível expressar em palavras toda a minha gratidão e amor que sinto por vocês).

À minha família.

e aos pássaros capturados durante as nossas pesquisas na Mata Atlântica.

"...nossas preciosas matas vão desaparecendo, vítimas do fogo e do machado da ignorância e do egoísmo; nossos montes e encostas vão-se escalvando diariamente, e com o andar do tempo faltarão às chuvas fecundantes, que favorecem a vegetação e alimentam nossas fontes e rios, sem o que o nosso belo Brasil, em menos de dois séculos, ficará reduzido aos páramos e desertos da Líbia. Virá então este dia, terrível e fatal, em que a ultrajada natureza se ache vingada de tantos erros e crimes cometidos."

José Bonifácio de Andrada e Silva (1763-1838), primeiro político brasileiro que tentou frear a destruição das florestas brasileiras durante à expansão das lavouras cafeeiras e da mineração.

Foi um dos maiores geólogos de sua época e o pioneiro em ecologia no Brasil, fazendo previsões corretas sobre a situação da Mata Atlântica para os séculos XX e XXI.

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
1. INTRODUÇÃO	
1.1 A Mata Atlântica	1
1.2 Populações nos grandes remanescentes da Mata Atlântica	2
1.3 Análises genéticas populacionais de aves Neotropicais	3
1.4 A espécie <i>Conopophaga melanops</i>	5
1.5 Análise da estrutura genética de populações através de marcadores RAPD	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS e MÉTODOS	
3.1 Área de estudo	11
3.2 Número amostral	11
3.3 Coleta de amostras de sangue	16
3.4 Extração de DNA de tecido sangüíneo	16
3.5 Quantificação de DNA	19
3.6 Reações de RAPD-PCR	19
3.7 Análises dos géis de RAPD	20
3.8 Análises estatísticas	
3.8.1 Análise da estruturação genética populacional 1: análises baseadas na variabilidade dos dados binários, independentes da suposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg	21
3.8.2 Análise da estruturação genética populacional 2: análises genéticas baseadas na suposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg	24
3.8.3 Correlação entre distâncias genéticas e geográficas	26
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	
Análise da estrutura genética de <i>C. melanops</i> utilizando marcadores RAPD	36
Interpretação das análises estatísticas	36
Estrutura genética de <i>C. melanops</i> em escala fina da Mata Atlântica	38
Comparação com outros taxa Neotropicais	40
Implicações conservacionistas	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXOS	III

Análise genética molecular (RAPD) de *Conopophaga melanops*, Vieillot 1818 (Aves, Conopophagidae) em escala fina da Mata Atlântica e sua implicação para a conservação da espécie

Autor: Vitor de Oliveira Lunardi

Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior

Resumo

Conopophaga melanops é uma espécie de pássaro endêmica da Mata Atlântica que teve seu habitat altamente alterado pelo processo histórico de intenso desmatamento. Atualmente, suas populações sobrevivem isoladas em muitos fragmentos pequenos e em poucas áreas contínuas. O objetivo deste trabalho foi estimar a diferenciação genética dentro e entre três populações de *C. melanops* localizadas dentro do maior trecho contínuo protegido da Mata Atlântica remanescente, utilizando a técnica molecular RAPD-PCR, a fim de fornecer uma melhor compreensão dos padrões geográficos da variação genética da espécie em um contexto original em escala fina. As análises moleculares revelaram divergência genética significativa entre as três populações em um transecto contínuo de 250 km. Este resultado poderia ser explicado primariamente pelo suposto sedentarismo da espécie e pelas barreiras geográficas ao fluxo gênico. Isolamentos em refúgios florestais durante o Pleistoceno e os impactos antrópicos recentes dentro da região analisada poderiam ser fatores adicionais para explicar a diferenciação encontrada.

Abstract

Conopophaga melanops is an endemic Atlantic forest bird species that had its habitat drastically fragmented by the historical process of massive deforestation. Today, its populations have survived isolated in small fragments and a few continuous forests, compromising the potential of the species to overcome natural and anthropic disturbances. The aim of this study was to estimate genetic differentiation among and within three populations of *C. melanops* in the major protected continuum of an Atlantic forest remnant using RAPD-PCR, to provide a better understanding of the geographical patterns of genetic variation of the species in fine scale and original context. The genetic molecular analyses showed a statistically significant genetic divergence among the three *C. melanops* populations in a continuum transect of 250 km. Primarily, this could be explained by the assumed sedentarism of the species and by the geographical barriers to gene flow. Pleistocene refuges and recent human impact could be additional factors to explain the current genetic differentiation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *A Mata Atlântica*

Desde a chegada dos colonizadores europeus no século XVI, a Floresta Tropical Atlântica da América do Sul, também conhecida como Mata Atlântica, vem sendo incontrolavelmente destruída e alterada pelas atividades humanas. Hoje, cerca de apenas 8% da sua cobertura original preserva-se intacta (Conservation International do Brasil *et al.*, 2000). Embora poucos casos de extinções tenham sido relatados devido a este processo de devastação (Budiansky, 1994), há estimativas de futuras extinções em massa na Mata Atlântica (Brooks & Balmford, 1996). A situação da Mata Atlântica torna-se ainda mais preocupante quando se evidencia que este bioma abriga uma excepcional concentração de espécies endêmicas e apresenta uma excessiva perda de habitat, justificando a indicação deste bioma como um dos cinco principais “pontos quentes” (*hotspots*) do planeta a serem prioritariamente conservados (Myers *et al.*, 2000).

Atualmente, os esforços para a conservação da Mata Atlântica enfrentam três principais desafios: 1) seus domínios abrigam 70% da população brasileira e os grandes pólos industriais, 2) os recursos humanos e financeiros são insuficientes para reverter o processo de degradação, e 3) ainda há uma lacuna de conhecimentos sobre essa região – espécies novas são constantemente descobertas e muitas regiões ainda são pouco conhecidas do ponto de vista científico (Conservation International do Brasil *et al.*, 2000).

Originalmente, a cobertura da Mata Atlântica era de mais de um milhão de km², sendo uma área contínua ao longo da costa brasileira entre as latitudes 6° a 32°S, cobrindo também o interior dos estados das regiões Sul e Sudeste até o Paraguai e Argentina de forma esparsa, além de fragmentos isolados em alguns estados do Nordeste e Centro-

oeste do Brasil. A dinâmica do processo de desmatamento deste bioma resultou em uma excessiva restrição de habitat para as espécies, levando ao isolamento das populações naturais em muitos fragmentos pequenos e em poucas áreas amplas remanescentes (Victor, 1975; Conservation International do Brasil *et al.*, 2000; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2002).

Uma destas áreas amplas remanescentes onde a Mata Atlântica sobrevive com alto nível de integridade ambiental encontra-se ao longo da costa sul e sudeste do Brasil, protegido por escarpas e zonas de montanhas (Willis & Oniki, 1992; Stotz *et al.*, 1996; Conservation International do Brasil *et al.*, 2000). Esta área naturalmente protegida tem sido considerada de extrema importância biológica para a conservação, pois possui características próximas às encontradas na sua condição original, abriga inúmeras espécies endêmicas e uma alta riqueza em muitos grupos taxonômicos, e, também, por representar o maior trecho protegido por Unidades de Conservação da Mata Atlântica remanescente (Conservation International do Brasil *et al.*, 2000).

1.2. Populações nos grandes remanescentes da Mata Atlântica

Considerando que grande parte das espécies de florestas tropical é relativamente intolerante às condições externas da floresta (Turner & Corlett, 1996), o processo de devastação da Mata Atlântica certamente implicou no isolamento de muitas populações.

Dentro das poucas regiões da Mata Atlântica onde a área de distribuição geográfica das espécies permaneceu ampla e relativamente íntegra (grandes remanescentes), muitas populações vêm, provavelmente, persistindo com suas estruturas genética e demográfica praticamente preservadas. Nesta escala fina, o padrão de estruturação genética pode ser

considerado um reflexo da interação entre o genoma e o ambiente no tempo e no espaço, com pouca influência antrópica (Meffe & Carroll, 1994; Escudero *et al.*, 2003).

A análise espacial da diversidade genética nestas regiões relativamente preservadas poderá detectar e caracterizar a estrutura genética natural das espécies, e, com isso, conduzir uma discussão sobre quais foram os fatores ambientais e biológicos responsáveis por tal estruturação. Esta análise poderá ainda fornecer uma compreensão da dinâmica das populações em escala fina na Mata Atlântica, a qual terá grande aplicabilidade em ações conservacionistas em escalas mais amplas desta floresta.

Embora a Mata Atlântica abrigue altos níveis de riqueza e endemismo, raros foram os estudos que analisaram a genética das espécies deste bioma (*e.g.* Cardoso *et al.*, 1998; Francisco, 2001; Margis *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Dantas, 2003; Maroja *et al.*, 2003).

1.3. Análises genéticas populacionais de aves Neotropicais

A avifauna Neotropical é considerada a mais rica do mundo (Sick, 1997), entretanto, pouco é conhecido sobre a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações das espécies de aves desta região (Bates, 2000; McDonald, 2003). Particularmente raros são estudos genéticos em populações de aves florestais em escalas geográficas relativamente pequenas da região neotropical; as aves são geralmente consideradas espécies de alta vagilidade e, por isso, supõe-se que diferenciação genética populacional significativa não seria encontrada em escalas relativamente curtas (Crochet, 1996; Bates, 2000; McDonald, 2003).

Os poucos estudos genéticos em aves neotropicais têm comprovado a existência de alta diferenciação genética entre populações, principalmente em pássaros florestais que

habitam o sub-bosque (Bates, 2000). Caparella (1987) *apud*. Bates (2000), estudando genética de populações de pássaros florestais amazônicos, comprovou a existência de diferenciação genética entre populações separadas fisicamente por rios largos da Amazônia. Este mesmo autor, e também Bates (2000), constataram diferenciação genética entre populações de pássaros que habitam o sub-bosque em escalas finas de áreas florestais contínuas da Amazônia, diferenciação esta atribuída, primariamente, ao comportamento das espécies. Os resultados destes dois trabalhos comprovaram que não apenas as barreiras físicas (rios amazônicos), mas também o sedentarismo, poderiam ser os principais fatores responsáveis pela geração de diferenciação genética entre populações que habitam o sub-bosque da Floresta Amazônica. Além disso, observaram que o nível de diferenciação genética existente entre as populações destes pássaros florestais amazônicos é muito maior que o encontrado entre outras populações de pássaros de florestas temperadas.

As poucas análises genéticas populacionais das aves que habitam a Mata Atlântica referem-se a estudos de populações fragmentadas e isoladas (*e.g.* Francisco, 2001; Dantas, 2003). Tais estudos foram importantes para evidenciar efeitos genéticos da fragmentação sobre algumas populações; por exemplo, Francisco (2001) analisando populações de *Chiroxiphia caudata* (Pipridae) e *Conopophaga lineata* (Conopophagidae) de um fragmento de Mata Atlântica isolado há 72 anos detectou perda de variabilidade genética para ambas as espécies, demonstrando que 112 ha não foram suficientes para manter intacta a estrutura genética destas populações. Entretanto, a interpretação dos resultados de distância genética em populações fragmentadas geralmente não permite uma compreensão da distribuição espacial da variação genética que havia antes do processo de fragmentação se iniciar, pois torna-se difícil determinar o quanto o

isolamento causado pela fragmentação tem contribuído para a diferenciação populacional (Francisco, 2001).

Até o presente, não há resultados de estudos que buscaram investigar a genética populacional de aves dentro dos maiores remanescentes da Mata Atlântica. Um amplo conhecimento da distribuição espacial da diversidade genética das espécies de aves na Mata Atlântica, principalmente nas áreas maiores remanescentes, forneceria importantes informações sobre a dinâmica de populações de aves da região Neotropical, como também representaria um importante parâmetro para o estabelecimento de estratégias futuras visando contribuir com a conservação deste grupo a longo prazo na Mata Atlântica.

1.4. A espécie *Conopophaga melanops* (Vieillot, 1818)

Conopophaga melanops é uma espécie de ave endêmica da Mata Atlântica costeira do Brasil, distribuindo-se do Estado da Paraíba ao de Santa Catarina, sendo comumente encontrada nas matas das baixadas litorâneas da encosta da Serra do Mar (Sick, 1997).

Pertence à família Conopophagidae (Aves, Passeriformes), composta por espécies relativamente pequenas, com tamanho variando de 11 a 13 cm. Possuem como característica marcantes tarsos e dedos longos, e asas e cauda curtas (Meyer de Schauensee & Mack, 1970; Sick, 1997). São pássaros popularmente conhecidos pelos nomes vulgares “chupa-dente” ou “cuspidor”, referentes ao som de sua chamada de advertência (Sick, 1997).

C. melanops habita o sub-bosque de matas fechadas, forrageando solitariamente ou aos pares, a poucas alturas do solo (preferencialmente entre 0 a 2 metros), alimentando-se de artrópodes, principalmente insetos. Geralmente, estes pássaros permanecem pousados

em galhos finos por tempo considerável e fazem constantemente vôos curtos ao solo para apanhar alimento, voltando depois ao poleiro (Alves & Duarte, 1996; Sick, 1997).

Embora não existam estudos que avaliaram o padrão de dispersão desta espécie, o seu comportamento particular e suas características morfológicas distintas sugerem ser uma espécie relativamente sedentária. A história de vida de extremo sedentarismo de muitas aves tropicais, especialmente espécies de sub-bosque, torna-as propensas à diferenciação e adaptação local (Stotz *et al.*, 1996; Bates *et al.*, 1999; Bates, 2000).

Pessoa (2001) estudando a variação geográfica de *C. melanops*, baseando-se na descrição da variação geográfica de caracteres morfológicos de espécimes taxidermizados em coleções de museus, demonstrou que esta espécie, anteriormente descrita como um complexo de três subespécies por Pinto (1978), é, na verdade, composta por duas espécies distintas: *Conopophaga nigrifrons*, do Estado da Paraíba ao de Alagoas, e *Conopophaga melanops*, do Estado de Sergipe ao de Santa Catarina, sendo estas separadas pelo Rio São Francisco. Além desta conclusão, o autor mencionou que embora *C. melanops* seja uma espécie de baixa capacidade de dispersão, tal característica biológica não foi suficiente para criar unidades evolutivas distintas em uma larga extensão (do Estado de Sergipe ao de Santa Catarina).

Bates *et al.* (1999) e Bates (2000) estudando diferenciação genética de algumas espécies de pássaros supostamente sedentários da Amazônia apontam que a atual classificação taxonômica (baseada principalmente nos conceitos de espécie) pode estar subestimando a diversidade de muitas taxa desta floresta neotropical. Considerando esta conclusão importante, seria de particular interesse, principalmente em termos conservacionistas, analisar a diferenciação genética infra-específica de *C. melanops*, e também de outras espécies da Mata Atlântica, a fim de verificar se estamos também

subestimando a biodiversidade desta floresta pela classificação taxonômica atual, como já pressuposto por Bates *et al.* (1999) para a Floresta Amazônica.

