

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução**

**Ana Cristina Fazza**

**Varição genética do arapaçu-liso *Dendrocincla turdina* (Aves, Dendrocolaptidae) em uma população da Mata Atlântica. Uma contribuição para conservação dessas aves.**



**São Carlos**

**2010**

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

Ana Cristina Fazza

**Varição genética do arapaçu-liso *Dendrocincla turdina* (Aves, Dendrocolaptidae) em uma população da Mata Atlântica. Uma contribuição para conservação dessas aves.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos

2010

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

F287vg

Fazza, Ana Cristina.

Variação genética do arapaçu-liso *Dendrocincla turdina* (Aves, Dendrocolaptidae) em uma população da Mata Atlântica. Uma contribuição para conservação dessas aves / Ana Cristina Fazza. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 50 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética. 2. Genética da conservação. 3. Microssatélites. 4. Passeriformes. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

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

VARIAÇÃO GENÉTICA DO ARAPAÇU-LISO  
*DENDROCINCLA TURDINA* (AVES,  
DENDROCOLAPTIDAE) NA MATA ATLÂNTICA. UMA  
CONTRIBUIÇÃO PARA CONSERVAÇÃO DESSAS AVES.


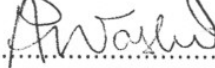
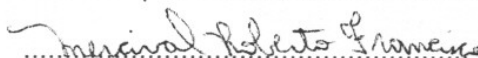
Dissertação de Mestrado de Ana Cristina Fazza

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Galetti Junior

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco

  
.....  
  
.....  
  
.....

*Dedico esta dissertação a  
minha querida família.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

A minha família. Aos meus pais, pelo apoio incondicional aos meus estudos, por todo carinho, paciência e confiança. Por todos os conselhos e pelo exemplo de pessoas dedicadas e amorosas. São eles que tornam possível que busquemos nossos sonhos onde quer que seja, pois eles estarão sempre ao nosso lado incentivando, e por isso dedico a eles esta dissertação. As minhas irmãs Ana Carolina e Ana Karina, sempre interessadas e prestativas, por serem ótimas companhias, tornando tudo divertido com sua alegria e sorrisos. Amo muito vocês.

Ao Professor Doutor Pedro Manoel Galetti Junior, pelos três anos de crescimento profissional, intelectual e pessoal, pela infinita paciência e pela confiança no meu trabalho. Espero ter correspondido as suas expectativas de quando aceitou me orientar.

Ao Professor Doutor Mercival Roberto Francisco, pela excelente sugestão da espécie *D. turdina* e pelas amostras utilizadas nesse estudo. Agradeço ainda por ter gentilmente aceitado o convite para compor a presente banca, assim como a Professora Doutora Adriane Pinto Wasko.

Ao pessoal do laboratório, pelo agradável convívio e auxílio em todas as etapas deste trabalho. A Carla e ao Maurício pela ajuda na prospecção, ao Bruno que sempre tira minhas dúvidas no laboratório e nas aulas, a Aninha e ao Fefe que não importa onde estejam eu sempre faço mil perguntas e eles pacientemente sempre me ajudam. Dany, Marina, Renatinha, Artur, Michele, Bia, Lívia, Aline, Karol, Carol, Niara, Camilla, Sarah, Savana, Daniel, Beto, Marcelinho, todos colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento

do trabalho, desde o apoio dentro do laboratório nos experimentos, conselhos, ensinamentos, até o almoço no RU e os momentos do café.

A Paulinha, pelas palavras de incentivo e pela ajuda na elaboração da versão final da dissertação. É uma grande amiga que está sempre dando bons conselhos, pegando artigos que eu não tenho acesso, deixando tudo o que tem para fazer de lado para me ajudar quando eu preciso.

A Nadia pela cuidadosa revisão, Elen pela ajuda com a qualificação, Carol, Vanessa, Bruna, Miyuki, Ana Z, Gorgon, Hil, Gabriel, Sandra. A todos meus amados amigos que estão sempre apoiando e interessados no meu trabalho.

As meninas que eu tive a satisfação de conviver no último ano: Samanta, Maryhá e Kenia. E aos meninos da Chico Lopes, pelos momentos de descontração e alegria.

Ao Romulo por todos os abraços, pela paciência nos momentos de stress, é uma pessoa pela qual eu tenho enorme carinho e que eu amo muito.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, a Heloisa e Greisse, que sempre estão disponíveis, com bom humor e eficiência.

Ao Departamento de Genética e Evolução e todos seus professores e funcionários.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolvimento do projeto.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein



## RESUMO

A Mata Atlântica está reduzida a menos de 8% de sua extensão original, ainda assim, possui uma das maiores diversidades e taxas de endemismos observadas em florestas neotropicais. Portanto, este bioma é considerado um local prioritário para conservação internacionalmente. Diversos táxons são ameaçados pela intensa fragmentação de hábitat, particularmente, algumas espécies de aves de sub-bosque têm uma capacidade reduzida de permanência em locais degradados. Estudos com a espécie *Dendrocincla turdina* demonstram que possui sensibilidade a locais com intenso efeito de borda, podendo até mesmo desaparecer de ambientes muito impactados. Esta baixa tolerância pode ocorrer devido à sua alta especialização ecológica. Podemos verificar os impactos da degradação ambiental sobre as espécies por meio de análises de sua diversidade genética, para isso é necessário fazer uso de marcadores moleculares. Um marcador molecular bastante útil para estudos populacionais são os microssatélites, no entanto, algumas espécies não possuem nenhum loco descrito, impedindo que tal análise seja realizada. Nosso objetivo foi identificar e caracterizar locos de microssatélites para a espécie *D. turdina* e analisar a variabilidade genética de uma população da espécie em uma área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, de modo a contribuir com a conservação dessa espécie. Foram identificados e caracterizados dezenove locos de microssatélites, dos quais 11 apresentaram-se polimórficos para a população estudada. Até o momento não havia nenhum loco descrito para a espécie. O número de alelos para os locos polimórficos variou de 2 a 16. Apenas um loco (Dft12) apresentou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, possivelmente devido à presença de alelos nulos. Nenhum loco estava em desequilíbrio de ligação. A diversidade gênica variou de 0,08 a 0,91 e a heterozigosidade observada de 0,07 a 0,80. O coeficiente de endocruzamento para a população não diferiu significativamente de zero. O programa Bottleneck indicou uma possível ocorrência de gargalo populacional. A razão sexual foi a esperada de 1:1. Os microssatélites descritos amplificaram com sucesso em outras duas espécies da família Dendrocolaptidae (*Xiphorhynchus fuscus* e *Sittasomus griseicapillus*), indicando sua possível utilização para análises populacionais de grupos taxonômicos relacionados. O estudo produziu ferramentas genéticas importantes para trabalhos que visem compreender a diversidade e estrutura genética da espécie *D. turdina* e possivelmente de grupos próximos. A análise da biodiversidade molecular de espécies em hábitats criticamente ameaçados, como a Mata Atlântica, podem ser úteis para planos de conservação e manejo, auxiliando no reconhecimento e caracterização de áreas com maiores recursos genéticos, de modo a preservar a maior variabilidade possível.

## ABSTRACT

The Atlantic forest is reduced to less than 8% of its original extent, but still has one of the greatest diversity and endemism rates observed in the Neotropical forests. Therefore, this biome can be internationally considered an hotspot for conservation priority. Several taxa are threatened by the intense habitat fragmentation, particularly, some understory species of birds have a reduced ability of permanence in degraded places. Studies on the species *Dendrocincla turdina* demonstrate that it possesses sensitivity to local intense edge effects and it could even disappear at depleted environments. This lowers tolerance may be due to its high ecological specialization. We can verify the impacts of environmental degradation on the species through analysis of genetic diversity, which is made using molecular markers. A quite useful molecular marker for population studies are the microsatellites, however, some species have none described, preventing such analysis to be performed. Our aim was to identify and to characterize microsatellite loci for *D. turdina* and to analyze the genetic variability of a population of this species from an Atlantic Forest area in the Sao Paulo State, in order to contribute to the conservation of this species. It were identified and characterized nineteen microsatellite loci, of which 11 showed polymorphism for the studied population. So far there was not any described loci for the species. The number of alleles for polymorphic loci ranged from 2 to 16. Only one locus (Dft12) presented deviations of Hardy-Weinberg equilibrium, possibly due to the presence of null alleles. No pair of loci was in linkage disequilibrium. The genetic diversity varied from 0.08 to 0.91 and the observed heterozygosity from 0.07 to 0.80. The inbreeding coefficient for the population did not differ significantly from zero. The software Bottleneck indicated a possible occurrence of population bottleneck. The sex ratio was the expected 1:1. The described microsatellites amplified with success in other two species of the family Dendrocolaptidae (*Xyphorhynchus fuscus* and *Sittasomus griseicapillus*), indicating its potential use for population analysis of related taxa. The study produced valuable genetic tools for studies that seek to understand the diversity and genetic structure of the species *D. turdina* and possibly related groups. The analysis of the molecular biodiversity of species in habitats critically endangered, as the Atlantic forest, may be useful for conservation plans and management, aiding in the recognition and characterization of areas with larger genetic resources, in order to preserve the largest possible variability.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Mata Atlântica: biodiversidade e status de conservação	1
1.2. Genética da conservação	3
1.3. Uso de microssatélites para análises populacionais	4
1.4. Família Dendrocolaptidae	7
1.4.1. A espécie <i>Dendrocincla turdina</i> Lichtenstein	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos gerais	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. JUSTIFICATIVA	14
4. METODOLOGIA	15
4.1. Extração e quantificação do DNA	15
4.2. Prospecção de microssatélites	16
4.2.1. Identificação de microssatélites e construção dos <i>primers</i>	17
4.3. Amplificação e genotipagem dos locos de microssatélites	19
4.4. Análises estatísticas	21
4.5. Sexagem molecular	22
4.6. Amplificação cruzada	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	29
6.1. Prospecção de microssatélites	29
6.2. Caracterização populacional de <i>D. turdina</i>	31
6.3. Amplificação cruzada dos marcadores desenvolvidos	34
7. CONCLUSÕES	37
8. REFERÊNCIAS	38
APÊNDICES	49