1.5. Análise da estrutura genética de populações através de marcadores RAPD

Entre os marcadores moleculares atualmente empregados em análises genéticas, destaca-se o DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD: *randomly amplified polymorphic DNA*) através da reação da polimerase em cadeia (PCR: *polymerase chain reaction*) (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Desde a sua introdução em 1990, a técnica molecular RAPD-PCR tem sido amplamente aplicada em estudos ecológicos, comportamentais, populacionais e/ou conservacionistas de inúmeros taxa. A título de ilustração, menciona-se estudos sobre a estrutura e dinâmica populacional de plantas (*e.g.* Palacios & Gonzales-Candelas, 1997; Schierenbeck *et al.*, 1997; Kirsten *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1999; Lacerda *et al.*, 2001; Zawko *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Zucchi, 2002; Torimaru *et al.*, 2003) e de vertebrados (*e.g.* Dinesh *et al.*, 1993; Kimberling *et al.*, 1996; Nusser *et al.*, 1996; Haig *et al.*, 1997; Callejas & Ochando, 1998; Chapman *et al.*, 1999; Mockford *et al.*, 1999; Paterson & Snyder, 1999; Zwartjes, 1999; Loughheed *et al.*, 2000; Borowsky & Vidthayanon, 2001; Bouzat, 2001; Bowland *et al.*, 2001; Vucetich *et al.*, 2001; Wang & Trost, 2001; Zwartjes, 2001; Hatanaka & Galetti Jr., 2003; Zeisset & Beebee, 2003).

A opção pela utilização da RAPD-PCR deve-se às características inerentes à metodologia, destacando a independência de grandes quantidades de DNA genômico para as reações de amplificação e, principalmente, a não demanda de um conhecimento prévio do genoma estudado (Williams *et al.*, 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Paterson & Snyder, 1999; Lacerda *et al.*, 2001).

A base genética do RAPD está na detecção de polimorfismos no DNA através da amplificação, via técnica de PCR, de fragmentos anônimos em vários locais do genoma, utilizando-se um único oligonucleotídeo iniciador (*primer*) de aproximadamente 10 bases e de seqüência arbitrária. A amplificação de um fragmento do genoma pela RAPD-PCR ocorrerá somente quando duas seqüências de DNA complementares ao iniciador estiverem suficientemente adjacentes (distâncias menores que 4000 pares de bases) e em direções opostas. A técnica RAPD-PCR gera fragmentos anônimos de diferentes tamanhos que são separados por eletroforese e visualizados como bandas em géis. O registro de dados é baseado na forma de presença e ausência de bandas amplificadas para cada indivíduo. Assume-se que as bandas que migram para a mesma posição no gel correspondem a um mesmo fragmento do genoma, e que bandas em posições diferentes correspondem a fragmentos amplificados diferentes e independentes. Considerando organismos diplóides, o fenótipo “presença de banda” pode corresponder à amplificação do fragmento em ambas ou em apenas uma das fitas de DNA homólogas do genoma, expressando com isso o comportamento “dominante” dos marcadores de RAPD, ou seja, os indivíduos heterozigotos não são discriminados dos homozigotos. O polimorfismo de bandas obtido pode ter sido originado por mutações no sítio de ligação do iniciador, causando a não complementaridade e a não amplificação de um determinado fragmento em diferentes indivíduos. Outras fontes de polimorfismo podem ser deleções de sítios de iniciação ou inserções que afastem os sítios complementares a distâncias maiores do que a enzima *DNA polimerase* pode percorrer. Desta maneira, o fenótipo “ausência de banda” corresponde, portanto, à não amplificação do fragmento por um dos motivos acima descritos (Williams *et al.*, 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Análises genéticas baseadas em RAPD são muitas vezes criticadas por apresentarem alguns vieses críticos, principalmente devido ao baixo conteúdo de informação genética por fragmento amplificado, o que limita o uso de estimativa de parâmetros genéticos (Black, 1993; Lynch & Milligan, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Ryman *et al.*, 1999). No entanto, recentes metodologias estatísticas em análises genéticas de RAPDs têm proposto métodos que revertem resultados tendenciosos (Excoffier *et al.*, 1992; Stewart & Excoffier, 1996; Miller, 1997). Uma segunda grande desvantagem é que a aplicação deste método requer uma padronização metodológica e prova de repetibilidade dos resultados (Black, 1993; Lynch & Milligan, 1994).

2. OBJETIVOS

Este estudo é parte de uma iniciativa que pretende analisar a distribuição geográfica da variabilidade genética de Passeriformes dentro do maior remanescente da Mata Atlântica, visando contribuir com informações teóricas sobre a genética das populações de aves das florestas Neotropicais, bem como subsidiar planos práticos de manejo e recuperação das espécies dentro deste ecossistema criticamente ameaçado.

Os objetivos específicos desta dissertação foram: verificar a existência de diferenciação genética entre três populações de *C. melanops* dentro do remanescente da Mata Atlântica localizado na Serra do Mar e adjacentes, utilizando a técnica molecular RAPD-PCR, e interpretar os padrões de variação genética em um contexto geográfico de escala fina na Mata Atlântica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

A área de estudo foi o remanescente de Mata Atlântica localizado na Serra do Mar e adjacentes. Dentro desta área, três localidades geográficas foram escolhidas como os locais de amostragem: 23°20'10'' S / 44°50'15'' W (Parque Estadual da Serra do Mar - núcleo Picinguaba), 23°35'38'' S / 45°23'03'' W (Parque Estadual da Serra do Mar - núcleo Caraguatatuba) e 24°23'12'' S / 47°01'02'' W (Estação Ecológica Juréia-Itatins, base Arpoador), todas localizadas no Estado de São Paulo, Brasil (Figura 1). As localidades estão separadas em uma distância linear aproximada mínima de 70 km (Picinguaba – Caraguatatuba) e máxima de 250 km (Picinguaba – Juréia).

3.2. Número amostral

Cinquenta e um espécimes de *C. melanops* (Figura 2) foram capturados durante os meses de Julho e Outubro de 2002 e de Agosto de 2003. O número de espécimes amostrados em cada uma das três áreas foi $n = 20$ (11 machos e 9 fêmeas) em Picinguaba, $n = 11$ (7 machos e 4 fêmeas) em Caraguatatuba e $n = 20$ (17 machos e 3 fêmeas) na Juréia. Todos os indivíduos foram capturados por redes ornitológicas tipo “neblina” (Figura 3). As redes utilizadas possuíam 12 metros de comprimento, 2,5 metros de altura e com malha de 35 milímetros. As técnicas de captura utilizadas foram: capturas utilizando séries de redes, formando um contínuo de mais de 100 metros, e/ou capturas utilizando uma rede e atração pela técnica *playback* (gravação e reprodução da vocalização da espécie). Os indivíduos capturados foram individualmente marcados com anilhas do “Centro de Pesquisas para Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE) /

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)”, e rapidamente soltos após a coleta das amostras de sangue.

O fato de ter sido capturado um número maior de machos do que de fêmeas foi devido, principalmente, aos machos serem mais facilmente atraídos para as redes (observações pessoais).

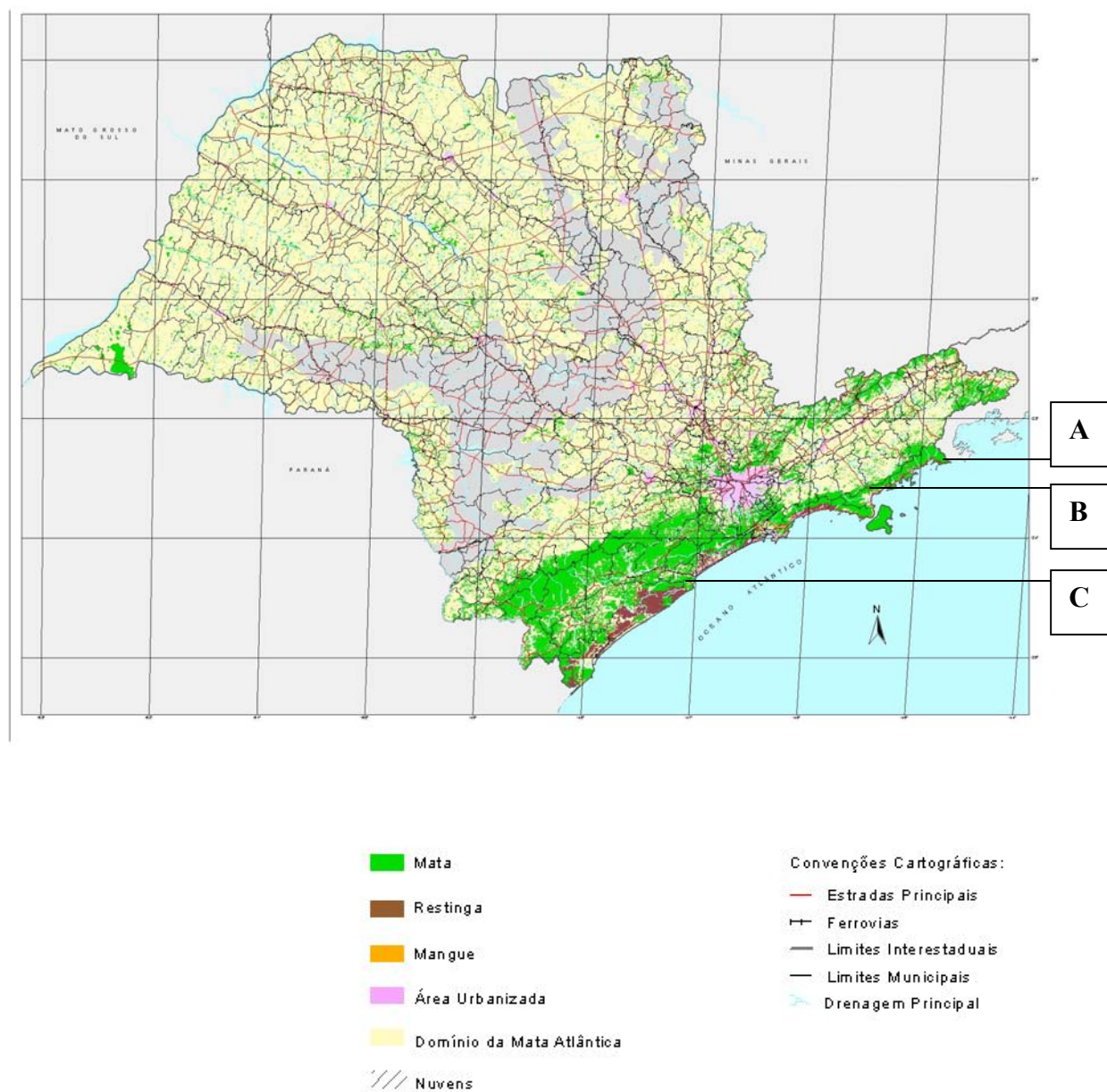


Figura 1: Ilustração das áreas de coleta no mapa dos remanescentes florestais da Mata Atlântica do Estado de São Paulo: **A)** Parque Estadual da Serra do Mar, núcleo Picinguaba; **B)** Parque Estadual da Serra do Mar, núcleo Caraguatatuba; **C)** Estação Ecológica Juréia-Itatins, base Arpoador. Mapa retirado do: *Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, Período 1995-2000* (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2002).



Figura 2: *Conopophaga melanops*: A) Macho, B) Fêmea, C) detalhe da cauda e asas, D) detalhe dos tarsos e dedos.

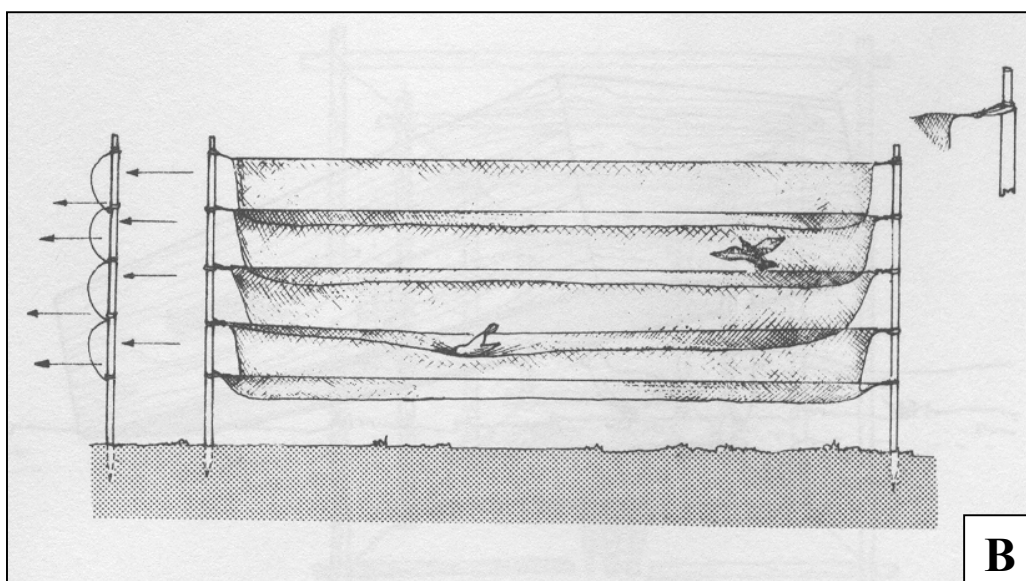


Figura 3: A) Fotografia de um *C. melanops* capturado. B) Rede ornitológica tipo “neblina”, ilustração retirada do: *Manual de Anilhamento de Aves Silvestres* (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1994).

3.3. Coleta de amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas da veia do interior da unha. Antes das amostras de sangue serem coletadas, uma unha de cada espécime foi limpa e desinfetada com etanol (70%) e cortada no topo (Figura 4). Aproximadamente 10 microlitros (μL) de sangue foram coletados e adicionados a um volume de 20 μL de EDTA (0,5 M), sendo imediatamente armazenado em um tubo de 1,5 mililitros (mL), ao qual foi adicionado 1 mL de etanol (100%). Após este procedimento, a unha cortada foi limpa com etanol (70%) e tratada com uma solução hemostática (coagulante) a fim de evitar danos às aves capturadas. As amostras foram estocadas em freezer -22°C até a extração de DNA em laboratório.

3.4. Extração de DNA de tecido sangüíneo

As extrações de DNA seguiram o protocolo descrito por Lahiri & Nurnberger (1991) com algumas modificações, e resume-se nos seguintes passos:

1. Colocar 5 μL de sangue em tubo de 1,5 mL contendo 40 μL de EDTA (0,5 M).
2. Misturar vigorosamente por 30 segundos.
3. Centrifugar por 7 minutos a 13.000 rpm para a separação das células e do plasma.
4. Retirar o sobrenadante e adicionar 500 μL de TTKM1 para a lise da hemáceas, e misturar.
5. Centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante.
6. Lavar o precipitado em 500 μL de TTKM1 e centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm.
7. Descartar o sobrenadante e adicionar 200 μL de TKM2 e 20 μL de SDS (10%), misturando vigorosamente por 3 minutos.

8. Incubar por 15 minutos a 65°C.
9. Adicionar 65 µL de NaCl (5M) e misturar vigorosamente por 3 minutos.
10. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos e recuperar o sobrenadante, passando-o para um outro tubo de 1,5 mL.
11. Adicionar 600 µL de etanol (100%) a temperatura -22°C. Inverter gentilmente o tubo para a precipitação do DNA e centrifugar por 10 minutos (13.000 rpm).
12. Descartar o sobrenadante, adicionar 600 µL de etanol (70%) a temperatura -22°C, e centrifugar por 2 minutos (13.000 rpm).
13. Descartar o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente, deixando secar por cerca de 24 horas.
14. Ressuspender em 30 µL de TE.

Soluções:

TTKM1 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl₂ 10mM; EDTA 2mM; Triton X-100 0,25%).

TKM1 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl₂ 10mM; EDTA 2mM).

TKM2 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl₂ 10mM; EDTA 2mM; NaCl 100mM).

TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8).



Figura 4: Coleta de amostra de sangue: A) Corte do topo de uma unha, B) Retirada de cerca de 10 microlitros de sangue.

3.5. *Quantificação de DNA*

Após as extrações de DNA, as amostras de DNA de todos os indivíduos foram quantificadas utilizando como parâmetro o marcador *Low DNA Mass Lader* (Invitrogen).

O procedimento utilizado foi: 1 µL de cada amostra de DNA foi aplicada em gel agarose (1%) em tampão TBE (1X) (Tris-Base, Ácido Bórico, EDTA), corado em brometo de etídeo (0,5 µg/ml). No mesmo gel foram aplicados 2 µL do marcador *Low DNA Mass Lader* (Invitrogen). Após uma eletroforese (80 volts por 20 minutos), pode-se observar em luz Ultra-Violeta (UV) as bandas referentes ao marcador (200, 120, 80, 20 e 10 ng) e as bandas únicas para cada indivíduo. A comparação da intensidade entre cada banda individual e a intensidade das bandas evidenciadas pelo marcador permitiu a quantificação das amostras de DNA.

Após a quantificação, as amostras foram armazenadas em freezer a -22°C.

3.6. *Reações de RAPD-PCR*

Um conjunto de seis *primers* (RAPD Primer Set from Amersham Biosciences Corp.) foi utilizado para dirigir as reações RAPD-PCR. As seqüências dos seis *primers* estão descritas na Tabela 1. As reações de RAPD-PCR foram realizadas utilizando o “Ready-to-go RAPD Analysis Beads kit” (Amersham Biosciences Corp.), que é uma mistura contendo os seguintes reagentes: enzimas polimerases termo-estáveis (*AmpliTaq DNA polymerase* e *Stoffel fragment*), dNTPs (0,4 mM de cada dNTP), BSA (2,5 µg), tampão [3 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 10 mM Tris, (pH 8,3)], 25 pmol de cada um dos *primers* de RAPD, 50 ng de DNA, e água destilada e autoclavada, em um total de 25 µL por reação. As amplificações foram realizadas em termociclador (*PTC-100 Thermocycler*; MJ Research, Inc.) com a seguinte programação: 1 ciclo a 95 °C por 5 minutos seguido de 45

ciclos de 65 °C por 1 minuto, 36 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Dez microlitros de cada produto de amplificação foram aplicados em géis de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA), com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Os produtos foram eletroforeticamente separados em uma tensão de 90 volts por 180 minutos, e visualizados e fotografados sob luz Ultra-Violeta (UV) utilizando o sistema de captura fotográfica “Kodak EDAS Imaging System”.

Para certificar-se da repetibilidade dos padrões de bandas, uma sub-amostra de cinco indivíduos foi replicada para cada *primer* em procedimentos alternados de PCR. Para testar a presença de possíveis contaminantes por material genético de outras espécies, um tubo contendo todos os reagentes exceto o DNA foi acrescentado a cada procedimento de PCR como um controle negativo.

Tabela 1: Seqüência dos *primers* de RAPD utilizados neste trabalho

<i>Primer</i> (oligonucleotídeo)	Seqüência
<i>Primer 1</i>	5'-d[GGTGCGGGAA]-3'
<i>Primer 2</i>	5'-d[GTTTCGCTCC]-3'
<i>Primer 3</i>	5'-d[GTAGACCCGT]-3'
<i>Primer 4</i>	5'-d[AAGAGCCCGT]-3'
<i>Primer 5</i>	5'-d[AACGCGCAAC]-3'
<i>Primer 6</i>	5'-d[CCCGTCAGCA]-3'

3.7. Análises dos géis de RAPD

Os fragmentos de RAPD amplificados nos procedimentos de PCR e separados por eletroforese em gel foram analisados pela presença (1) ou ausência (0) de cada banda em cada indivíduo. Com isso, um único e específico padrão de RAPD foi determinado para cada indivíduo analisado, e uma matriz de dados binários foi construída incluindo todos os padrões individuais de RAPD.

Para avaliar se o número de bandas utilizado no presente estudo foi adequado para as análises das populações de *C. melanops* acessadas, foi estimado o coeficiente de variação médio (*CV*) associado ao número de bandas através do método de coincidência simples (*simple matching*), utilizando o *software* Dboot, versão 1.1 (Coelho, 2001). Este *software* determina um valor de *CV* para cada conjunto com *n* bandas polimórficas analisadas através da aplicação do método de cálculo de distância genética por *simple matching* através de 10.000 *bootstraps* (método de reamostragem e com reposição aleatória dos dados). Valores de *CV* menores ou iguais a 10% permitirão identificar o número mínimo de fragmentos RAPD necessários para as análises de distâncias genética-populacionais.

3.8. Análises estatísticas

3.8.1. Análise da estruturação genética populacional 1: análises genéticas baseadas na variabilidade dos dados binários, independentes da suposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Análise de Variância Molecular, em inglês *Analysis of Molecular Variance* (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) foi calculada para estimar a estruturação genético-populacional a partir das bandas polimórficas geradas pela RAPD-PCR. Esta análise tem como base a clássica análise de variância e como princípio a subdivisão da variação genética molecular total de uma espécie em diferentes níveis hierárquicos (por exemplo: variação entre populações e entre indivíduos dentro de populações) (Tabela 2). A AMOVA utiliza-se do fato de que a soma dos quadrados dos desvios, que corresponde à base analítica da análise de variância, pode ser escrita na forma de distâncias ao quadrado entre pares de observações. Desta forma, a estimativa da subdivisão hierárquica da variação molecular é feita pela incorporação de todos os valores de distâncias quadradas entre todas as observações (Excoffier, 1992).

Utilizando a matriz de dados binários dos 51 *C. melanops*, foi obtida uma nova matriz de valores de distância entre pares de indivíduos (padrões de RAPD), utilizando a fórmula da distância Euclidiana ao quadrado (Excoffier *et al.*, 1992), no software ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). A distância Euclidiana é equivalente a uma simples contagem do número de diferenças ao quadrado entre dois padrões RAPD individuais (Excoffier, 1992), e pode ser escrita como:

$$\delta^2_{xy} = \sum_{i=1}^s (x_i - y_i)^2$$

onde x e y são dois padrões individuais de RAPD e S corresponde ao número de fragmentos RAPD utilizados.

Neste mesmo software, a matriz de valores de distância Euclidiana entre todos os pares de padrões RAPD individuais foi então submetida a AMOVA, a qual forneceu o valor ϕ_{ST} , análogo ao F_{ST} de Wright (1978), que é uma medida de diferenciação genética entre populações (Slatkin, 1993), ou, em outras palavras, uma medida de subdivisão populacional (Zwartjes, 1999). Um procedimento não paramétrico da AMOVA testou a hipótese de ausência de estruturação genética entre as populações analisadas. Este procedimento é uma simulação da distribuição nula dos valores de ϕ_{ST} e dos componentes da variância através de inúmeras permutações independentes. Cada permutação independente realoca aleatoriamente os indivíduos entre as populações e calcula todas as estatísticas da AMOVA. Os resultados destes testes independentes serão os valores que irão compor a distribuição nula, ou seja, a distribuição dos valores que estão representando ausência de diferenciação genética (Excoffier *et al.*, 1992; Zwartjes, 1999; Schneider *et al.*, 2000). Desta forma, o valor de P extraído da AMOVA representa a

probabilidade de se obter ao acaso valores maiores ou iguais àqueles de ϕ_{ST} e dos componentes “reais” da variância. A rejeição da hipótese de ausência de diferenciação genética ocorre em um nível de significância de $P < 0,05$. Para o presente trabalho foi utilizado 10.000 permutações aleatórias para calcular os valores de ϕ_{ST} e de componentes da variância representantes da distribuição nula.

Tabela 2: Exemplo de um esquema hierárquico da AMOVA em “a” populações analisadas utilizando “N” fragmentos RAPD estudados.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados (SQ)	Variância (s^2)	Estatística ϕ
<i>Entre populações</i>	a-1	SQ _E	$s_E^2 = \text{SQ}_E / a-1$	$\phi_{ST} = s_E^2 / s_{\text{total}}$
<i>Dentro de populações</i>	N-a	SQ _D = SQ _{total} - SQ _E	$s_D^2 = \text{SQ}_D / N-a$	1 - ϕ_{ST}
Total	N-1	SQ _{total}	s_{total}	

O teste não paramétrico para a homogeneidade da variância molecular (HOMOVA) baseado na estatística de Bartlett (1937) foi utilizado para verificar se as populações possuem diferentes quantidades de variação de RAPD. Este teste não segue o modelo hierárquico de subdivisão da variação genética; a estatística de Bartlett (B) identifica desvios das variâncias populacionais em relação à variância total média, sendo, portanto, baseado em medidas absolutas de cada população. O valor de B é formulado em termos da soma dos desvios ao quadrado da análise de variância, e sua significância é testada pelo mesmo procedimento estatístico utilizada na AMOVA (Stewart & Excoffier, 1996). Este teste foi executado no software WINAMOVA 1.55 (Excoffier, 1992).

A matriz binária de presença/ausência de bandas também foi utilizada para calcular o índice de diversidade de Shannon (H_0) (Lewontin, 1972), no software POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1999), com o objetivo de descrever a distribuição da diversidade dos dados de

RAPD entre e dentro das populações analisadas (e.g. Bussel, 1999; Lacerda *et al.*, 2001). O índice de diversidade de dados de RAPD em cada população é calculado como $H_0 = -\sum p_i \log_2 p_i$, onde p_i é a frequência da presença ou ausência da banda de RAPD “i” em uma determinada população. O valor H_{sp} , calculado como $-\sum p_{i'} \log_2 p_{i'}$, representa a diversidade dos dados de RAPD considerando o total de indivíduos analisados conjuntamente, sendo $p_{i'}$ a frequência da presença ou ausência da banda “i” nos 51 indivíduos analisados neste trabalho; e o valor H_{pop} , calculado como $1/n \sum H_0$, é a média das diversidades populacionais (H_0), onde n é o número de populações. Os valores H_{sp} e H_{pop} permitiram o cálculo da proporção da diversidade dos dados de RAPD dentro $H_d = (H_{pop}/H_{sp})$ e entre populações $H_e = [(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}]$ (Bussel, 1999; Lacerda *et al.*, 1999).

A análise da variância molecular (AMOVA), o teste de homogeneidade de variância (HOMOVA) e o índice de Shannon baseiam-se apenas na natureza binária do polimorfismo RAPD (presença e ausência de bandas) e na suposição de que existe o mesmo padrão de acasalamento para todos os indivíduos analisados (Excoffier, 1992; Bussel, 1999).

3.8.2. Análise da estruturação genética populacional 2: análises genéticas baseadas na suposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg

Utilizando a suposição de que as populações analisadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W), foi possível analisar a estruturação genética populacional através de estimativas de frequências alélicas e genóticas a partir da matriz de dados de RAPD. Para isso, cada banda “presente” foi designada ser o genótipo homocigoto dominante ou o heterocigoto, e quando “ausente” o alternado genótipo recessivo, assumindo assim, a existência de apenas dois alelos por loco. Considerando que os genótipos heterocigotos não podem ser discriminados dos homocigotos dominantes, a estimativa das frequências

dos alelos foi feita em cima das frequências dos genótipos recessivos. Então, para cada loco, a frequência do alelo recessivo foi obtida simplesmente pela raiz quadrada da frequência do genótipo homocigoto recessivo (caráter “ausente”), e desta estimativa foi determinada a frequência do genótipo homocigoto dominante e a do heterocigoto, assumindo para isso as proporções do equilíbrio de H-W (Weir, 1990; Miller, 1997).

Utilizando estas estimativas de frequências gênicas e genotípicas, foi calculada a distância genética (D) proposta por Nei (1972), a qual expressa a diferença genética entre duas populações, onde D é uma medida de diversidade de genes entre populações escrita como uma função da frequência genotípica (Hoelzel & Dover, 1991). Em termos matemáticos, D é o valor negativo do logaritmo natural da razão da probabilidade média (sobre todos os locos) de dois genes escolhidos ao acaso, um de cada população, serem idênticos, sobre a probabilidade média que dois genes escolhidos ao acaso de uma única população serem idênticos (Hoelzel & Dover, 1991). Os valores de D variam de zero a um, e indicam, respectivamente, total identidade e total diferenciação genética entre duas populações.

O método de agrupamento aos pares com médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) foi utilizado para a construção de um dendrograma a partir da distância genética (D) de Nei. A estabilidade do agrupamento foi testada através do teste de confiança de *bootstrap* (método de reamostragem e com reposição aleatória dos dados). Todos procedimentos acima descritos foram efetuados no *software* TFPGA (Miller, 1997).

Neste mesmo programa computacional, foi utilizado o método de Weir & Cockerham (1984) para calcular o valor de theta (θ), análogo ao índice de F_{st} de Wright (1978), que indica diferenças genéticas em níveis de hierarquia populacional baseando-se na variância

das freqüências alélicas. Valores do intervalo de confiança (95%) de θ foram obtidas através de um procedimento de *bootstrap*, utilizando 10.000 procedimentos permutacionais sobre todos os locos (bandas).

É importante ressaltar que as estimativas de freqüências dos alelos para o conjunto dos dados de RAPD foram calculadas supondo equilíbrio de H-W, portanto, os valores D e θ foram calculados supondo que as populações analisadas eram infinitamente grandes e estavam livres de mutação, migrações, seleção e de acasalamentos preferenciais.

3.8.3. Correlação entre distâncias genéticas e geográficas

A fim de analisar os padrões de variação genética em um contexto geográfico, foi obtida a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as matrizes de distância geográfica (km) e as distâncias genéticas (ϕ_{ST}), entre as populações (*e.g.* Zucchi, 2002). O coeficiente r é dado pela seguinte fórmula:

$$r = \frac{\sum_{i,j=1}^n x_{ij} y_{ij}}{\sqrt{\sum_{i,j=1}^n x_{ij}^2 \sum_{i,j=1}^n y_{ij}^2}}$$

onde x_{ij} e y_{ij} representam, respectivamente, distâncias genéticas (valores da matriz X) e geográficas (valores da matriz Y), n a dimensão das matrizes e i e j , respectivamente, linha e coluna.

Para testar a significância da correspondência entre estas duas matrizes obtidas independentemente foi utilizada a estatística Z de Mantel (1967), no software TFPGA (Miller, 1997). O valor de Z é parte do numerador do coeficiente de correlação linear de

Pearson (r), sendo, portanto, um valor potencial a ser utilizado para testar a significância de (r). O valor de Z é dado pela seguinte fórmula:

$$Z = \sum_{i,j=1}^n X_{ij} Y_{ij}$$

onde X_{ij} e Y_{ij} representam, respectivamente, cada um dos elementos das matrizes X e Y , n é a dimensão das matrizes e i e j , respectivamente, linha e coluna das matrizes.