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A Mata Atlântica: biodiversidade e estado de conservação

A Mata Atlântica é uma floresta tropical com ocorrência na costa do Brasil desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul estendendo-se até a Argentina e Paraguai (Figura 1) (Dinerstein *et al.*, 1995). Estima-se que sua cobertura original era cerca de 1.315.460 km<sup>2</sup>, equivalente a pouco menos de 15% da extensão do território brasileiro (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2009). Atualmente existem menos de 8% de florestas primárias remanescentes, compostas, em sua maior parte, por diversos fragmentos descontínuos em diferentes estágios de degradação e poucas áreas mais extensas de mata localizadas no sul e sudeste do país (Guatura, 1996; Ranta *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Distribuição da Mata Atlântica no Brasil; em verde claro a cobertura original e em verde escuro a remanescente.

Este bioma é muito heterogêneo, estendendo-se de 4° a 32°S em latitude e do nível do mar até 2900m em altitude, inclui diferentes zonas climáticas, tipos de solo, relevo, vegetação (formações abertas, mistas e densas, semi-decíduas e decíduas), índices pluviométricos, características que contribuem para a grande diversidade biológica observada (Tabarelli *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2006). De acordo com Myers *et al.* (2000), estima-se que a Mata Atlântica possua 20000 espécies de plantas e 1361 espécies de vertebrados, sendo 2,7 e 2,1% endêmicas, respectivamente. Em relação à avifauna, das 620 espécies observadas neste bioma, 181 são endêmicas, uma das mais altas taxas de endemismo de todo o mundo, e quase 68% dessas espécies são consideradas raras (Goerck, 1997; Myers *et al.*, 2000).

A considerável perda de hábitat associada à alta diversidade e taxa de endemismo na Mata Atlântica faz com que esta seja considerada uma área prioritária para conservação (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 1998). Contudo, apenas 2% da superfície original da Mata Atlântica encontram-se protegidos legalmente como parques nacionais e reservas biológicas (Zaú, 1998). De acordo com Paglia *et al.* (2004), das 104 espécies de vertebrados ameaçadas de extinção analisadas, 57 não se encontram efetivamente protegidas em Unidades de Conservação na Mata Atlântica, indicando a existência de lacunas no sistema de conservação.

No Estado de São Paulo encontram-se 13,63% de floresta remanescente, a qual é representada por um conjunto de unidades de conservação e áreas não-protegidas que formam a maior área contínua do bioma (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2009). As duas maiores regiões protegidas estão localizadas na Serra de Paranapiacaba e na Serra do Mar

(Aleixo e Galetti, 1997). No período de 2005-2008, foi estimada uma taxa de desflorestamento de 2455 ha (0,11%) para este Estado, sendo que foi uma das menores. Nesse período foram desflorestados quase 103 mil hectares de Mata Atlântica em 10 estados analisados; os mais críticos foram Minas Gerais, Santa Catarina e Bahia, situação que agrava a proteção da biodiversidade (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2009).

## **1.2. Genética da conservação**

Muitas espécies ameaçadas não se encontram em áreas protegidas, demonstrando que, apesar do crescente número de iniciativas para conservação da biodiversidade da Mata Atlântica nos últimos vinte anos, ainda são necessários muitos estudos e integração destes em políticas conservacionistas para superar o desafio de evitar mais desmatamentos e perda de espécies (Paglia *et al.*, 2004; Tabarelli *et al.*, 2005).

Devido ao aumento da preocupação em preservar a biodiversidade, surgiu uma nova área de estudo, conhecida como Biologia da Conservação, que visa compreender os efeitos antrópicos nas espécies, comunidades e ecossistemas, elaborar planos factíveis para impedir a extinção de espécies e estratégias para manejo e conservação da fauna e flora (Primack e Rodrigues, 2001). Inseridos neste contexto, estudos utilizando dados genéticos podem fornecer informações valiosas para a manutenção da diversidade a longo prazo, além de informações acerca de aspectos ecológicos e demográficos necessárias para a recuperação de uma espécie (Haig, 1998).

A diversidade genética dos organismos é reconhecida como uma das três prioridades globais de conservação pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (McNeely *et al.*, 1990, Frankham *et al.*, 2004). É definida como a variedade de alelos ou genótipos que um determinado grupo (populações ou espécies) pode apresentar e que possibilita que uma população se adapte às constantes mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 2004; Templeton *et al.*, 2001).

Diversos marcadores moleculares, ou seja, regiões genômicas que apresentam alguma variabilidade para elucidar um determinado estudo populacional, podem ser utilizados para estimar a variabilidade genética, como DNA mitocondrial, aloenzimas, RFLP, RAPD, microssátelites, entre outros (Awise, 2004; Matioli, 2001). Dentre estes, os microssatélites têm sido amplamente utilizados em trabalhos recentes para análise de diversidade genética nos mais diversos grupos (Francisco *et al.*, 2007; Karasawa *et al.*, 2007; Karunaweera *et al.*, 2008).

### **1.3. Uso de microssatélites para análises populacionais**

Os microssatélites, também conhecidos como repetições de seqüências simples (*simple sequence repeats* - SSR) ou pequenas repetições seqüenciais (*short tandem repeats* - STR), são regiões genômicas compostas de pequenos motivos (*motifs*) de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* (Oliveira *et al.*, 2006). Dependendo de como os motivos se encontram repetidos, os microssatélites podem ser classificados como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos. Quando não há nenhuma interrupção na

seqüência de motivos, é dito perfeito (CTCTCTCT), quando há um par de bases entre as repetições é imperfeito (CTCT**AT**CTCT), se há uma pequena seqüência dentro do microssatélite que não seja o motivo é dito interrompido (CTCT**ATGC**CTCT) e se é formado por repetições de dois motivos diferentes e adjacentes classifica-se como composto (CTCTCTCTAGAGAGAG) (Oliveira *et al.*, 2006).

A sua utilidade como marcador molecular advém de características como a alta taxa de mutação em relação ao restante do genoma, o que os torna altamente polimórficos; a co-dominância, que permite a identificação de heterozigotos; e o fato de que a maioria dos locos são seletivamente neutros permitindo a aplicação teórica de princípios da genética de populações (Jarne e Lagoda, 1996; Oliveira *et al.*, 2006). Essas peculiaridades possibilitam aos microssatélites fornecer dados relevantes para verificar processos genéticos que estão atuando sobre uma população, como a ocorrência de fluxo gênico e deriva genética, a identificação de parentesco e o reconhecimento de possíveis unidades de conservação (Haig, 1998; Chan e Arcese, 2002; Heywood e Iriondo, 2003).

A alta taxa de mutação dos microssatélites, geradora de polimorfismo, tem sido explicada por diferentes mecanismos, como *crossing-over* desigual que causa inserções em um cromossomo e deleções no homólogo, aumentando ou diminuindo o número de repetições de um microssatélite e deslize da DNA polimerase (DNA *slippage*) durante o processo de replicação e reparo, onde a DNA polimerase se dissocia da molécula de DNA e rapidamente se liga em uma posição diferente, podendo alterar (aumentar ou diminuir) o número de repetições (Oliveira *et al.*, 2006).