A significância de Z é estabelecida através da construção de uma distribuição nula, aleatorizando os elementos das matrizes e recalculando os valores de Z inúmeras vezes. Assim, se os valores de Z gerados pela aleatorização forem menores que o valor de Z “real”, há uma grande probabilidade do Z “real” e o coeficiente de correlação linear (r) não terem sido gerados pelo acaso. Neste trabalho, um total de 9999 permutações aleatórias foi utilizado para testar a significância da correlação matricial (r).

4. RESULTADOS

Os seis *primers* de RAPD utilizados nas amplificações de PCR produziram um total de 87 bandas distintas com o potencial de serem analisadas. Deste total, 63 bandas polimórficas foram identificadas e cada uma destas foram consideradas como um caráter “presente” (1) ou “ausente” (0) em cada um dos 51 indivíduos analisados, gerando 51 padrões de RAPDs individuais (ANEXOS). Os tamanhos das 63 bandas escolhidas para este estudo variaram de 300 a 1500 pares de bases (pb). Não foram encontradas bandas consideradas exclusivas a uma única população, o que indica que a divergência genética observada entre as populações foi devida apenas a diferenças nas frequências de bandas.

Os testes de repetibilidade dos resultados revelaram que as 63 bandas polimórficas escolhidas para este estudo foram perfeitamente repetidas nas réplicas (Figura 5), como também, mostraram que não houve contaminação das reações de RAPD-PCR por material nuclear de outras espécies, uma vez que todas as reações de PCR utilizadas como controle negativo não amplificaram padrões de bandas. Além disso, foi verificado que apenas 46 bandas seriam necessárias para a estabilidade das análises de distância genética (coeficiente de variação médio, $CV = 10\%$), indicando que 63 bandas foram mais que suficientes para a análise dos dados de RAPD deste estudo (Figura 6). Todos estes resultados permitiram a incorporação dos 51 fenótipos de RAPD individuais nas análises estatísticas.

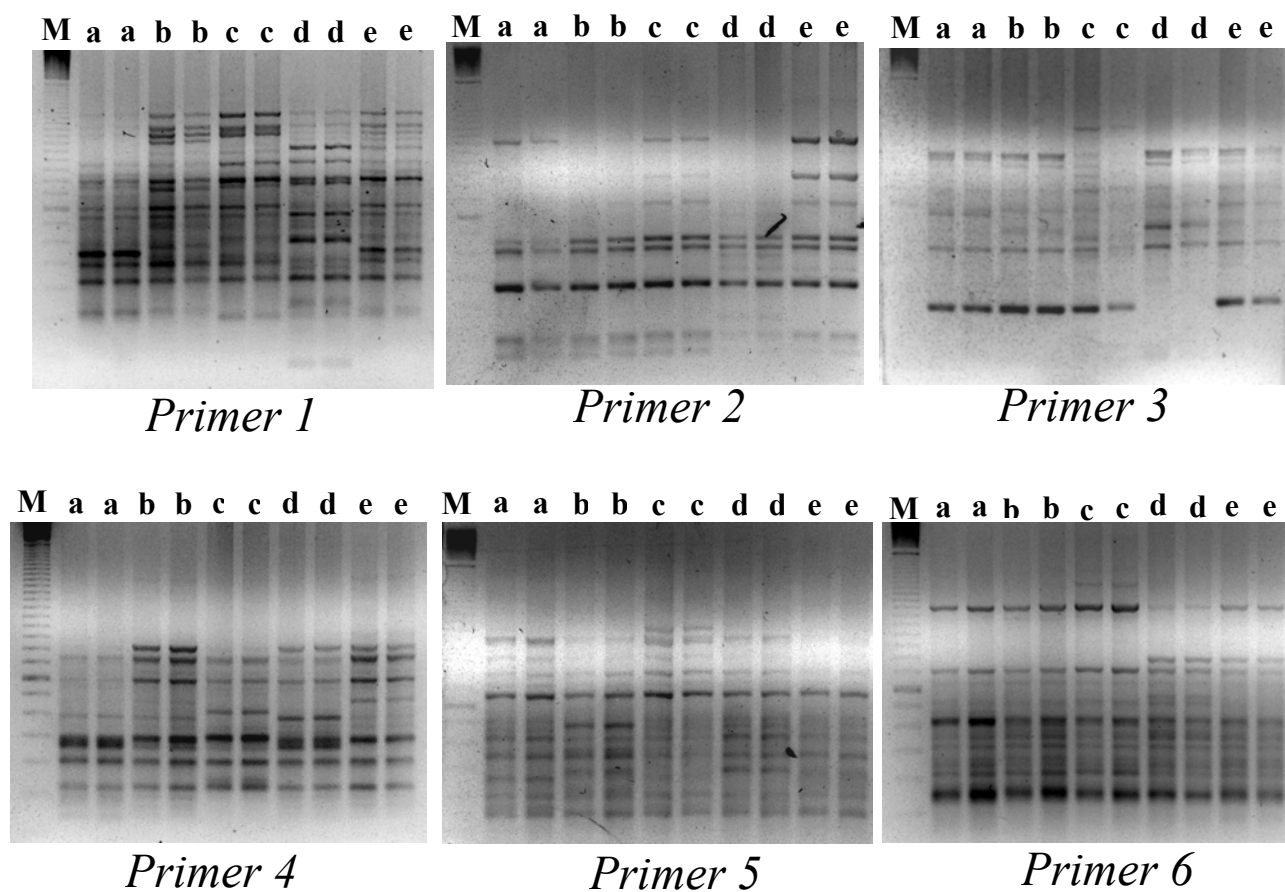


Figura 5: Géis de agarose demonstrando o padrão de repetibilidade dos fragmentos de DNA, obtidos a partir de cinco amostras (a, b, c, d, e) de *C. melanops* amplificadas com os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em duas sucessivas reações de PCR. ‘M’ representa o marcador molecular 100 pb.

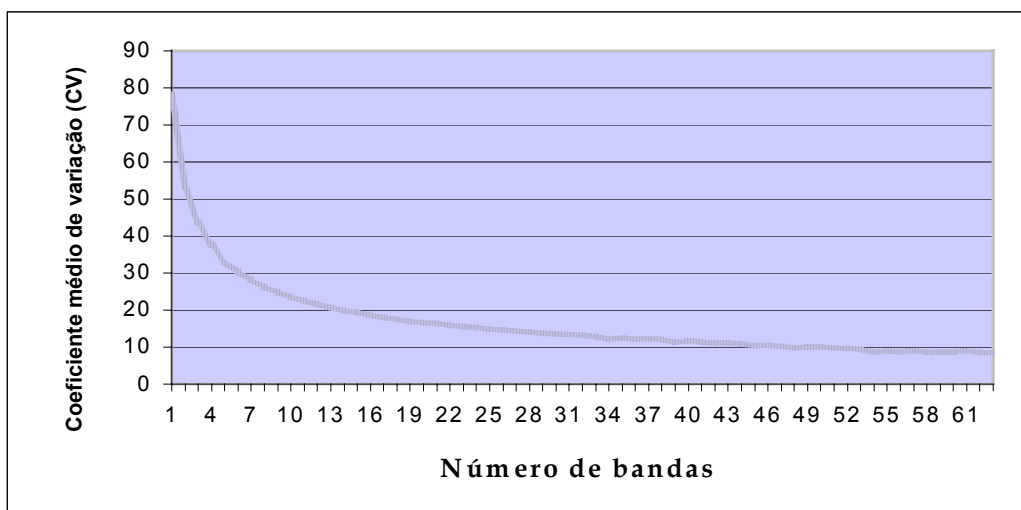


Figura 6: Relação entre o coeficiente de variação médio (CV) e o número de bandas. Os valores de *CV* foram derivados do método de coincidência simples (*simple matching*) após 10.000 procedimentos de *bootstrap*.

A análise da variância molecular (AMOVA) dos 51 fenótipos de RAPD distribuídos entre as populações analisadas (Caraguatatuba, Picinguaba, Juréia) revelou uma significativa diferenciação genética entre as populações analisadas, com um nível de diferenciação considerado moderado ($\phi_{ST} = 0,1315$; $P < 0,00001$). Os resultados de todas as estatísticas da AMOVA estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Análise da variância molecular (AMOVA) de 51 indivíduos de *C. melanops* nas três populações (Picinguaba, Caraguatatuba, Juréia). O valor de P foi calculado utilizando a comparação entre os valores de ϕ_{ST} e da variância obtidos (“reais”) e os mesmos valores computados após 10.000 procedimentos de permutação e realocação dos dados originais entre as populações. Valores de $P < 0,05$ rejeitam a hipótese nula de ausência de diferenciação genética.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Estatística ϕ</i>	<i>P</i>
Entre populações	2	68,375	$\phi_{ST} = 0,13149$	<0,00001
Dentro de populações	48	469,723	$1 - \phi_{ST} = 0,86851$	<0,00001
Total	50	538,098	-----	-----

Os valores de ϕ_{ST} da análise da variação molecular (AMOVA) entre pares de populações revelaram diferenciação genética significativa entre todos os pares de populações (Tabela 4). O valor de ϕ_{ST} (AMOVA) referente ao par Caraguatatuba-Juréia, bem como o referente ao par Picinguaba-Juréia, indicaram um nível de diferenciação considerado moderado alto. Já o valor de ϕ_{ST} entre as populações de Picinguaba e Caraguatatuba indicou um nível de diferenciação considerado baixo, embora comprovado ser significativo ($p < 0,02$).

Tabela 4: AMOVA entre pares de populações. Valores acima da diagonal representam a distância geográfica em quilômetros entre as três populações de *C. melanops* analisados. Abaixo da diagonal estão os valores de ϕ_{ST} entre os pares de populações e entre parênteses estão os respectivos valores de significância. Valores de $P < 0,05$ rejeitam a hipótese nula de ausência de diferenciação genética, após um teste de confiança de 10.000 simulações de reamostragem e realocação ao acaso dos dados.

	Picinguaba	Caraguatatuba	Juréia
Picinguaba	—	70	250
Caraguatatuba	0,03433 ($P < 0,02$)	—	180
Juréia	0,163502 ($P < 0,00001$)	0,16779 ($P < 0,00001$)	—

O teste não paramétrico de homogeneidade de variância molecular dos resultados de RAPD (HOMOVA) revelou que as populações apresentam diferentes quantidades de variação de RAPD (estatística de Bartlett: $B = 0,32337$; $P < 0,0005$).

As estimativas de diversidade genética no índice de Shannon (H_0) revelaram a subdivisão da diversidade de RAPD nas seguintes proporções: 10,236% da diversidade está entre as populações (H_e) e 89,77% dentro das populações (H_d). Os valores de H_{pop} e H_{sp} obtidos foram, respectivamente, 0,462966 ($\pm 0,23611$) e 0,5157 ($\pm 0,1812$).

A estimativa de diferenciação genética inter-populacional θ , supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg e considerando estimativas de frequências alélicas para todos os locos (bandas) analisados em conjunto, revelou um nível de diferenciação moderado seguindo a interpretação de Wright (1978). O valor de θ obtido foi de 0,1377, e seus respectivos intervalos de confiança com 95% de probabilidade foram 0,1911 (superior) e 0,0904 (inferior).

Os valores de distância genética entre pares de populações seguindo as estimativas de Nei (D) foram: 0,0396 para o par Picinguaba-Caraguatatuba, 0,1014 para o par Picinguaba-Juréia, e 0,1235 para o par Caraguatatuba-Juréia. A análise de agrupamento UPGMA utilizando estas estimativas de distâncias genéticas revelou uma alta

consistência na separação da população da Juréia do conjunto Picinguaba/Caraguatatuba, com 100% do total dos locos suportando a separação, e uma baixa consistência na separação do par Picinguaba – Caraguatatuba, com 36,6% do total de locos suportando a separação. O teste de confiança *bootstrap* do agrupamento UPGMA revelou uma alta probabilidade dos ramos do agrupamento serem verdadeiros (Figura 6).

A correlação matricial entre distâncias genéticas e geográficas foi elevada e positiva ($r = 0,9155$). Entretanto, o teste de Mantel ($Z = 73,86$), utilizando 9999 procedimentos permutacionais, indicou que a probabilidade P associada à significância de r foi alta ($P = 0,1616$), demonstrando que há uma alta probabilidade do valor de r ter sido gerado ao acaso (Figura 7).

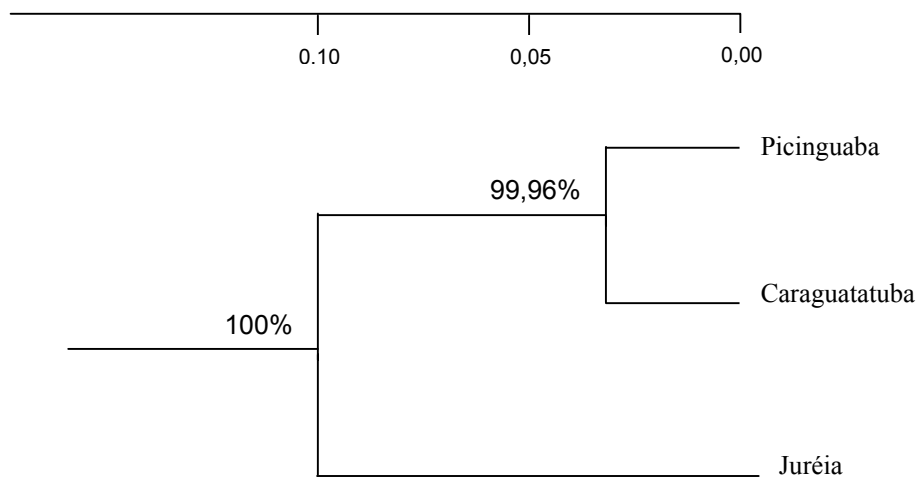


Figura 6: Padrão da diferenciação genética entre três populações de *C. melanops*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Nei (1972). As porcentagens indicam a probabilidade dos ramos não terem sido gerados pelo acaso, obtidas através do teste de confiança *bootstrap*.

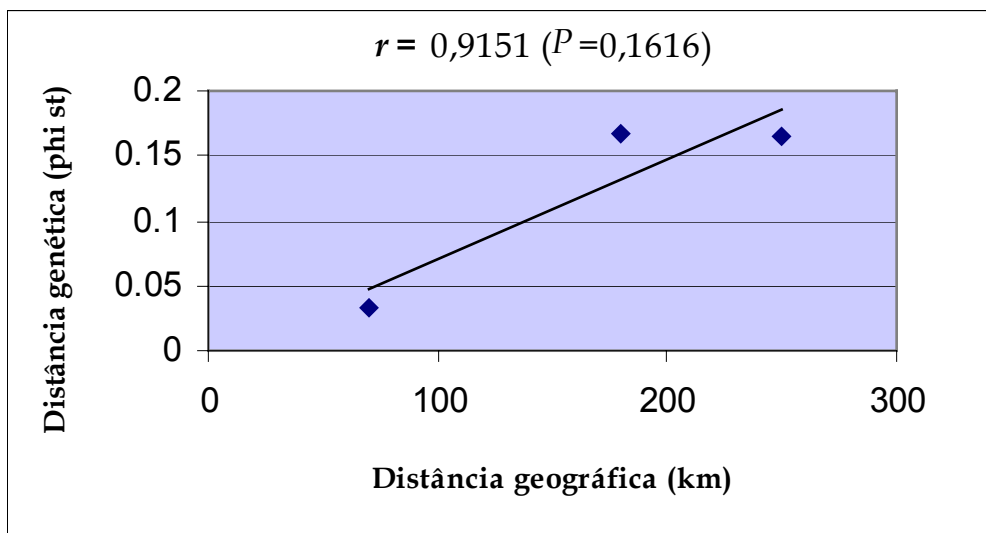


Figura 7: Representação gráfica da correlação (r) entre distâncias geográficas (km) e genéticas ($\text{phist} = \phi_{ST}$). A significância de r é dada pela probabilidade P .

5. DISCUSSÃO

Análise da estrutura genética de C. melanops utilizando marcadores RAPD

A técnica molecular RAPD-PCR revelou ser um meio adequado para analisar a variação genética dentro e entre as três populações de *C. melanops* analisadas. As amplificações de DNA pela RAPD-PCR resultaram em um número suficiente de fragmentos polimórficos para as análises de estruturação genética. Além disso, a aplicação desta técnica molecular possibilitou estudar o material genético com um mínimo de estresse e danos às aves em estudo, uma vez que ínfimas amostras de tecido coletadas forneceram quantidades de DNA suficientes para as reações de amplificação.

Marcadores neutros, multialélicos, com expressão co-dominante e que apresentam altas taxas de mutação são considerados ideais para estudos de genética de populações. Entretanto, exigem grandes investimentos e demandam tempo para o desenvolvimento prévio de *primers* específicos para os locos de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Miyaki & Ederhard, 2002), limitando-se, portanto, a estudos de médio e longo prazo, ou de espécies que já possuem *primers* descritos para tais sequências de interesse. É importante salientar que embora os marcadores RAPD não representem a melhor ferramenta para definir e diferenciar populações, estes abriram uma nova perspectiva para a ampliação do conhecimento genético de populações naturais, pois a maioria das espécies ainda não foi analisada geneticamente, como é o caso de *C. melanops*.

Interpretação das análises estatísticas

Análises clássicas de genética populacional baseiam-se, principalmente, em frequência alélicas, utilizando a suposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Stewart &

Excoffier, 1996). Entretanto, informações alélicas não podem ser diretamente extraídas das análises de RAPDs e, por conta disso, a suposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg pode não ser apropriada para analisar resultados de tais marcadores. Diante deste fato, além das análises genéticas clássicas baseadas em estimativas de frequências alélicas, foi utilizada também a análise da variância molecular (AMOVA), o teste de homogeneidade de variância (HOMOVA) e o índice de Shannon, os quais não dependem de tais suposições e, por isso, são consideradas análises mais adequadas para dados de RAPD (*e.g.* Stewart & Excoffier, 1996; Zwartjes, 1999; Lacerda *et al.*, 2001).

O teste de significância da AMOVA e o HOMOVA comprovaram que em um contínuo de 250 km as três populações provaram ser geneticamente diferentes entre si. O índice de Shannon, a AMOVA e a estatística theta (θ) permitiram a subdivisão hierárquica da variação molecular total e estimaram que em torno de 10% da variação genética total está entre as populações. Utilizando a analogia com os valores da estatística F de Wright (1978), as porcentagens de variação inter-populacional obtidas nestas análises hierárquicas podem ser interpretadas como sendo um nível de diferenciação considerado moderado entre as populações. Embora em cada uma destas três análises seja utilizado um método específico para o cálculo da distribuição hierárquica da variação genética total, foi observada uma forte congruência entre os resultados obtidos com estas estimativas. Este resultado ilustra que apesar das limitações em utilizar os dados de RAPD em análises genéticas clássicas, devido à natureza dominante deste marcador, foi encontrada uma consistência entre ϕ_{ST} , H_e (estimados pelo conjunto de dados binários) e θ (assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Além da comprovação da existência de diferenciação genética entre as três populações quando analisadas conjuntamente, é importante ressaltar que a AMOVA

também identificou que entre todos os pares de populações analisados separadamente existe diferenciação genética significativa. Mesmo entre o par de populações Caraguatatuba e Picinguaba, que apresentou um nível de diferenciação considerado baixo ($\phi_{ST} = 0,03433$) segundo a estatística F de Wright (1978), foi extraído da AMOVA a existência de diferenciação genética significativa entre estas.

Os resultados da distância genética de Nei (D) não puderam ser comparados numericamente com todas as outras estimativas uma vez que não expressam diferenciação genética entre duas populações de maneira hierárquica. Os valores de D indicaram que as populações Picinguaba e Caraguatatuba são relativamente geneticamente semelhantes ($D = 0,0396$) e que a população da Juréia está mais diferenciada das demais. O dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método UPGMA apresentou esta mesma tendência, entretanto é importante discutir que apesar da subdivisão entre Picinguaba e Caraguatatuba não ser totalmente consistente (pois apenas uma porcentagem do total de locos suportou esta separação), a análise de *bootstrap* comprovou que esta subdivisão não foi gerada ao acaso, ou seja, existe uma diferenciação significativa entre estas populações. A estruturação das populações encontrada nas análises baseada na distância genética de Nei está congruente com interpretação dos resultados extraídos das análises hierárquicas de variação genética.

Estrutura genética de C. melanops em escala fina da Mata Atlântica

A meta principal deste estudo foi analisar a estrutura genética de *C. melanops* em um contexto natural de escala fina da Mata Atlântica. Para a interpretação biológica dos resultados obtidos foi necessário admitir os seguintes pressupostos: (1) a variação genética existente no conjunto de indivíduos analisados pode ser subdividida

hierarquicamente em duas partes componentes, variação genética dentro e entre populações, e esta abordagem permite a análise espacial da variação genética total (Weir, 1990; Excoffier *et al.*, 1992; Via, 1994; Meffe & Carroll, 1994); e (2) a organização espacial da variação genética analisada representa necessariamente um produto do conjunto de eventos demográficos, genéticos e ambientais que ocorreram durante todo o passado evolutivo até o presente (Via, 1994).

Diante destes pressupostos, o nível de estruturação encontrado entre as populações analisadas está, a princípio, em concordância com o que seria esperado de uma espécie com as características comportamentais e morfológicas presentes em *C. melanops* (ver Alves & Duarte, 1996; Sick, 1997, Alves *et al.*, 2002), as quais sugerem sedentarismo e conseqüente baixo fluxo gênico entre populações. Estudos como o de captura-marcação-recaptura poderiam fornecer distâncias médias de dispersão, como também, poderiam evidenciar as condições ecológicas favoráveis para a dispersão (Slatkin, 1994); tais dados seriam importantes para corroborar com a suposição de baixo fluxo gênico entre as populações de *C. melanops*.

Quando analisamos espacialmente a distribuição da variação genética, observamos que a correlação matricial entre distâncias genéticas e geográficas (entre as populações) foi elevada e positiva ($r = 0,9155$), entretanto não houve uma total correspondência significativa entre estas matrizes ($P = 0,1616$). Em outras palavras, não foi possível confirmar se o principal fator que explicaria a estruturação encontrada seria a limitação da dispersão em função da distância geográfica. Esta conclusão tornou-se evidente quando foram comparados os valores referentes ao nível de diferenciação genética (ϕ_{ST}) e distância geográfica (km) entre o par populacional Caraguatatuba-Juréia ($\phi_{ST} = 0.16779$; 180 km) e o par Picinguaba-Juréia ($\phi_{ST} = 0.16350$; 250 km), em que se nota claramente

que não há uma íntima correlação entre distância genética e distância geográfica. Estes resultados sugerem que o isolamento geográfico pela distância não poderia ser o único responsável pela estruturação apresentada.

Mayr (1977), estudando vários tipos de barreiras geográficas, observou que montanhas eram barreiras efetivas para muitas espécies que viviam preferivelmente em regiões baixas, e que os vales representavam muitas vezes barreiras para as espécies de montanhas. *C. melanops* pode ser encontrado em altitudes de zero a um máximo de 800 metros (Stotz *et al.*, 1996), sendo muito comum em matas de baixada litorânea da encosta da Serra do Mar (Sick, 1997). Dentro do transecto onde foi desenvolvido este estudo, observa-se uma descontinuidade altitudinal entre zero a mais de 1400 m, caracterizada por conjuntos de serras, montanhas isoladas, rios e planícies costeiras (Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1964; Cruz, 1974; Almeida & Carneiro, 1998). Tais informações evidenciam que barreiras físicas poderiam também isolar incompletamente as populações amostradas.

Comparação com outros taxa Neotropicais

Caparella (1987) *apud*. Bates (2000) demonstrou que 85 km de uma área contínua de floresta Amazônica foi uma distância suficiente para encontrar populações geneticamente isoladas de espécies de pássaros florestais. Os níveis de diferenciação (F_{ST}) a partir de dados alozímicos apresentados para quatro espécies analisadas foram considerados significativos variando de 0,01 a 0,098. Neste mesmo trabalho, o autor também demonstrou a existência de diferenciação genética entre populações destas espécies quando separadas por rios largos da bacia amazônica. A partir destes resultados, concluiu

que tanto o sedentarismo quanto eventos vicariantes (largura de rios) seriam responsáveis pelo alto nível de estruturação encontrada em algumas espécies de pássaros amazônicos.

Bates (2000) estudando cinco espécies de Passeriformes de sub-bosque da Floresta Amazônica através de marcadores alozímicos constatou níveis significativos de diferenciação genética entre populações em um contínuo florestal de 200 km, com valores de F_{ST} variando de 0,012 a 0,084. Segundo este autor, os seus resultados mostraram ser consistentes com os outros estudos sobre diferenciação genética de populações de aves de sub-bosque da região neotropical e podem ser explicados principalmente pelo alto grau de sedentarismo destas espécies florestais.

Recentemente, McDonald (2003) investigando o sistema de acasalamento de um passeriforme (*Chiroxiphia linearis*) na América Central, através de marcadores moleculares microssatélites, comprovou que 115 km de um contínuo de floresta não foi uma distância suficiente para diferenciar geneticamente as duas populações analisadas ($F_{ST} \approx R_{ST} = 0.02$). Ao contrário das espécies de pássaros que habitam o sub-bosque das florestas Amazônicas, esta espécie neotropical não é sedentária, machos e fêmeas parecem poder deslocar-se amplas distâncias (McDonald, 2003).

Como já foi revelado, os resultados referentes à análise da variação genética de *C. melanops* em escala fina da Mata Atlântica, com base em dados de RAPD, apresentaram diferenciação genética significativa em um contínuo de 250 km, com um nível de diferenciação considerado moderado ($F_{ST} \approx \phi_{ST} = 0,1315$; $P < 0,00001$). Quando analisados em pares de populações, também foi observada diferenciação genética significativa em populações distanciadas a 180 km, como também a 70 km. Os valores de diferenciação genética (ϕ_{ST} , H_e , θ , e D) obtidos no presente estudo não puderam ser numericamente comparados com os respectivos valores encontrados nos outros estudos em aves

neotropicais devido à natureza dos marcadores moleculares utilizados (o presente trabalho utilizou marcadores dominantes, enquanto que os demais co-dominantes). Assim, utilizando apenas uma comparação qualitativa, os resultados e discussão até agora apresentados para as populações de *C. melanops* parecem concordar com os resultados encontrados em pássaros que vivem preferencialmente no sub-bosque da Floresta Amazônica. Desta forma, conclui-se a partir dos presentes resultados que a diferenciação genética populacional encontrada em *C. melanops* em escala fina da Mata Atlântica poderia ser explicada primariamente pela suposta sedentariedade da espécie e por barreiras físicas (descontinuidade altitudinal).

Embora os resultados baseados em RAPD não possuam base molecular para fazer inferências sobre o passado evolutivo da espécie em estudo, é importante discutir algumas informações pertinentes à estruturação genética relacionada ao padrão de distribuição de *C. melanops* analisado no espaço e tempo evolutivo. De acordo com Ab'Sáber (1977) e Viadana (2002), entre 13.000 a 18.000 anos antes do presente (Pleistoceno terminal) mudanças paleoclimáticas promoveram, entre muitas outras modificações, a redução e perda da continuidade das florestas tropicais ao longo da Serra do Mar e áreas adjacentes, no sentido da base para o topo, o que resultou na formação de refúgios isolados da biota. Utilizando o mapa de aproximação do cenário dos domínios florestais no Pleistoceno terminal para o Estado de São Paulo (Viadana, 2002), observa-se que as regiões que atualmente correspondem aos núcleos Caraguatatuba e Picinguaba do Parque Estadual da Serra do Mar permaneceram isoladas da região que corresponde atualmente à Estação Ecológica Juréia-Itatins. Este isolamento persistiu até a retomada do clima úmido e quente no período Holoceno (período correspondente aos últimos 11.000 anos), onde houve a expansão das florestas tropicais a partir dos refúgios, alcançando o quadro

vegetacional encontrado pelos colonizadores no século XVI (mapa da cobertura primitiva do Estado de São Paulo – Troppmair, 1969). Seguindo esta mesma linha interpretativa, poderia ser assumido que se populações de *C. melanops* estivessem presentes no período entre 13.000 a 18.000 anos atrás, elas provavelmente poderiam ter passado por um período de intenso isolamento, que levaria a uma grande heterogeneidade entre as populações, principalmente devido aos efeitos somados da seleção e mutações aleatórias. Com a retomada da tropicalidade no Holoceno, *C. melanops* poderia ter expandido de forma descontínua a partir dos refúgios florestais do final do Pleistoceno. A partir destas considerações, esta análise poderia ser mais um fator adicional que explicaria a estruturação genética de *C. melanops* nos dias atuais.

Futuros estudos utilizando *primers* que reconheçam regiões do DNA evolutivamente conservadas poderão contribuir para a compreensão da distribuição atual da variação genética desta espécie.

Além do que foi exposto, é importante destacar que embora as três áreas acessadas estejam dentro do maior remanescente de Mata Atlântica, é notável no Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2002) que entre Caraguatatuba e Juréia existem áreas com indícios de desmatamento, especificamente na região de Cubatão (SP) e no entorno da Estação Ecológica Juréia-Itatins, que podem estar contribuindo para a não manutenção de um contínuo entre estas regiões (Caraguatatuba – Juréia), o que, conseqüentemente, pode estar obstruindo atualmente o fluxo gênico das populações naturais entre estas áreas. Então, parte do nível de diferenciação genética do *C. melanops* entre o bloco Picinguaba-Caraguatatuba e o bloco Juréia poderia também ser atribuído à redução do fluxo gênico entre estes devido às atividades antrópicas.

Implicações conservacionistas

Francisco (2001) em um estudo pioneiro dos efeitos da fragmentação da Mata Atlântica sobre populações de aves, verificados através de análises de microssatélites, constatou que em um fragmento de 112 ha de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (isolado a 72 anos) houve perda de variabilidade genética nas populações de *Conopophaga lineata* (Aves, Conopophagidae) e *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae). Já Dantas (2003), estudando também o efeito da fragmentação florestal sobre populações de *Conopophaga lineata* em fragmentos pequenos (10-30 ha) e grandes (>1000 ha) de Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais, utilizando marcadores RAPD, concluiu que a fragmentação não tem afetado a razão sexual de *C. lineata* e que esta espécie tem conseguido se adaptar a ambientes perturbados de borda e mata secundária, mantendo as suas populações em tamanho suficiente para não afetar a variabilidade genética das mesmas. Francisco (2001) menciona a dificuldade de se estabelecer uma generalização da relação tamanho de área/variabilidade genética/tempo de isolamento, pois mesmo em fragmentos que apresentam tamanhos similares podem abrigar populações que tiveram históricos demográficos diferenciados, ou seja, podem ter passado por afunilamentos e eventos fundadores de diferentes intensidades.