Os principais modelos teóricos sobre como ocorrem as mutações nos microssatélites são: o modelo SM (*stepwise mutation*), o IA (alelos infinitos) e o TP (*two phase*). O modelo SM tem sido bastante utilizado em análises de microssatélites e postula que a cada mutação se ganha ou perde apenas uma repetição, de modo que dois alelos que difiram por apenas uma repetição sejam mais relacionados do que alelos que difiram por várias repetições. Segundo o modelo IA um novo alelo é criado a cada mutação, sendo que altera o número de repetições aleatoriamente, nesse caso o número de repetições próximo não indica proximidade filogenética. O modelo TP é uma extensão do SM, de modo que considera a maioria dos eventos mutacionais aumentando ou diminuindo o loco em apenas uma repetição, no entanto, considera ainda que eventualmente possa ocorrer uma alteração de diversas repetições em um único evento (Jarne e Lagoda, 1996; Oliveira *et al.*, 2006). Este último modelo tem sido utilizado recentemente e é considerado por Di Rienzo *et al.* (1994) como o mais apropriado para a complexa evolução dos microssatélites.

Muitos organismos podem ser estudados por meio dos microssatélites como modelos para avaliar os efeitos da degradação do hábitat sobre a diversidade genética das espécies da Mata Atlântica. Um grupo de interesse a ser estudado são as aves, pois as principais ameaças são a perda e fragmentação de hábitats, captura excessiva, invasão de espécies exóticas e outros distúrbios recentemente considerados, como o aquecimento global (Marini e Garcia, 2005; BirdLife, 2008). Além disso, a revisão de 2008 acerca das espécies de aves ameaçadas identifica o Brasil como o país com maior número de aves ameaçadas no mundo (121 espécies) e as florestas tropicais

abrigam 43% das espécies de aves ameaçadas globalmente (IUCN, 2008; BirdLife, 2008).

Algumas famílias de aves têm sido documentadas como vulneráveis às alterações antrópicas, como ocorre com a família Dendrocolaptidae, com tendência a desaparecer em fragmentos muito impactados (Aleixo e Vielliard, 1995; Bornschein e Reinert, 2000). Poletto *et al.* (2004) analisaram as preferências ecológicas de cinco espécies dessa família (*Dendrocincla turdina*, *Sittasomus griseicapillus*, *Xiphocolaptes albicollis*, *Dendrocolaptes platyrostris*, *Xiphorhynchus fuscus*) e verificaram que *D.turdina* e *X. albicollis* possuem requerimentos ecológicos bem específicos, o que possivelmente seria a causa da sensibilidade dessas espécies a locais menos conservados.

Estudos genéticos, utilizando microssatélites, podem identificar se essas espécies vulneráveis, como as da família Dendrocolaptidae, a ambientes degradados, como é o caso da Mata Atlântica, estão sofrendo alterações em sua estrutura genética, perda de variabilidade, ocorrência de endogamia e suas conseqüências como a própria diminuição de diversidade genética, redução do tamanho efetivo populacional e eventos demográficos que possam afetar a sobrevivência das populações.

#### **1.4. Família Dendrocolaptidae**

Os arapaçus (Família Dendrocolaptidae) pertencem à ordem Passeriformes, subordem Suboscines, superfamília Furnarioidea (Sick, 1997). Os Furnarioidea possuem estrutura da siringe exclusivamente traqueal, chamada de *Tracheophonae*, que os distingue dos demais Passeriformes

(Sick, 1997). Essa superfamília é composta por mais três famílias além da Dendrocolaptidae, sendo que esta é considerada a mais especializada do grupo (Sick, 1997). Os Dendrocolaptidae incluem 52 espécies de arapaçus distribuídas em 13 gêneros, sendo sua distribuição restrita à região neotropical, ocorrem do sul do México ao norte da Argentina, com muitos exemplares brasileiros (42 espécies identificadas) (Raikow, 1994; Sick, 1997).

Em geral, as características diagnósticas dos arapaçus são os bicos compridos, estreitos e curvos que utilizam para forrageio em troncos de árvores, e retrizes rígidas encurvadas para dentro como garras que facilitam a sua subida e descida das árvores (Clench, 1995). O porte varia de pequeno a médio, com tamanho de 13,5 a 37 cm e peso de 12 a 120 g, a cor da plumagem possui tons de marrom com manchas ou listras e está relacionada à umidade do ambiente; o excesso de umidade aumenta a produção de melanina produzindo tons mais escuros (Clench, 1995).

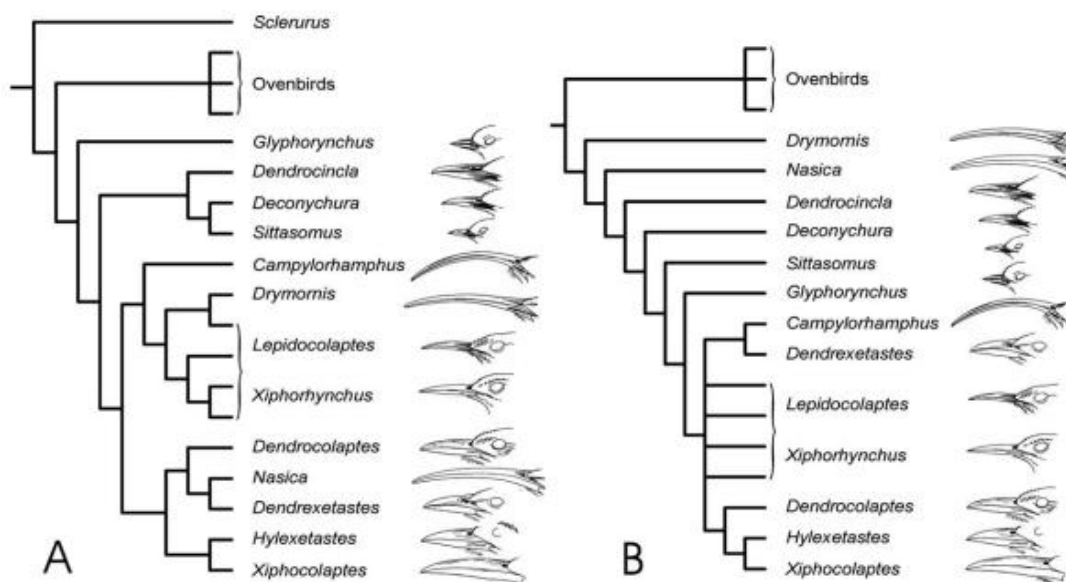
Utilizam fendas e ocos de árvores antigas ou feitos por pica-paus para nidificar e capturar alimento (Sick, 1997). Botam de 2 a 3 ovos brancos opacos e sem marcas que incubam em média 20 dias. A maioria dos arapaçus é insetívora, utilizando o bico como uma pinça para capturar suas presas, pois não conseguem perfurar a madeira. Podem formar bandos mistos (com outras espécies) para seguir as formigas de correição e capturar os animais afugentados (Marantz *et al.*, 2003). De acordo com Clench (1995), o hábito escansorial, utilização do solo e de estratos mais baixos pelos arapaçus, torna a ecologia, comportamento e morfologia similares entre as diversas espécies do grupo.

Muitas vezes os arapaçus são confundidos com os pica-paus pelo comportamento de escalar e bicar troncos, e pela convergência de retrizes, no entanto são grupos distantes filogeneticamente, pertencendo a ordens distintas. Os pica-paus constituem a família Picidae da ordem Piciformes, são cosmopolitas, sua plumagem é bastante colorida e exuberante, seus bicos são fortes e conseguem perfurar troncos, a língua é comprida e prostrátil, os pés são zigodáctilos (dois dedos voltados para frente e dois para trás) (Sick, 1997). Enquanto os arapaçus são neotropicais, de plumagem em tons de marrom, bicos frágeis incapazes de perfurar madeira, língua curta e fixa, pés anisodáctilos (três dedos para frente e um para trás) (Sick, 1997).

Segundo Irested *et al.* (2004), a filogenia de Dendrocolaptidae ainda não está bem definida, existindo incongruências entre os dados morfológicos (bico, narina, membro posterior, pé e cauda) e moleculares (intron II do gene da mioglobina). Ambas as filogenias suportam a monofilia do grupo, contudo há divergências sobre quais são os gêneros basais (Figura 2) e isto poderia ser apenas devido ao tipo de caráter utilizado, uma vez que a filogenia morfológica incluiu caracteres associados à locomoção e alimentação que podem aumentar os “ruídos” nos dados, pela possibilidade de convergência (homoplasia) (Raikow, 1994; Irested *et al.*, 2004).

As espécies de Dendrocolaptidae demonstram uma alta vulnerabilidade às alterações ambientais (Aleixo e Vielliard, 1995). De acordo com Sick (1997), o número em matas secundárias mais degradadas é reduzido, estando diretamente relacionado à menor quantidade de árvores maiores e antigas, o que diminui a existência de cavidades naturais ou feitas por pica-paus para que nidifiquem e durmam, bem como a menor disponibilidade de alimento. Marantz

*et al.* (2003) consideram que alta especialização ecológica dos membros dessa família torna-os susceptíveis a declínios populacionais e até mesmo extinções locais em áreas impactadas.