No caso de *C. melanops*, as informações publicadas até o presente revelam que esta espécie é sensível à fragmentação, desaparecendo de matas pequenas (Alves & Duarte, 1996; Willis & Oniki, 2003). Diante disso, é provável que o processo histórico de desmatamento de sua distribuição original tenha reduzido o tamanho de muitas populações locais, tenha promovido o desaparecimento de muitas populações em fragmentos de matas e tenha levado à perda da variação genética total de populações e da

espécie. Com isso, a capacidade de populações e da própria espécie em superar distúrbios naturais ou antrópicos pode estar reduzida.

Considerando que existem poucos estudos que analisaram a diversidade genética de aves da Mata Atlântica e que dados de outras aves florestais neotropicais sugerem que grande parte de diversidade genética tem sido amplamente subestimada pelo atual nível de classificação biológica (Bates *et al.*, 1999; Bates, 2000), estes resultados ilustram também que parte do patrimônio genético de muitos outros taxa pode estar sendo perdido com a incessante redução da Mata Atlântica.

O principal resultado deste trabalho foi que dentro de uma área remanescente com alto nível de integridade, em fina escala da Mata Atlântica, as populações de *C. melanops* analisadas apresentaram ser significativamente diferentes. Tal resultado será de fundamental importância para adoção de ações conservacionistas futuras, pois para preservar o patrimônio genético desta espécie será necessário priorizar a conservação de um maior número possível de áreas (grandes e pequenas) e seus entornos, e obter uma continuidade das entre estas áreas remanescentes (corredores ecológicos visando obter fluxo gênico entre as populações) ao longo de toda a distribuição geográfica da espécie. Em outras palavras, esforços conservacionistas baseados somente na conservação pontual de uma única grande área protegida seria importante, mas incompletamente suficiente para a perpetuação desta espécie, uma vez que grande parte do patrimônio genético iria se perder com o desaparecimento das demais populações de outras regiões desprotegidas e desconectadas. Estudos genéticos, de dispersão e de dinâmica populacional de muitas outras espécies da Mata Atlântica permitiria a elaboração de um plano conservacionista envolvendo a maioria da biodiversidade deste bioma; devido à atual situação crítica

encontrada na Mata Atlântica, infelizmente, é provável que não tenhamos tempo ou oportunidade para fazê-los.

É relevante destacar que entre as aves neotropicais os pássaros insetívoros que habitam o sub-bosque (principalmente as espécies das famílias Rhinocryptidae, Conopophagidae, Formicariidae e Tamnophilidae) têm mais especificidade de habitats, baixa mobilidade, são confinados ao interior da floresta que outras espécies pertencentes às outros guildas e são particularmente sensíveis a fragmentação e a alteração de habitats (*e.g.* revisão feita por Sekercioglu *et al.*, 2002). Considerando esta generalização, os resultados desta dissertação permitirão indiretamente subsidiar estratégias conservacionistas para muitas outras espécies de pássaros da Mata Atlântica além de *C. melanops*, principalmente para as insetívoras que habitam o sub-bosque.

6. CONCLUSÕES

A análise genética de três populações de *C. melanops* utilizando marcadores RAPD revelou uma evidente estruturação populacional em 250 km de um contínuo de Mata Atlântica. O nível moderado mas significativo de diferenciação genética indica baixas taxas de migração entre as populações. Considerando que a área em estudo está relativamente preservada, o suposto sedentarismo da espécie e a presença de barreiras geográficas naturais poderiam ser os primeiros motivos para esta estrutura genética. Isolamentos em refúgios florestais durante o Pleistoceno e os impactos antrópicos recentes dentro da região analisada poderiam ser fatores adicionais para explicar a diferenciação encontrada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber NA (1977) Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas* (n° 3), Instituto de Geografia-Universidade de São Paulo (IG-USP), São Paulo.
- Almeida FFM de, Carneiro CDR (1998) Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências* 28(2):135-150.
- Alves MAS, Duarte MF (1996) Táticas de forrageamento de *Conopophaga melanops* (Passeriformes: Formicariidae) na área de Mata Atlântica da Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro. *Ararajuba* 4(2):110-112.
- Alves MAS, Rocha CFD, Van Sluys M, Vecchi MB (2002) Nest, eggs and effort partitioning in incubation and rearing by a pair of the black-checked gnateater, *Conopophaga melanops* (Passeriformes, Conopophagidae), in an Atlantic Rainforest area of Rio de Janeiro. *Ararajuba* 10(1):67-71.
- Bates JM, Hackett SJ, Goerck JM (1999) High levels of mitochondrial DNA differentiation in two lineages of antbirds (*Drymophila* and *Hypocnemis*). *Auk* 4:1093-1106.
- Bates JM (2000) Allozymic genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *Condor* 102:770-783.
- Bartlett MS (1937) Some examples of statistical methods of research on agriculture and applied biology. *J R Stat Soc, Supplement* 4:137-170.
- Black WC (1993) PCR with arbitrary primers: approach with care. *Mol Biol* 2(1):1-6.
- Borowsky RL, Vidthayanon C (2001) Nucleotide diversity in populations of balitorid cave fishes from Thailand. *Mol Ecol* 10:2799-2805.

- Bouzat JL (2001) The population genetic structure of the greater rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biol Conserv* 99:277-284.
- Bowland AE, Bishop KS, Taylor PJ, Lamb J, van der Bank FH, van Wyk E, York D (2001) Estimation and management of genetic diversity in small populations of plains zebra (*Equus quagga*) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Biochem Syst Ecol* 29:563-583.
- Brooks T, Balmford A (1996) Atlantic forest extinctions. *Nature* 380:115.
- Budiansky S (1994) Extinction or miscalculation? *Nature* 370:105.
- Bussel JD (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol Ecol* 8:775-789
- Callejas C, Ochando MD (1998) Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *J Fish Biol* 53:208-215.
- Caparella, AP (1987) Effects of riverine barriers on genetic differentiation of Amazon forest undergrowth birds. Ph.D. diss., Louisiana State University, Baton Rouge.
- Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreira PCG, Oliveira DE (1998) High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinea echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Mol. Ecol.* 7:601-608.
- Chapman LJ, Chapman CA, Brazeau DA, McLaughlin B, Jordan M (1999) Papyrus swamps, hypoxia, and faunal diversification: variation among populations of *Barbus neumayeri*. *J Fish Biol* 54:310-327.

- Coelho ASG (2001) DBOOT – Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores, v. 1.1. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas-MG (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. MMA/SBF, Brasília, 40 pp.
- Crochet PA (1996) Can measures of gene flow help to evaluate bird dispersal? *Acta Oecologica* 17(6): 459-474.
- Cruz O (1974) A serra do Mar e o litoral de Caraguatatuba – SP. Série Teses e Monografias, n.16. Instituto de Geografia/Universidade de São Paulo (IG/USP), São Paulo, 181 pp.
- Dantas GPM (2003) Efeito da fragmentação florestal na razão sexual e variabilidade genética de *Conopophaga lineata* (Aves: Conopophagidae) em Área de Mata Atlântica, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 66 pp.
- Dinesh KR, Lim TM, Chua KL, Chan WK, Phang VPE (1993) RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zoolog Sci* 10:849-854.
- Escudero A, Iriondo JM, Elena Torres M (2003) Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biol. Conserv.* 113:351-365.
- Excoffier L (1992) WINAMOVA version 1.55. (software) University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, Geneva. <http://lgb.unige.ch/software/win/amova/> (16 June 2002).

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131:479-491.
- Ferreira ME, Grattapaglia, D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição EMBRAPA/CENARGEN, Brasília, 220 pp.
- Francisco MR (2001) Efeitos da fragmentação da mata atlântica sobre populações de aves verificados através de análises de microsátélites. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 78 pp.
- Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE (2002) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica - período de 1995-2000. Fundação SOS Mata Atlântica/Ministério da Ciência e Tecnologia/INPE, São Paulo, 43 pp.
- Haig SM, Gratto-Trevor CL, Mullins TD, Colwell MA (1997) Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Mol Ecol* 6:413-427.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2003) RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genet Mol Biol* 26(1):19-25.
- Ho KY, Ou CH, Yang JC, Hsiao JY (2002) An assessment of DNA polymorphisms and genetic relationships of *Casuarina equisetifolia* using RAPD markers. *Bot Bull Acad Sin* 43:93-98.
- Hoelzel AR, Dover GA (1991) *Molecular Genetic Ecology*. Oxford University Press, New York, 73 pp.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA (1994) Manual de Anilhamento de Aves Silvestres, 2ª edição versão ampliada,

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Centro de Pesquisas para conservação das Aves Silvestre, Brasília, 148 pp.

Kimberling DN, Ferreira AR, Shuster SM, Keim P (1996) RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. *Mol Ecol* 5:521-529.

Kirsten JH, Dawes CJ, Cochrane BJ (1998) Randomly amplified polymorphism detection (RAPD) reveals high genetic diversity in *Thalassia testudinum* banks ex König (Turtlegrass). *Aquat Bot* 61:269-287.

Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB (2001) Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Mol Ecol* 10:1143-1152.

Lahiri DK, Nurnberger Jr. JI (1991) A rapid non enzymatic method for the preparation of HMW D human DNA blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6:381-398.

Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ (2000) A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga Rattlesnake. *The American Genetic Association* 91:458-463.

Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3:91-98.

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.

Margis R, Felix DB, Soares JFC, Salgueiro F, Araujo DSD, Breyne P, Van Montagu M, Oliveira DE, Margis-Pinheiro MMAN (2002) Genetic differentiation among three

neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodiversity and Conservation* 11(1):149-163.

Maroja LS, Almeida FC, Seuánez HN (2003) Genetic differentiation in geographically close populations of the water rat *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) from Brazilian Atlantic Forest. *Genet Mol Biol* 26(4):403-410.

Mayr E (1977) *Populações, Espécies e Evolução*. Companhia Editora Nacional, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 485 pp.

McDonald DB (2003) Microsatellite DNA evidence for gene flow in neotropical lek-mating long-tailed manakins. *Condor* 105:580-586.

Meffe GK, Carroll R (1994) *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, pp 143-177.

Meyer de Schauensee R, Mack AL (1970) *A Guide to the Birds of South America*. John Wiley & Sons, Inc., Philadelphia, 498 pp.

Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Miyaki CY, Eberhard JR (2002) Genética da conservação de psitacídeos. In: Galetti M and Pizzo MA (eds) *Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil*. Melopsittacus Publicações Científicas, Belo Horizonte, pp 27-48.

Mockford SW, Snyder M, Herman TB (1999) A preliminary examination of genetic variation in a peripheral population of Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Mol Ecol* 8:323-327.

- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949):283-292
- Nusser JA, Goto RM, Ledig DB, Fleischer RC, Miller MM (1996) RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. *Mol Ecol* 5:463-472.
- Palacios C, Gonzales-Candela F (1997) Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Mol Ecol* 6:1107-1121.
- Paterson IA, Snyder M (1999) Molecular genetic (RAPD) analysis of Leach's Storm-petrels. *Auk* 2:338-344.
- Pessoa RO (2001) Variação geográfica em *Conopophaga melanops* (Aves: Conopophagidae), uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 65 pp.
- Pinto OMO (1978) Novo catálogo das aves do Brasil. Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, São Paulo.
- Schierenbeck KA, Skupski M, Lieberman D, Lieberman M (1997) Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Mol Ecol* 6:137-144.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN ver 2.000: a software for population genetics data analysis. (software) University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, Geneva. <http://anthropologie.unige.ch/arlequin> (12 March 2003).

- Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo (1964) Geologia do Estado de São Paulo. Instituto Geográfico e Geológico, boletim nº41, São Paulo, 263 pp.
- Sekercioglu CH, Ehrlich PR, Daily GC, Aygen D, Goehring D, Sand RF (2002) Disappearance of insectivorous birds from tropical forest fragments. *PNSA* 99(1):263-267.
- Sick H (1997) Ornitologia Brasileira. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 912 pp.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47(1):264-279.
- Slatkin M (1994) Gene Flow and Population Structure. In: Real LA (ed) *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, pp 3-17.
- Souza FL, Cunha AF, Oliveira MA, Pereira GAG, Reis SF (2002) Estimating dispersal and gene flow in the neotropical freshwater turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae) by combining ecological and genetic methods. *Genet Mol Biol* 25(2):151-155.
- Stevens MT, Turner MG, Tuskan GA, Romme WH, Gunter LE, Waller DM (1999) Genetic variation in postfire aspen seedlings in Yellowstone National Park. *Mol Ecol* 8:1769-1780.
- Stewart CN, Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J Evol Biol* 9:153-171.

- Stotz FD, Fitzpatrick J, Parker III TA, Moskovits DK (1996) Neotropical Birds: Ecology and Conservation. Chicago University Press, Chicago, 478 pp.
- Torimaru T, Tomaru N, Nishimura N, Yamamoto S (2003) Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leucoclada* M. patches in an old-growth beech forest. *Mol Ecol* 12:809-818.
- Tropmair H (1969) A cobertura primitiva do Estado de São Paulo. *Biogeografia* (n. 1). Instituto de Geografia-Universidade de São Paulo (IG-USP), São Paulo.
- Turner IM, Corlett RT (1996) The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *TREE* 11(8):330-333.
- Via S (1994) The Evolution of Phenotypic Plasticity: What Do We Really Know. In: Real LA (ed) *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, pp 35-85.
- Viadana AG (2002) A Teoria dos Refúgios Florestais Aplicada ao Estado de São Paulo. Editado pelo autor, Rio Claro, 71 pp.
- Victor MAM (1975) Cem anos de devastação. *O Estado de São Paulo* (Suplemento do Centenário), São Paulo, 13 pp.
- Vrijenhoek RC (1997) Gene flow and genetic diversity in natural fragmented metapopulations of deep-sea hydrothermal vent animals. *J Hered* 88:285-293.
- Vucetich LM, Vucetich JA, Joshi CP, Waite TA, Peterson RO (2001) Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in a naturally fragmented landscape. *Mol Ecol* 10:35-40.
- Wang XH, Trost C (2001) Dispersal pattern of Black-billed Magpies (*Pica hudsonia*) measured by molecular genetic (RAPD) analysis. *Auk* 118(1):137-146.

- Weir BS (1990) Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, 377 pp.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213-7218.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski LA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531-6535.
- Willis EO, Oniki Y (1992) Losses of São Paulo birds are worse in the interior than in Atlantic forests. *Cienc Cult* 44(5):326-328.
- Willis EO, Oniki Y (2003) *Aves do Estado de São Paulo*. Divisa Editora, Rio Claro, p 80.
- Wright S (1978) *Evolution and genetics of populations. Vol. 2: The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, London, 511 pp.
- Zawko G, Krauss SL, Dixon KW, Sivasithamparam K (2001) Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopon obtectus* (Ericaceae). *Mol Ecol* 10:2389-2396.
- Zeisset I, Beebee TJC (2003) Population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Mol Ecol* 12:639-646.
- Zucchi MI (2002) Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo/ESALQ, Piracicaba, 130 pp.