**Figura 2.** Relações filogenéticas dos gêneros dos arapaçus estimadas de (A) Dados moleculares (intron II da mioglobina e citocromo b) e (B) Dados morfológicos (modificado de Raikow, 1994). Retirado de Irested *et al.*, 2004.

#### 1.4.1. A espécie *Dendrocincla turdina* Lichtenstein

O gênero *Dendrocincla*, da família Dendrocolaptidae, inclui 6 espécies (*Dendrocincla tyrannina*, *D. fuliginosa*, *D. turdina*, *D. anabatina*, *D. merula* e *D. homochroa*). *D. turdina* já foi considerada como subespécie de *D. fuliginosa*, atualmente é considerada como espécie pela CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). As duas espécies se diferenciam pela cor da plumagem (*D. fuliginosa* possui asas, uropígio e cauda avermelhadas) e pela distribuição geográfica, de acordo com Sick (1997), *D. turdina* é o substituto de *D. fuliginosa* no sudeste do Brasil. A área de ocorrência descrita para *D. turdina* é do sul da Bahia por toda costa até o Rio Grande do Sul, estendendo-se para

o interior do país até o sul de Goiás, Paraguai e Argentina (Misiones) (Sick, 1997; Marantz *et al.*, 2003).

*D. turdina* é conhecida popularmente como arapaçu-liso, possui cor da plumagem castanho-oliváceo uniforme, garganta amarelo claro e retrizes levemente avermelhadas, porte médio de 19 a 21 cm e pesa de 31 a 45 g, seu bico é curto e reto (Marantz *et al.*, 2003) (Figura 3). O período de reprodução foi observado de novembro a janeiro, estimado pela observação de aves cantando e ninhos em ocos de árvores forrados de folhas e galhos contendo ovos (Marantz *et al.*, 2003).

O arapaçu-liso é principalmente insetívoro, capturando insetos em vôo, solo, sobre folhas, troncos ou no ar, também costuma forragear em associação com formigas de correição, capturando os insetos foragidos (Marantz *et al.*, 2003; Davis, 1946). Podem ainda formar bandos mistos para se alimentar, foram observados compondo mais de 10% dos bandos mistos da Reserva de Volta Velha (SC) (Ghizoni-Jr e Azevedo, 2005).



**Figura 3.** Espécime de arapaçu-liso (*D. turdina*). Foto gentilmente cedida por Gustavo Magnago

A espécie habita o sub-bosque da Mata Atlântica e estudos mostram uma tendência a evitar fragmentos florestais com intenso efeito de borda, bem como locais mais degradados (Poletto *et al.*, 2004; Bornschein e Reinert, 2000). *D. turdina* não é considerada como ameaçada pela IUCN; contudo, em uma lista de espécies ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul, feita em 2002, esta espécie foi classificada como criticamente em perigo no local (Marques *et al.*, 2002). Ribon *et al.* (2003) verificaram que esta foi a única espécie de ave a ser localmente extinta no sudeste de Minas Gerais (região de Viçosa), área intensamente fragmentada.

A sensibilidade de *D. turdina* a ambientes cuja estrutura da vegetação tem sido modificada por ações antrópicas faz com que o estudo dessa espécie seja importante sob o ponto de vista conservacionista, em particular na região da Mata Atlântica, sua área de ocorrência e bioma que vêm sendo degradado rapidamente. É possível que esta e outras espécies de hábitos similares estejam sofrendo drásticas modificações em sua estrutura populacional, assim um estudo genético com marcadores moleculares adequados pode fornecer dados para elaboração de estratégias conservacionistas mais robustas e eficientes para a espécie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação da variação genética presente em uma população do arapaçu-liso (*Dendrocincla turdina*) do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Caraguatatuba, região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar locos de microssatélites para *D. turdina*, cujo gênero ainda não possui nenhum loco descrito na literatura;
- Avaliar a diversidade genética dessa espécie em uma população de Caraguatatuba (SP), área de Mata Atlântica;
- Fornecer dados genéticos que possam contribuir com planos de conservação e manejo da espécie.

Considerando as características ecológicas desse grupo de aves e a significativa perda de hábitat ocorrida na Mata Atlântica, pretendeu-se investigar se há evidência de redução de variabilidade genética em *D. turdina*, na área de Caraguatatuba, localizada na maior área contínua dessa floresta.

Além disso, considerando o esforço despendido para prospecção de locos de microssatélites, pretendeu-se investigar se os locos isolados em *D.turdina* poderão ser úteis para estudos populacionais em espécies relacionadas e, portanto, contribuir com ferramentas genéticas que poderão ser utilizadas com propósitos conservacionistas.



### 3. JUSTIFICATIVA

A Mata Atlântica possui uma megadiversidade e alta taxa de endemismo nos mais variados táxons, e a intensa perda de hábitat a torna um local prioritário para conservação (Mittermeier *et al.*, 1998). Marini e Garcia (2005) estimam que 75,6% das espécies de aves ameaçadas e endêmicas do Brasil se encontram nesse bioma. Uma das três prioridades globais de conservação propostas pela IUCN é a diversidade genética dos organismos, que pode ser estudada por diversos marcadores moleculares. Dentre eles, os microssatélites possuem características que nos permitem realizar uma boa avaliação populacional (Haig, 1998; Oliveira *et al.*, 2006).

Estudos genéticos de *D. turdina*, além dos estudos ecológicos que têm sido feitos, são necessários para avaliar a diversidade das populações dessa espécie e verificar como se encontram estruturadas geneticamente. A compreensão de como a variabilidade genética está distribuída dentro e entre as populações pode contribuir com propostas de conservação (Haig, 1998), uma vez que o potencial evolutivo de uma espécie depende da existência de variação genética, possibilitando a capacidade de adaptação a mudanças ambientais (Templeton *et al.*, 2001).

A análise da biodiversidade molecular de espécies em habitats criticamente ameaçados, como a Mata Atlântica, pode ser útil para planos de conservação e manejo, auxiliando no reconhecimento e caracterização de áreas com maiores recursos genéticos, de modo a preservar a maior variabilidade possível (Francisco *et al.*, 2007).

## 4. METODOLOGIA

No presente estudo foram utilizadas amostras de sangue de 27 indivíduos de *D. turdina* pertencentes a uma população do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Caraguatatuba (SP) (23°35'S, 45°25'W). O núcleo de Caraguatatuba localiza-se no maior contínuo de Mata Atlântica, é uma área de 88000 ha, com aproximadamente 30 a 50 m de altitude. O sangue foi coletado com EDTA e armazenado em etanol 100% a -20°C.

### 4.1. Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada pela técnica de tampão salino (Aljanabi e Martinez, 1997) com modificações. Aproximadamente 30 µl de sangue foram colocados em um tubo de 1,5 ml com auxílio de micropipeta, a seguir foi adicionada a solução de digestão (NaCl 0,4M; Tris-HCl 10mM pH=8,0 e EDTA 2mM pH=8,0), SDS 2% e 400 µg/ul proteinase K. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C por duas horas sendo homogeneizadas a cada 30 minutos. Após esse período foram adicionados 300 µl de NaCl 6M, agitado em vortex por 30 segundos e centrifugado por 30 minutos a 10000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foram adicionados aproximadamente 700 µl de isopropanol 100% para precipitação do DNA e centrifugado por 20 minutos a 10000g. O *pellet* formado foi lavado com 300 µl de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 10000g. Finalmente o DNA foi seco em estufa 37°C para eliminar o etanol e ressuspendido em 100 µl de água MilliQ.

O DNA foi quantificado visualmente utilizando o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador de luz UV. Após a quantificação foram feitas alíquotas a 50 ng/μl de todas as amostras.

#### **4.2. Prospecção de microssatélites**

O isolamento dos microssatélites foi feito de acordo com o protocolo de Hamilton *et al.* (1999) modificado, pelo qual foi construída uma biblioteca genômica parcial enriquecida. Uma amostra de DNA a 200 ng/μl foi clivada com as enzimas de restrição *Rsal* e *BstUI*, os fragmentos com tamanho entre 200 e 1000 pb foram cortados de gel de agarose 0,8% e eluídos com o *kit* de purificação *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Os fragmentos digeridos foram ligados a oligonucleotídeos de sequências conhecidas (*linkers*), os *linkers* permitiram a realização de PCR e posteriormente a ligação a vetores para clonagem. Os fragmentos replicados via PCR foram hibridizados com as sondas de oligonucleotídeos biotinizados: (AAAC)<sub>6</sub>, (AAAG)<sub>6</sub>, (AATC)<sub>6</sub>, (AATG)<sub>6</sub>, (ACCT)<sub>6</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>, (ACTC)<sub>6</sub> e (AATC)<sub>6</sub>. Os fragmentos que hibridizam com as sondas são os que possivelmente contêm os microssatélites. A seguir foram feitas lavagens em uma solução com partículas paramagnéticas ligadas a uma molécula de estreptavidina, a qual se liga à biotina. Os fragmentos hibridizados foram então separados com uma coluna magnética. Foi realizada uma nova PCR utilizando os fragmentos enriquecidos de microssatélites para aumentar a quantidade de fragmentos e então foi iniciado o processo de clonagem. O DNA enriquecido foi ligado a

vetores utilizando o *kit pGem-T Easy Vector* (Promega), pelo qual preparamos uma solução contendo 3 µl do DNA enriquecido, 1 µl do vetor (plasmídeo), 1 µl da enzima T4 DNA ligase, 5 µl de tampão e deixamos por 14h a 4°C. O vetor recombinante (contendo o DNA enriquecido) foi inserido em células competentes da linhagem DH5α de *Escherichia coli* por choque térmico, as quais foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (0,1 mg/ml), X-Gal 2% e IPTG 2,3%. As bactérias cresceram por 15h a 37°C, os clones positivos foram selecionados para crescimento das colônias em meio de cultura CG com ampicilina por 24h a 37°C. A seguir os plasmídeos contendo os fragmentos clonados foram extraídos das bactérias e enviados para seqüenciamento.

#### **4.2.1. Identificação de microssatélites e construção dos *primers***

O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI3730XL pela empresa MacroGen Inc (Coréia do Sul) e a qualidade do seqüenciamento foi verificada pelo programa KB<sup>TM</sup> Basecaller (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram analisadas por duas estratégias: uma utilizando os programas Gene Runner<sup>1</sup>, Tandem Repeats Finder (TRF)<sup>2</sup>, Primer 3<sup>3</sup> e Integrated DNA Technologies (IDT)<sup>4</sup>, e outra utilizando apenas o programa CID<sup>5</sup> (Freitas *et al.*, 2008) e IDT.

O programa Gene Runner permite a identificação das seqüências utilizadas para ligar o DNA ao vetor na clonagem, e possibilita a eliminação dos pares de base pertencentes ao plasmídeo, restando apenas a seqüência de

---

Disponível em: <sup>1</sup> [www.generunner.com](http://www.generunner.com); <sup>2</sup> <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>;  
<sup>3</sup> <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; <sup>4</sup> [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com); <sup>5</sup> [www.shrimp.ufscar.br/cid](http://www.shrimp.ufscar.br/cid).

interesse. A seqüência limpa foi analisada no programa TRF para identificação das que continham microssatélites, destas analisamos quais possuíam uma região flanqueadora ao microssatélite em que pudesse ser construído um *primer*.

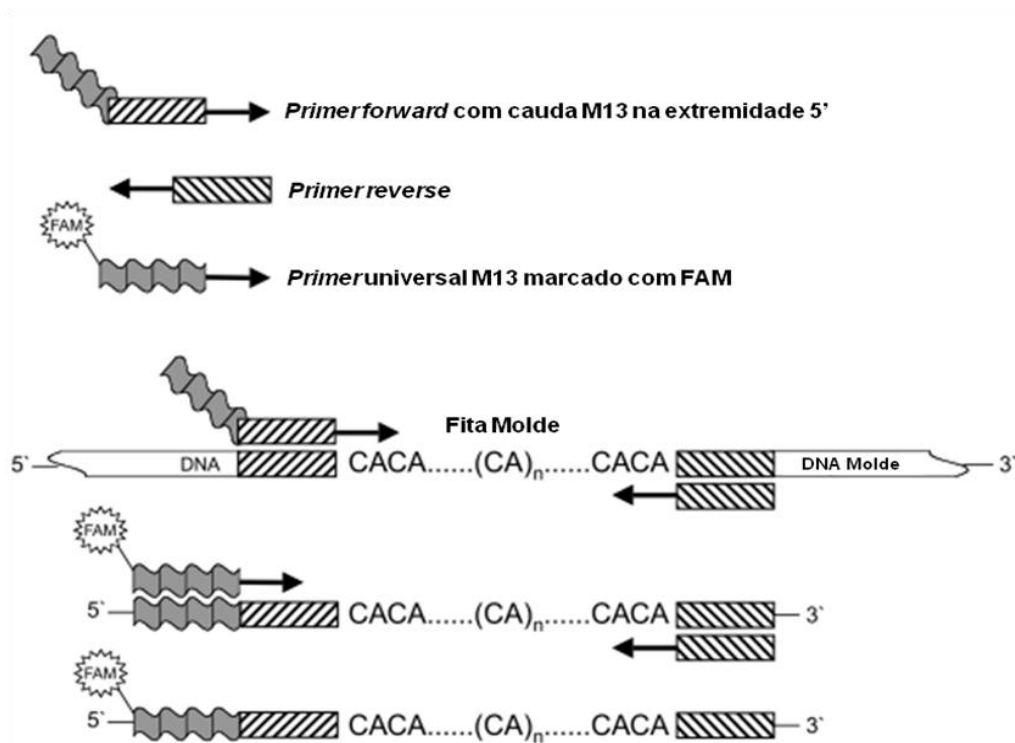
Os *primers* foram construídos pelo programa Primer3 com os seguintes parâmetros: tamanho médio de 20 pb, Tm média de 55°C e diferença máxima de 3°C entre os pares, conteúdo de GC mínimo de 40% e máximo de 60%, possuir GC no ponto de ancoragem. Dos *primers* construídos foi analisada a possibilidade de ocorrer *hairpin*, auto e hetero-dímeros pelo programa IDT.

Finalmente as seqüências com microssatélites e *primers* desenhados foram analisadas par a par no Blast (Altschul *et al.*, 1990) para certificar que não havia identidade entre elas.

O programa CID é um compilado de programas que realiza a maioria das análises descritas na estratégia anterior, além de verificar a qualidade do eletroferograma gerado no seqüenciamento por meio do programa Phred. Retira as seqüências dos vetores usados na clonagem, identifica os possíveis microssatélites e constrói pares de *primers* (com os mesmos parâmetros descritos para o Primer 3) para as seqüências com microssatélites identificados, os quais então foram analisados pelo programa IDT e pelo Blast da mesma forma descrita anteriormente.

Para a síntese dos *primers* foram adicionados 18 pb, chamados de cauda M13 (3' TGTAACGACGGCCAGT 5'), na extremidade 5' de um dos *primers* do par. Essa cauda M13 possibilita a utilização da técnica proposta por Schuelke (2000) para uma amplificação mais econômica utilizando *primers* marcados com fluorescência para genotipagem. A metodologia consiste em

utilizar um *primer* com a mesma seqüência universal M13 na cauda do *primer* específico e no *primer* marcado com fluorescência, de modo que o *primer* marcado com fluorescência, de alto custo, pode ser utilizado para todos os *primers* dos outros locos. Na Figura 4 está ilustrado o esquema de amplificação realizado.



**Figura 4.** Esquema de amplificação, retirado de Schuelke (2000).

### 4.3. Amplificação e genotipagem dos locos de microssatélites

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com volume final de 10  $\mu$ l contendo solução tampão 1X, 0,25 mM de dNTPs, 0,8 pmol do *primer* M13 com fluorescência FAM ou NED, 0,8 pmol do *primer* sem a cauda, 0,2 pmol do *primer* com a cauda M13, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 5 ng de DNA (50 ng/ $\mu$ l) e 0,5U de Taq Platinum (Invitrogen). Inicialmente foi realizado um gradiente de temperatura para determinar qual era

a temperatura ideal de anelamento para cada par de *primers*. Uma vez determinadas essas temperaturas, foi realizada a PCR para todos indivíduos da população para cada loco com a temperatura mais adequada a cada par de *primer*. Os ciclos utilizados na PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a temperatura específica do par de *primers* por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos. A seguir iniciaram-se ciclos com a temperatura ideal de anelamento da seqüência da cauda M13 para aumentar a eficácia de sua hibridação aos produtos da PCR, sendo 8 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, extensão final a 72°C por 10 minutos e mantido a 4°C até armazenamento em freezer -20°C.

Os produtos obtidos pela PCR foram analisados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz UV, sendo utilizado um marcador de peso molecular de 1Kb para verificar o tamanho dos fragmentos. Este gel possibilitou a verificação da amplificação satisfatória das amostras para genotipagem, bem como uma análise prévia da existência de polimorfismo para o loco em questão. Mesmo os locos que não apresentaram polimorfismo no gel foram genotipados para pelo menos 3 indivíduos para confirmar se de fato não era polimórfico.

Os fragmentos amplificados com a fluorescência foram genotipados em um seqüenciador automático MegaBace pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil) e analisados com o programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science). Os genótipos de locos polimórficos obtidos foram utilizados para a realização das análises estatísticas.