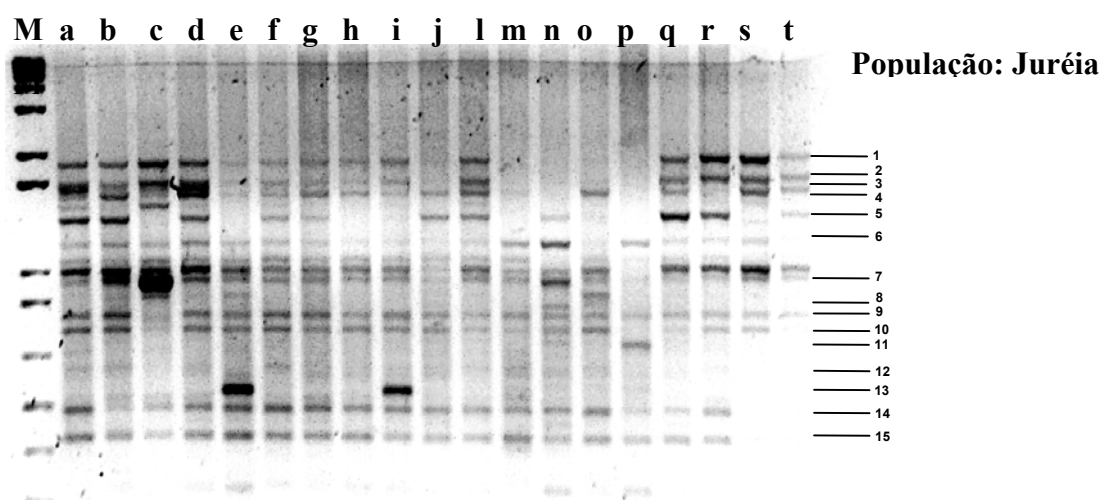
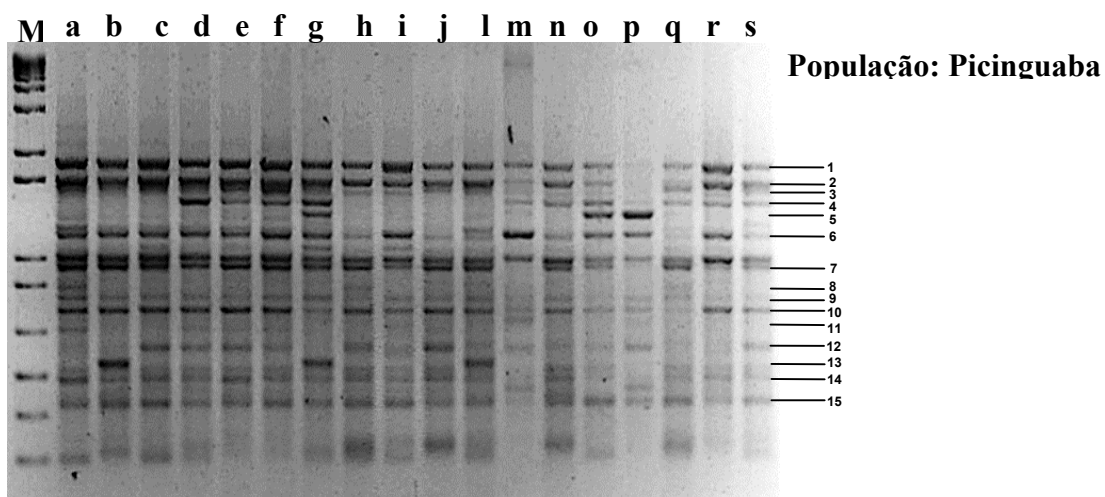
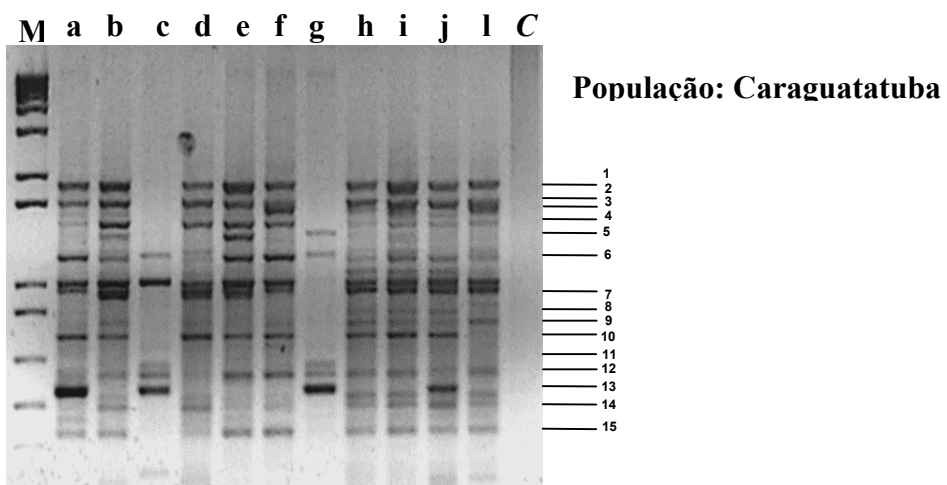
Zwartjes PW (1999) Genetic variability in the endemic vireos of Puerto Rico and Jamaica contrasted with the continental White-eyed -Vireo. *Auk* 166(4):964-975.

Zwartjes PW (2001) Genetic structuring among migratory populations of the Black-whiskered Vireo, with a comparison to the Red-eyed Vireo. *Condor* 103:439-448.

Yeh F, Yang R, Boyle T (1999) Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, POPGENE version 1.31.



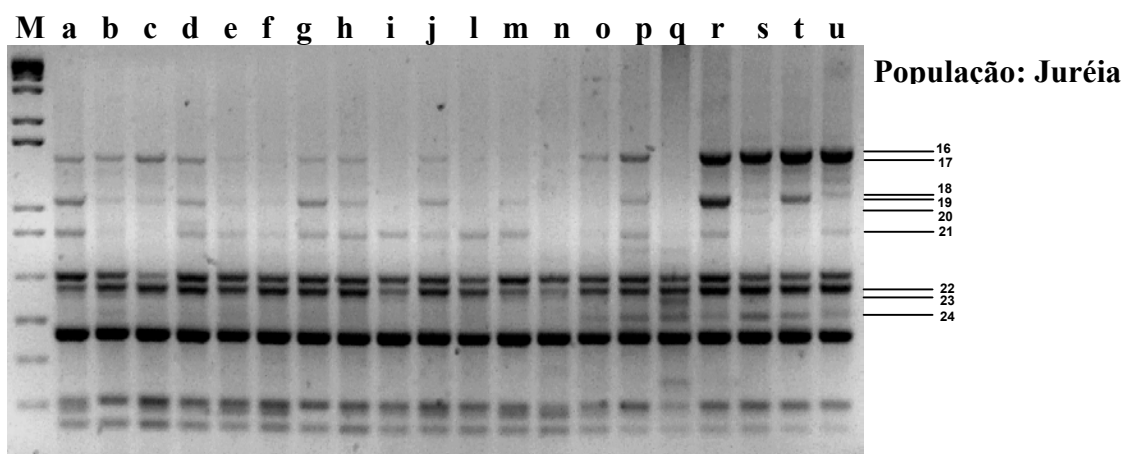
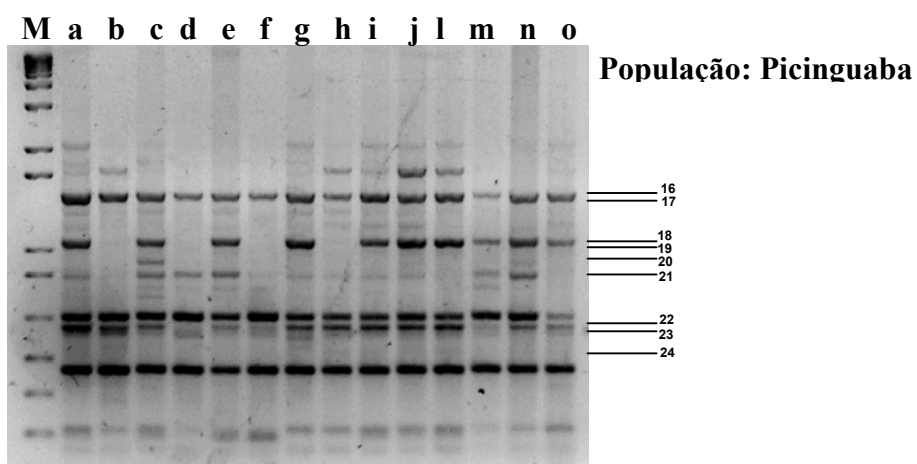
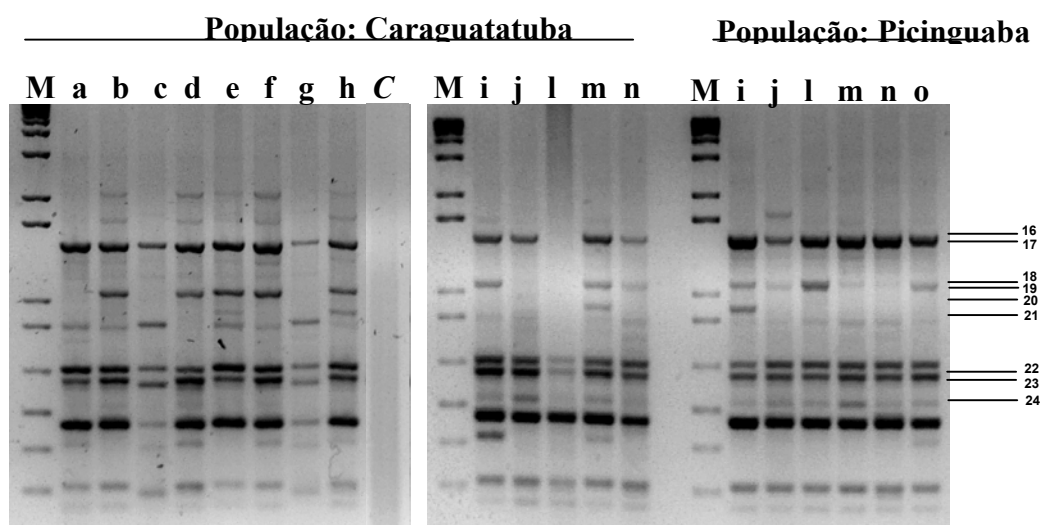
Anexos

Géis de agarose 1,5% evidenciando os produtos de PCR utilizando o *primer 1*

Legenda: M=marcador molecular (1 kb).

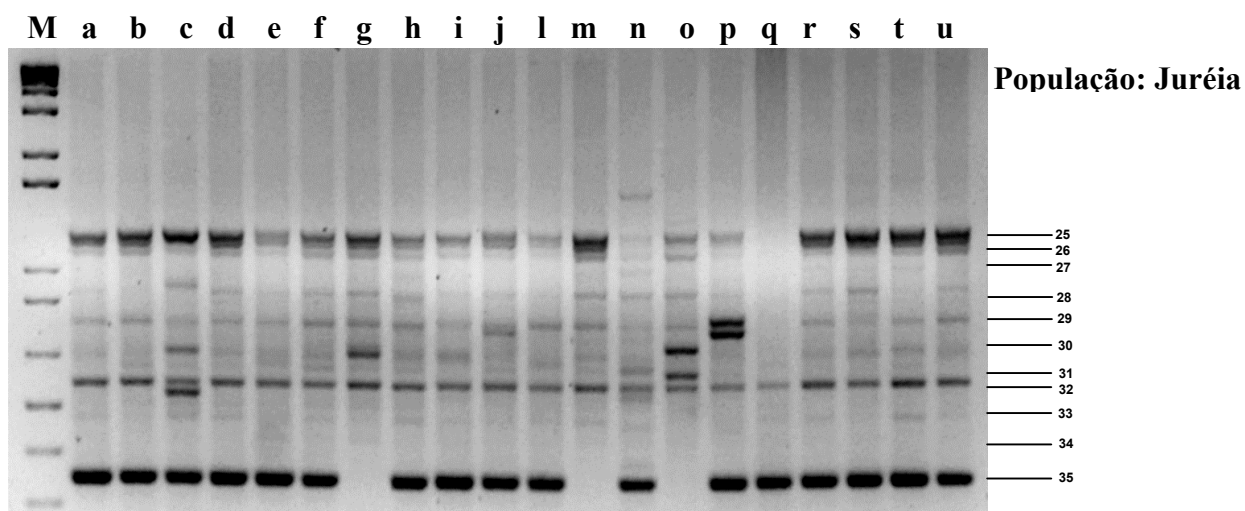
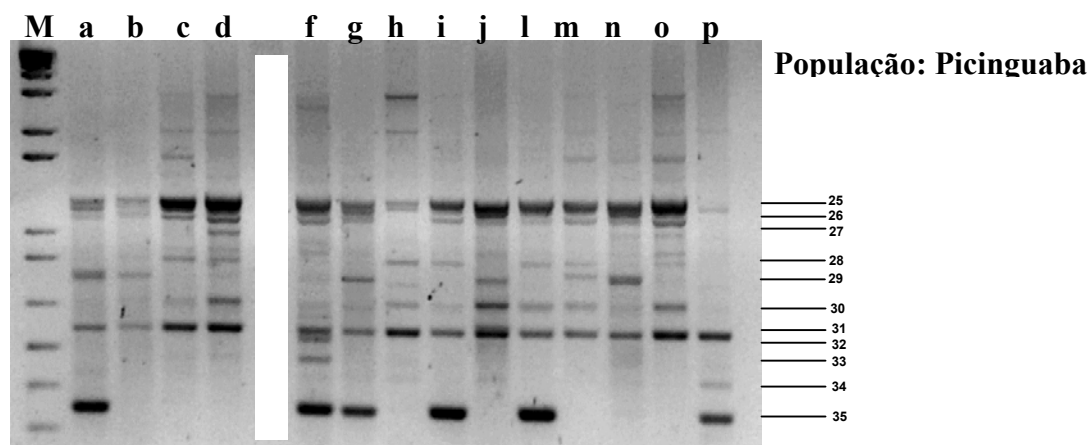
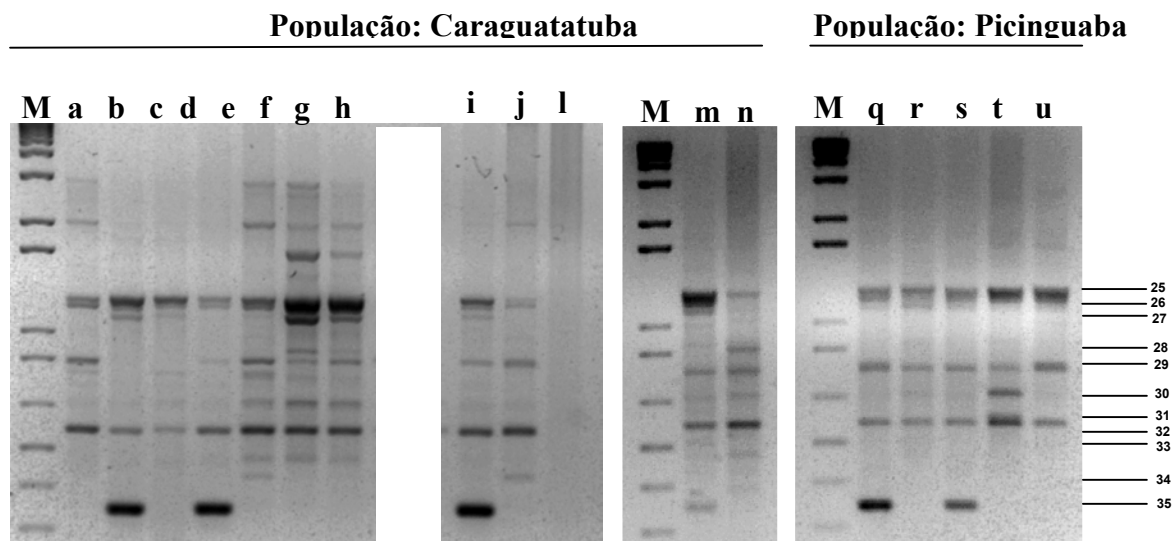
Primer 1

Géis de agarose 1,5% evidenciando os produtos de PCR utilizando o *primer 2*



Legenda: M=marcador molecular (1 kb).