#### 4.4. Análises estatísticas

O programa GENEPOP 4.0 (Raymond e Rousset, 1995; Rousset, 2008) foi utilizado para estimar as frequências alélicas, as heterozigosidades esperada e observada, a ocorrência de desequilíbrio de ligação para cada par de locos e a ocorrência de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco foram calculadas por teste de probabilidade e para a população foi realizado um teste para verificar deficiência de heterozigotos.

O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foi calculado com auxílio do programa FSTAT (Goudet, 1995), que utiliza o método de variância de Weir & Cockerham (1984). Para as análises múltiplas do GENEPOP e do FSTAT, os valores de P foram corrigidos pela correção seqüencial de Bonferroni (mantém o valor de  $\alpha=0,05$ ). Para locos que após a correção ainda apresentassem desvios foi utilizado o programa Micro-Checker (Oosterhout *et al.*, 2004) para identificar a possível causa das diferentes proporções encontradas para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O programa BOTTLENECK (Piry *et al.*, 1999) foi utilizado para verificar a existência de eventos demográficos recentes, como gargalo populacional. Foi realizado o teste de Wilcoxon, que pode ser utilizado para menos de 20 locos e possui alto poder estatístico, utilizando o modelo de mutação TP estabelecido com 30% para o modelo IA e 70% para o SM.



#### 4.5. Sexagem molecular

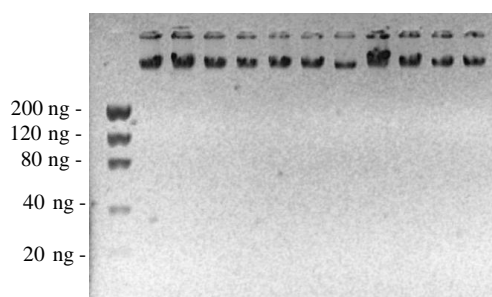
Foi realizada a sexagem molecular dos indivíduos segundo Griffiths *et al.* (1998), com modificações. Foram utilizados os *primers* P2 (5` TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT 3`) e P8 (5`CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG 3`) que amplificam um intron do gene CHD (*chromobox-helicase-DNA-binding*) presente nos cromossomos sexuais Z e W de aves, o intron possui tamanhos diferentes em cada cromossomo. Como as fêmeas são o sexo heterogamético, irão apresentar duas bandas de tamanhos diferentes e o macho apenas uma. A razão sexual foi calculada pelo teste de qui-quadrado para a proporção esperada de 1:1 pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 1998).

#### 4.6. Amplificação cruzada

Para testar a capacidade de amplificação dos locos descritos neste trabalho em espécies relacionadas, utilizamos dois gêneros diferentes da família Dendrocolaptidae: *Xiphorhynchus fuscus* (arapaçu-rajado) e *Sittasomus griseicapillus* (arapaçu-verde). Foram realizadas PCRs com as mesmas condições padronizadas neste trabalho para os locos descritos, e os resultados foram analisados em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

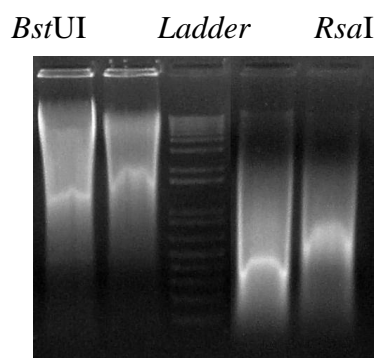
## 5. RESULTADOS

A concentração de DNA obtida da extração das amostras foi estimada em aproximadamente 200 ng/ $\mu$ l para todas as 27 amostras. A Figura 5 abaixo ilustra 11 das extrações em gel de quantificação comparadas ao marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).



**Figura 5.** Quantificação do DNA extraído de *D. turdina*.

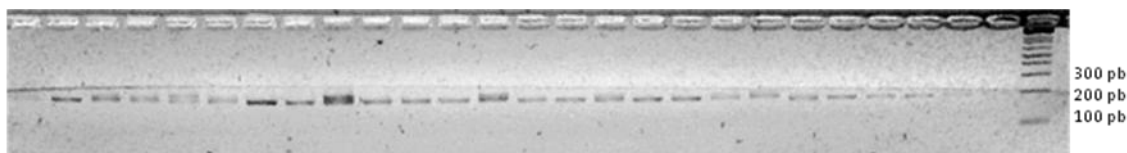
No isolamento de microssatélites as duas enzimas de restrição digeriram as amostras utilizadas. O resultado mais satisfatório foi obtido com a enzima *RsaI*, com mais fragmentos no intervalo de 200 a 1000 pb, tamanho não muito grande para prejudicar a clonagem e nem muito pequeno para não haver região flanqueadora à seqüência de microssatélite, como pode ser observado na Figura 6.



**Figura 6.** Digestão do DNA extraído com as enzimas *BstUI* (esquerda do *ladder*) e *RsaI* (direita do *ladder*), em gel de agarose 0,8%.

Foram selecionadas 96 colônias, obtidas pela construção da biblioteca genômica parcial de *Dendrocincla turdina*, para seqüenciamento. Destas, 21 (21,87%) continham sequências de microssatélites, sendo apenas duas delas grandes demais para a construção de *primers* em suas regiões flangeadoras. Portanto, obtivemos 19 locos com microssatélites e *primers* desenhados. O tamanho dos clones variou de 146 a 300 pb. Todos microssatélites encontrados foram do tipo perfeitos, com motivos do tipo dinucleotídeo (5,26%), tetranucleotídeo (89,48%) e pentanucleotídeo (5,26%) repetidos no mínimo 4 e máximo 29 vezes (Tabela 1).

A temperatura ótima de anelamento variou de 51°C a 63°C. Os 19 locos foram amplificados e verificados em gel de agarose 3% para visualização prévia de polimorfismo e amplificação antes da genotipagem (Figura 7). Dos 19 locos, 11 apresentaram-se polimórficos na população em estudo (Dft 01, Dft 02, Dft 04, Dft 05, Dft 06, Dft 07, Dft 09, Dft 10, Dft 11, Dft 12 e Dft 16). O tamanho dos alelos dos locos polimórficos variou de 143 a 354 pb. As sequências de todos *primers* utilizados (polimórficos e monomórficos para a população) encontram-se na Tabela 1.



**Figura 7.** Amplificação do loco Dft01 em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

**Tabela 1.** Nome do loco, sequências dos *primers* (5' → 3'), motivo e número de repetições, temperatura de anelamento do par de *primers* (Ta°C) e amplitude do tamanho dos alelos (pb).

Loco	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')	Motivo	Ta (°C)	Amplitude (pb)
Dft 01	F: AGCGAGGTAGCATATATTGG R: GTGGGAAAAACTGCTTTATG	(ATGA) <sub>6</sub>	56°C	185-213
Dft 02	F: TTTTGTGAAGCTGTGTATGG R: CCTCAGTTTAGAAAGGGTCTC	(TTTG) <sub>5</sub>	56°C	196-204
Dft 03	F: GTTTGTGAGTCTTCTTTGGTG R: AAGGCCTAGCTAGCAGATTC	(TG) <sub>6</sub>	55°C	242*
Dft 04	F: TGGTAGTCTCTACCCCAGTC R: ATGACAGTGAAGGACAGACG	(TTGT) <sub>4</sub>	53°C	174-176
Dft 05	F: GAAAAACAGTCTGCTTCAGG R: TCTGAGCTCTGCTACTGACC	(AGGA) <sub>18</sub>	53°C	143-249
Dft 06	F: TTGTCTGTTTGCATCTTCTG R: TTAGCAAGAGAGAACCCATC	(GAAT) <sub>5</sub>	53°C	231-243
Dft 07	F: CAAGCTACCAATGTGAAGTG R: CCATGTTGAAACAACAAAGC	(TTGT) <sub>5</sub>	53°C	265-273
Dft 08	F: AGACATAGATGCACATCAGC R: CTATTCCTCCATGCTTGTG	(AAAC) <sub>4</sub>	51°C	232*
Dft 09	F: TCCCAAATAAGGAAAGAAGG R: GAGAATTCCTCCCTATGAC	(CATA) <sub>4</sub>	51°C	219-223
Dft 10	F: TTATTGTCCACAGAGGGAAG R: AGTGTGTGGTTGGTGTCAG	(TGAT) <sub>5</sub>	53°C	182-190
Dft 11	F: ATTGCTCACAGAAAAGATGG R: CTTGTCACCAACCTCAGTTC	(CAAA) <sub>5</sub>	60°C	254-258
Dft 12	F: GTTTTCATAGGCTGGTTGAG R: TCTTCATTTGCTTTACTCC	(AAAAG) <sub>29</sub>	60°C	289-354
Dft 13	F: AAGATTTTGGCTTGTCTGAG R: AAAACATGCTGGTTCAAGAC	(TTTG) <sub>8</sub>	60°C	175*
Dft 14	F: GACTTGCCTTACCTTCAGTG R: TGTCACCCTATTCATTTGTG	(TGTT) <sub>5</sub>	60°C	146*
Dft 15	F: ATGCAAACACCCTACAAGAC R: AGATCTGAGGGTGACACTTG	(AAAC) <sub>5</sub>	60°C	218*
Dft 16	F: TTTACCAGTTGGAGAGAAGG R: TGGATGGATATTATGTGCAG	(TTTG) <sub>4</sub>	63°C	191-195
Dft 17	F: GTTGGTTAGTTTCAGGTTGG R: ATCTGGGAGGGTAGTCTGAG	(TTTG) <sub>5</sub>	60°C	212*
Dft 18	F: CCACTTCCTAATGGAACAAG R: TCTGTGTATCTCTCAGGATGG	(GTTT) <sub>5</sub>	60°C	152*
Dft 19	F: CAGCTCCAGTTACCTCTCAC R: ATCTCACTTTTTGGGGATG	(CAAA) <sub>4</sub>	60°C	202*

\* Tamanho estimado pelo clone sequenciado e análise da amplificação em gel de agarose 3%.

O número de alelos encontrados após a genotipagem para os locos polimórficos variou de 2 a 16 e a riqueza alélica estimada pelo programa FSTAT variou de 2 a 16. A heterozigosidade observada variou de 0,07 a 0,80 e a heterozigosidade esperada variou de 0,08 a 0,91 (Tabela 2).

O loco Dft12 apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg mesmo após a correção seqüencial de Bonferroni, e, portanto, foi excluído de todas as demais análises, incluindo os valores médios de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade média esperada e observada. O programa Micro-Checker indicou a possível presença de alelos nulos para o loco Dft12.

Nenhum dos locos se apresentou em desequilíbrio de ligação após a correção seqüencial de Bonferroni (Apêndice A).

O valor do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foi calculado para cada loco separadamente e para a população (todos os locos, exceto o Dft12), os resultados encontram-se na Tabela 2. A população não apresentou  $F_{IS}$  significativamente diferente de zero (valor  $P= 0,4368$ ) (Tabela 2).

O programa BOTTLENECK evidenciou um possível gargalo populacional, uma vez que obtivemos um valor significativo ( $p<0,05$ ) no teste de Wilcoxon.

Por meio da sexagem molecular realizada, 12 machos e 14 fêmeas foram identificados, um indivíduo falhou na amplificação e não pôde ser sexado. Pelo teste de qui-quadrado não foi observado desvio da proporção esperada de 1:1 ( $p=0,8445$ ).

**Tabela 2.** Nome do loco, número de alelos (NA), riqueza alélica (RA), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), valor de P para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e valor do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) com seu valor de P. Os valores de P apresentados na tabela estão com correção seqüencial de Bonferroni.

Loco	NA	RA	Ho	He	EHW	$F_{IS}$	
						Valor P	Valor P
Dft01	6	5,85	0,52	0,48	0,8302	-0,067	0,8077
Dft02	3	2,99	0,55	0,49	0,5665	-0,140	0,8614
Dft04	2	2,00	0,07	0,14	0,1121	0,475	0,1198
Dft05	16	16,00	0,80	0,91	0,1298	0,125	0,0516
Dft06	3	2,92	0,37	0,38	0,2961	0,028	0,4699
Dft07	3	3,00	0,44	0,39	0,6106	-0,132	0,8542
Dft09	2	2,00	0,18	0,17	1,0000	-0,083	1,0000
Dft10	3	2,92	0,11	0,14	0,1121	0,220	0,1096
Dft11	2	2,00	0,29	0,25	1,0000	-0,156	1,0000
Dft12**	11	10,92	0,44	0,90	0,0000*	0,509	0,0099*
Dft16	2	2,00	0,07	0,08	1,0000	-0,021	1,0000
Média/Total	4,2	4,17	0,34	0,34	0,1931	0,004	0,4368

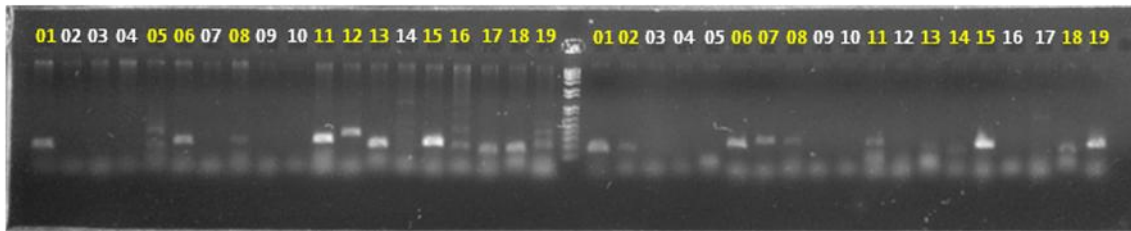
\*valor significativo ( $p < 0.05$ )

\*\*loco não utilizado em nenhuma estimativa de Média/Total da tabela.

O teste de amplificação cruzada em outras duas espécies da mesma família, *X. fuscus* (arapaçu-rajado) e *S. griseicapillus* (arapaçu-verde), foi positivo para 12 locos no *X. fuscus* e 11 locos no *S. griseicapillus* (Tabela 3) (Figura 7).

**Tabela 3.** Espécies testadas para amplificação dos locos, o sinal "+" indica que houve amplificação e o sinal "-" que o loco não foi amplificado com sucesso na espécie.

	Dft01	Dft02	Dft03	Dft04	Dft05	Dft06	Dft07	Dft08	Dft09	Dft10
<i>D. turdina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>X. fuscus</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>S. griseicapillus</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	Dft11	Dft12	Dft13	Dft14	Dft15	Dft16	Dft17	Dft18	Dft19	
<i>D. turdina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>X. fuscus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
<i>S. griseicapillus</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	



**Figura 7.** Teste de amplificação cruzada em gel de agarose de 3% corado com brometo de etídeo; à esquerda encontra-se a espécie *X. fuscus* e à direita *S.griseicapillus*. Os números representam os dezenove locos, em amarelo os de amplificação positiva e em branco os que não amplificaram.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Prospecção de microssatélites

Em uma revisão sobre isolamento de microssatélites, Zane *et al.* (2002) observaram uma baixa porcentagem de clones positivos em aves, ou seja, que continham microssatélites. Foi verificada uma tendência de 2-3% de clones positivos para a maioria dos táxons estudados, à exceção de aves que demonstrou uma porcentagem muito menor de microssatélites. A porcentagem de clones positivos com microssatélites foi maior do que 21% no presente estudo. A maior eficiência obtida pode ser devido ao aprimoramento dos métodos de prospecção nos últimos anos, utilizando as bibliotecas enriquecidas, e a padronização realizada em nosso laboratório. Por exemplo, Francisco *et al.* (2004) obteve 22% de clones positivos e onze locos polimórficos do passeriforme *Chiroxiphia caudata*.

Muitos trabalhos sugerem que o genoma de aves tem menos locos de microssatélites em relação a outros organismos como, por exemplo, mamíferos (Primmer *et al.* 1997; Neff e Gross, 2001). Primmer *et al.* (1997) relacionam o tamanho reduzido do genoma das aves com a baixa quantidade de locos microssatélites, pois a densidade gênica mais alta do genoma tem por consequência um número menor de regiões não-codificantes, reduzindo as oportunidades de microssatélites evoluírem.

No entanto, Neff e Gross (2001) descartam essa hipótese de correlação positiva entre tamanho do genoma e número de microssatélites, já que algumas espécies de peixes, por exemplo, têm o genoma muito menor do que



o das aves e consideravelmente mais microssatélites. De fato, o genoma de aves é reduzido em relação a vários outros organismos, e foi proposto que seria devido a restrições impostas pelo vôo, como é observado em morcegos que têm o seu genoma muito menor e com menos microssatélites do que outros mamíferos (Van den Bussche *et al.* 1995).

Além dessa teoria, é sabido que em aves há menos elementos do tipo SINE e LINE em relação aos mamíferos e, quando presentes, não possuem a comum cauda poli A, que é tida como um precursor para o surgimento de microssatélites simples. Deste modo, é provável que a menor quantidade de microssatélites deve ser uma característica classe-específica ou ainda relacionada à menor quantidade de elementos precursores como a cauda poli A e não ao tamanho do genoma (Primmer *et al.* 1997; Neff e Gross, 2001).

Embora os microssatélites sejam marcadores amplamente utilizados para análises populacionais, diversas espécies não possuem nenhum marcador disponível para estudo. A realização de amplificação cruzada nem sempre é possível, já que muitas vezes é necessário que sejam espécies próximas para uma amplificação eficaz. Além disso, é difícil prever se um determinado conjunto de *primers* terá sucesso na amplificação e será polimórfico (Galbusera *et al.* 2000; Primmer *et al.* 2005). Assim, apesar de a prospecção de microssatélites ser um procedimento demorado e caro, ainda é um método fundamental para a obtenção de marcadores espécie-específicos e aumento do número de possíveis marcadores para estudos em amplificação cruzada. Nosso trabalho identificou e caracterizou onze locos polimórficos para uma espécie de ave em que não há nenhum loco descrito até o momento.