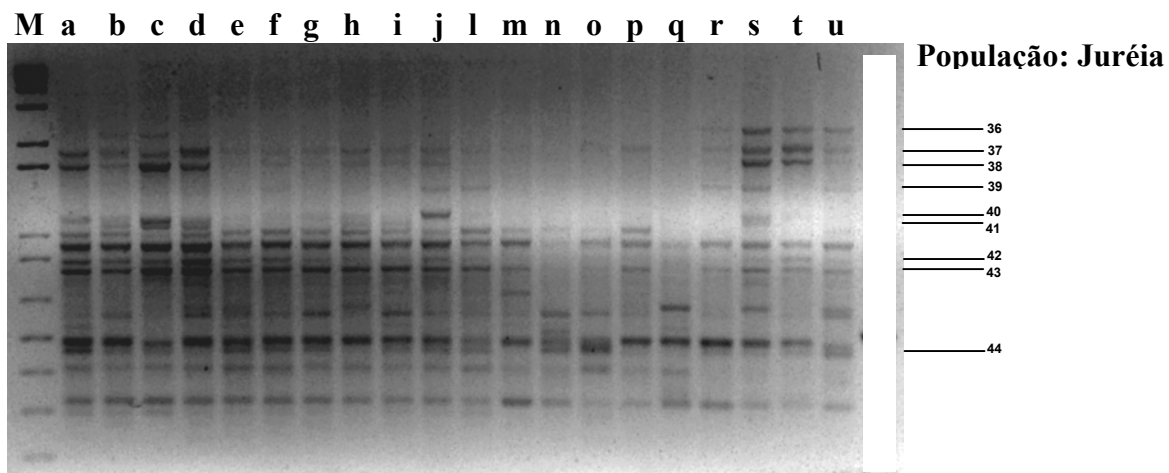
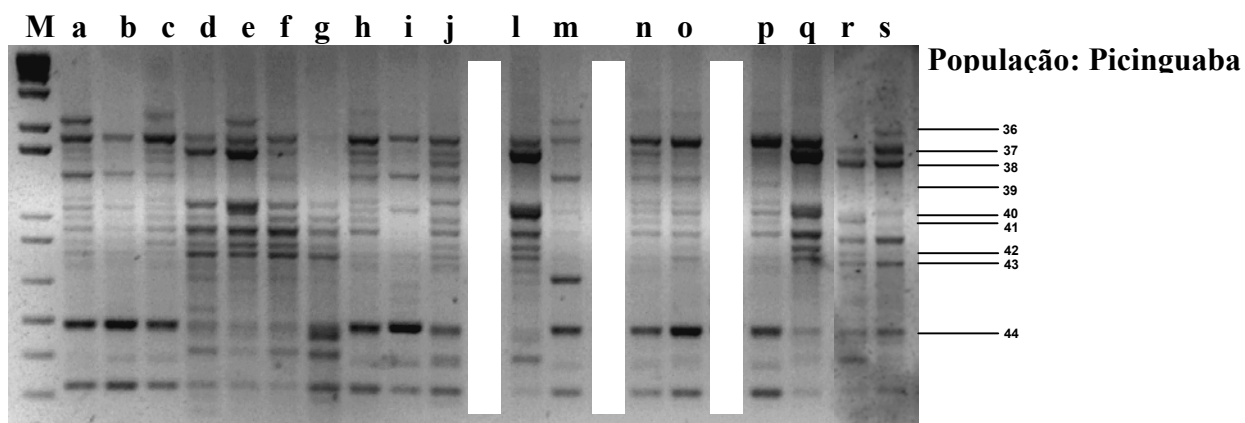
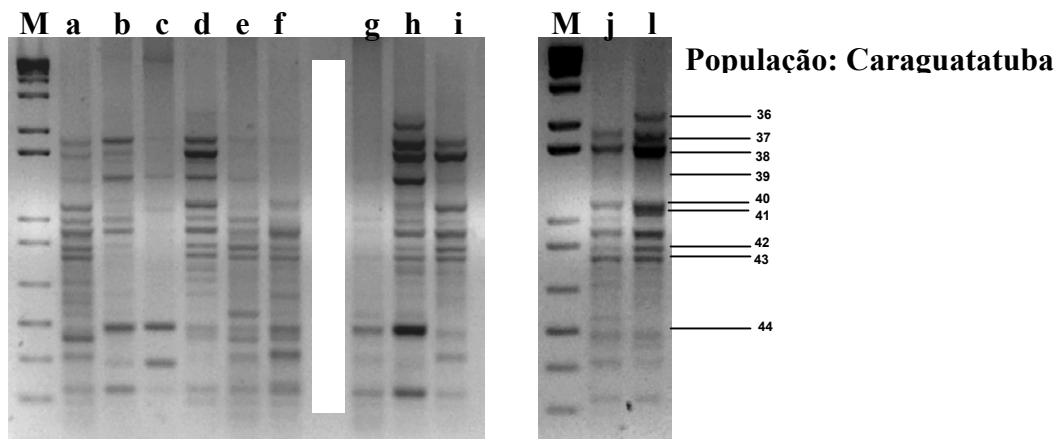
Primer 2

Géis de agarose 1,5% evidenciando os produtos de PCR utilizando o *primer 3*

Legenda: M=marcador molecular (1 kb).

Primer 3

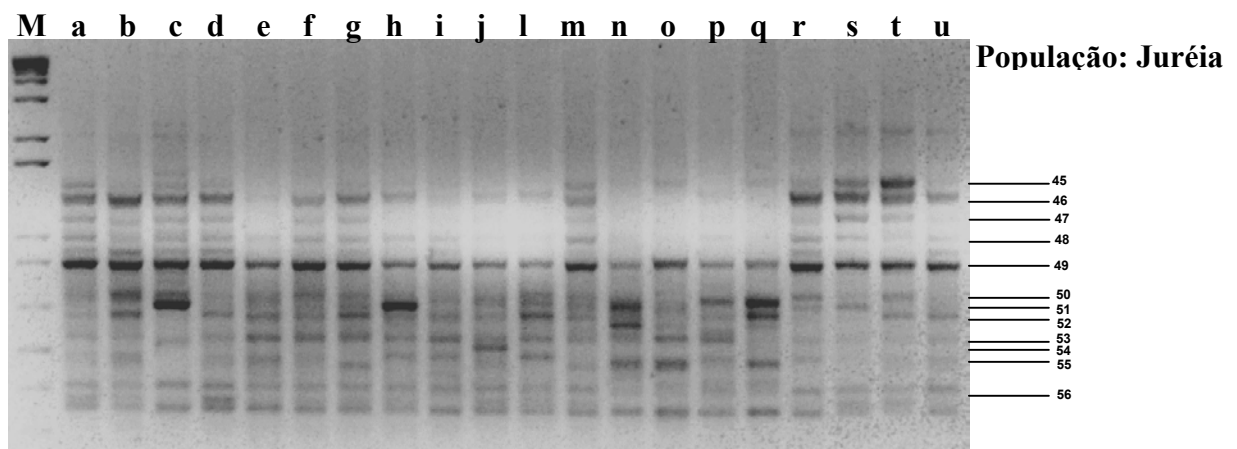
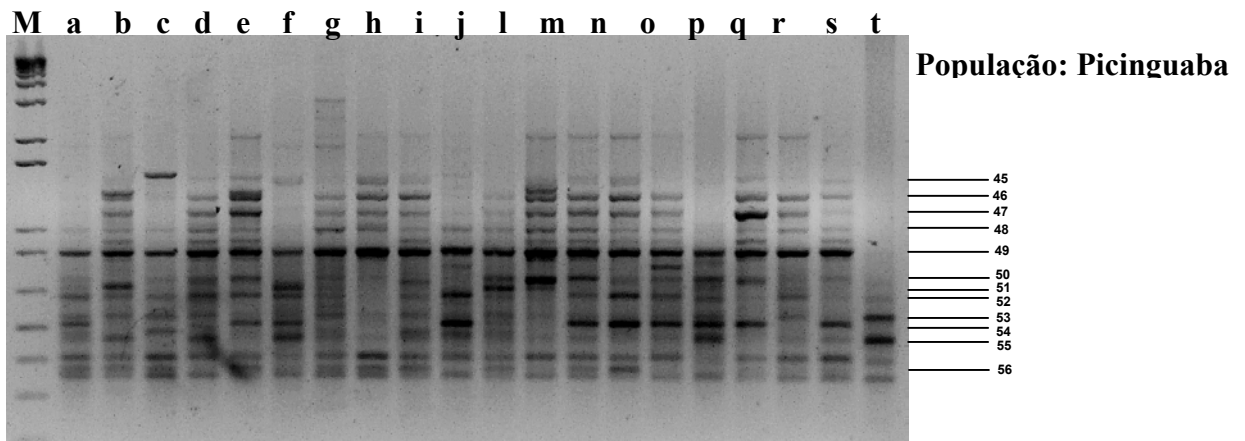
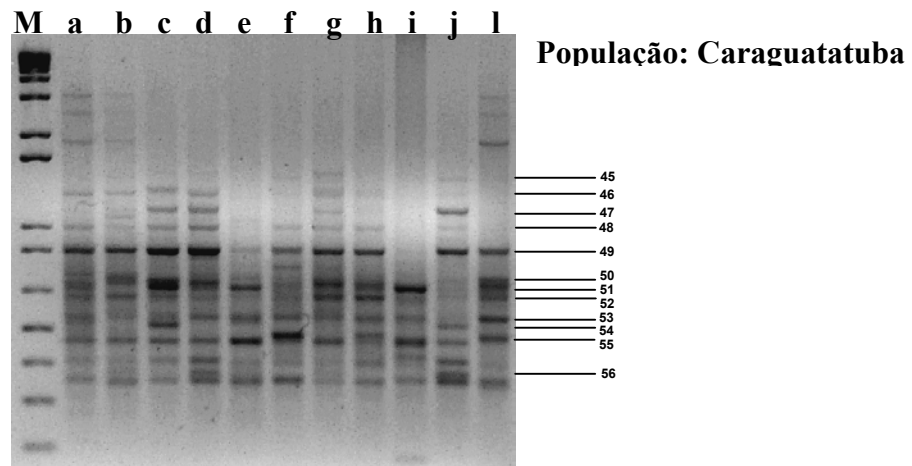
Géis de agarose 1,5% evidenciando os produtos de PCR utilizando o *primer 4*



Legenda: M=marcador molecular (1 kb).

Primer 4

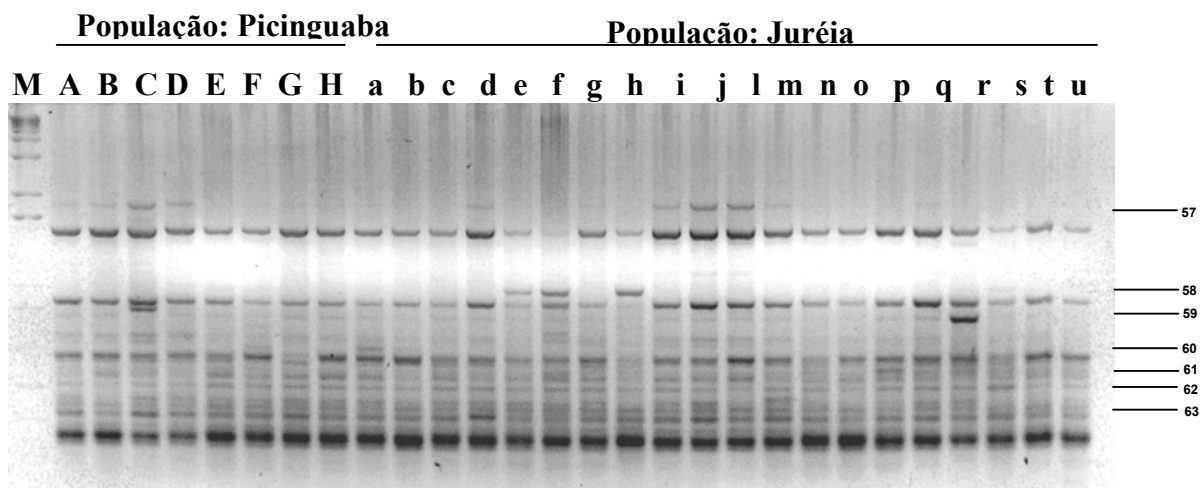
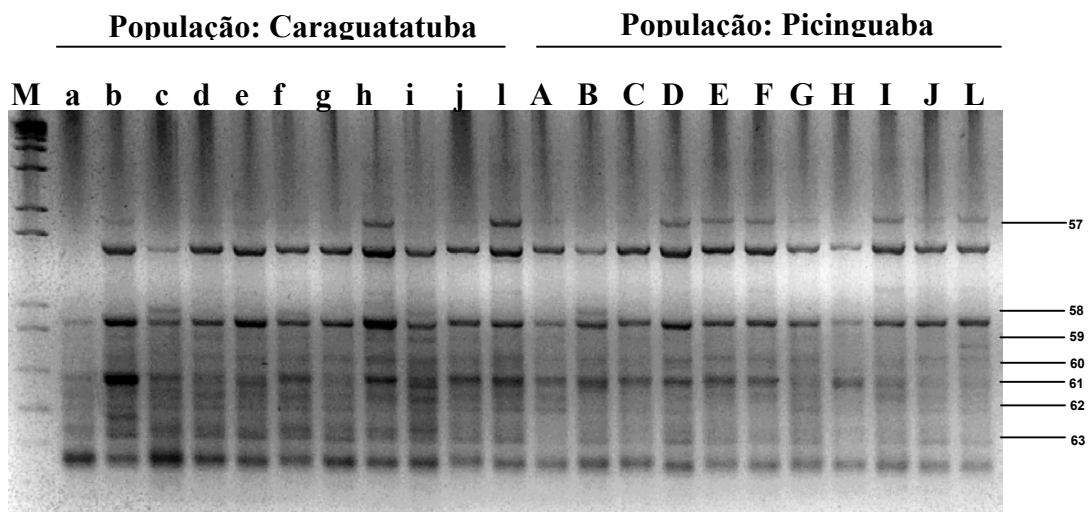
Géis de agarose 1,5% evidenciando os produtos de PCR utilizando o *primer 5*



Legenda: M=marcador molecular (1 kb).

Primer 5

Géis de agarose 1,5% evidenciando os produtos de PCR utilizando o *primer 6*



Legenda: M=marcador molecular (1 kb).

Primer 6