## 6.2. Caracterização populacional de *D. turdina*

A população de arapaçu-liso da região de Caraguatatuba apresentou de dois a 16 alelos e heterozigosidade média esperada igual à observada de 0,34. Em outros estudos de isolamento de microssatélites realizados com passeriformes foi obtida uma amplitude similar de alelos, sendo que Milá e Bardeleben (2005) obtiveram de 8 a 20 alelos para o *Glyphorhynchus spirurus* (arapaçu-bico-de-cunha) e heterozigosidade média observada e esperada de 0,52 e 0,79, respectivamente. Em outro trabalho com passeriforme de sub-bosque, a espécie *Chiroxiphia caudata*, Francisco *et al.* (2004) encontraram de 4 a 22 alelos com heterozigosidade observada média de 0,75 e esperada média de 0,82.

A heterozigosidade média esperada, ou diversidade gênica de Nei (1987), encontrada neste estudo foi relativamente baixa em comparação com outros passeriformes (Tabela 4). Esta medida da variação genética é considerada em estudos de conservação, pois de acordo com Frankham (2003) a perda dessa diversidade associada ao endocruzamento aumenta o risco de extinção em populações naturais. Uma das possíveis causas para a perda da diversidade são os gargalos populacionais, nos quais uma população que sofre uma redução do seu tamanho efetivo exibe uma diminuição de heterozigosidade nos locos polimórficos correlacionada com diminuição do número de alelos (Piry *et al.*, 1999).

A análise deste evento demográfico pelo programa BOTTLENECK evidenciou a possível ocorrência de uma redução populacional recente para dez locos da população de *D. turdina* aqui estudada, utilizando o modelo de

mutação TP (*two-phase*). Este resultado é corroborado pelo valor de diversidade gênica obtido, que é menor em comparação a outros passeriformes e a princípio poderia indicar uma redução no potencial evolutivo pela perda de variabilidade (Spencer *et al.*, 2000, Templeton *et al.*, 2001). No entanto, este possível gargalo populacional não necessariamente afeta a viabilidade da população, uma vez que outras variáveis precisam ser consideradas, como por exemplo, o tamanho efetivo e endocruzamento na população.

**Tabela 4.** Nome do autor do trabalho, espécie estudada, nome popular da espécie, número de alelos encontrados (NA), heterozigiosidade média observada (Ho) e média esperada (He).

Autor	Espécie	Nome popular	NA	Ho	He
presente estudo	<i>Dendrocincla turdina</i>	Arapaçu-liso	2 a 16	0,34	0,34
Milá e Bardeleben, 2005	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>	Arapaçu-de-bico-de-cunha	8 a 20	0,52	0,79
Francisco <i>et al.</i> , 2004	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Tangará-dançarino	4 a 22	0,75	0,82
Corrêa <i>et al.</i> , 2009	<i>Neothraupis fasciata</i>	Tiê-do-cerrado	2 a 18	0,45	0,54
Bardeleben, 2004	<i>Andropadus virens</i>	Bulbul pequeno	2 a 15	0,53	0,66
Bardeleben <i>et al.</i> , 2005	<i>Sericornis magnirostris</i>	Large-bill scrubwren	4 a 15	0,56	0,79
Dowling <i>et al.</i> , 2003	<i>Petroica goodenovii</i>	Red-capped robin	2 a 20	0,48	0,57
Gibbs <i>et al.</i> , 1999	<i>Catharus ustulatus</i>	Sabiá de óculos	7 a 20	0,81	0,83
Stenzler e Fitzpatrick, 2002	<i>Aphelocoma coerulescens</i>	Gaio dos arbustos	3 a 15	0,52	0,59
Chan <i>et al.</i> , 2008	<i>Pomarea dimidiata</i>	Monarca de Rarotonga	3 a 5	0,66	0,63

O tamanho populacional efetivo é difícil de ser estimado, pois é influenciado por diversos fatores como razão sexual, oscilações no tamanho populacional, sistema de cruzamento dentro da população, variações de fertilidade dos gametas (Awise, 2004). E, apesar dos modelos teóricos sobre o número efetivo mínimo para manter uma população, ainda não se sabe quão severo precisaria ser um gargalo populacional para, de fato, ter consequências drásticas na viabilidade de uma população natural (Briskie e Mackintosh, 2004).

O endocruzamento pode ser medido pelo déficit de heterozigotos em uma população, e pode afetar negativamente a sobrevivência e reprodução, o que é chamado de depressão endogâmica (Frankham, 2002). No presente estudo, o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) não foi significativamente diferente de zero, portanto, a população possivelmente não se encontra sob os efeitos deletérios da endogamia.

Segundo Dantas *et al.* (2009) quando a razão sexual é desigual pode ocorrer perda de variabilidade genética e conseqüente diminuição da viabilidade da população a longo prazo. A razão sexual pode ser alterada pelo tipo de sistema de acasalamento, diminuição do tamanho populacional, mecanismos de determinação do sexo, caça diferenciada entre machos e fêmeas (Frankham *et al.*, 2002). Neste estudo não foram evidenciados desvios da proporção esperada de 1:1, ou seja, não há indicação que haja desvio na razão sexual desta população.

O loco Dft12 apresentou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e, portanto, foi excluído das análises da população. Os desvios do equilíbrio podem ser causados por efeito Wahlund, endocruzamento, acasalamento preferencial, seleção, ou ainda por erros associados às análises (erros na PCR) como alelos nulos, alelo *drop-out* ou presença de *stutters* (Osterhout *et al.*, 2004; Selkoe e Toonen, 2006). Foi observado um déficit de heterozigotos significativo, evidenciado pelo valor do  $F_{IS}$  ser positivo e significativo. O valor significativo do  $F_{IS}$  para este loco pode ser um demonstrativo de acasalamento preferencial por iguais, uma vez que afeta apenas este loco e não toda a população para caracterizar endogamia (Templeton, 2006). Ou ainda, a possível causa para os desvios observados, identificada pelo programa Micro-

Checker, poderia ser a existência de alelos nulos, que são comuns em microsatélites devido a sua alta taxa de mutação, impedindo que o *primer* se ancore a região flanqueadora mutada e não amplifique o alelo (Selkoe e Toonen, 2006). Em qualquer caso haveria diminuição da precisão e acurácia das análises genéticas se o loco Dft12 fosse considerado nesta população.

Considerando os resultados de diversidade gênica, gargalo populacional, do coeficiente de endocruzamento e razão sexual, é possível que a presente população de *D. turdina* tenha sofrido uma redução em seu tamanho populacional, podendo ter acarretado uma redução na heterozigosidade, se comparada a outros passeriformes já estudados, porém não há evidência de endocruzamento, que seria esperado em populações pequenas.

Estudos futuros em outras áreas/populações com características similares ao Parque Estadual da Serra do Mar – núcleo Caraguatatuba, poderão confirmar a ocorrência de gargalo em resposta a um possível e significativo efeito de borda causado pela redução de hábitat.

### **6.3. Amplificação cruzada dos marcadores desenvolvidos**

Os marcadores microsatélites, apesar de muito vantajosos para análises populacionais, também possuem alguns inconvenientes como o fato de os *primers* descritos serem muito específicos (Selkoe e Toonen, 2006). A região de anelamento do *primer* precisa ser muito conservada, com poucas, ou nenhuma mutação que impeçam a ancoragem e amplificação do loco de microsatélite. No entanto, como foi discutido anteriormente, a prospecção de

novos locos espécie-específicos é um processo relativamente demorado e custoso, de modo que se obtivermos um conjunto de *primers* capaz de amplificar com sucesso em outras espécies ou grupos taxonômicos é uma importante contribuição para futuras análises populacionais.

Um estudo de amplificação cruzada em passeriformes, utilizando 40 locos em 13 espécies, obteve 39% de locos que amplificaram e eram polimórficos (Galbusera *et al.*, 2000). O trabalho demonstrou ainda que a proporção de locos amplificados e polimórficos aumentava à medida que diminuía a distância filogenética. Primmer *et al.* (2005) propuseram que fosse feita uma estimativa da distância genética utilizando o citocromo b entre as espécies que se quer realizar amplificação cruzada, e utilizar as mais próximas para testar os locos de microssatélites. Além disso, a diminuição da temperatura de anelamento aumentou o sucesso de amplificações cruzadas e houve uma correlação positiva entre a presença de polimorfismo na espécie fonte de locos e a presença de polimorfismo para estes mesmos locos amplificados em outra espécie (Primmer *et al.*, 2005).

A amplificação cruzada em duas espécies pertencentes à mesma família de *D. turdina* (Dendrocolaptidae) evidenciou que 36,8% dos locos utilizados amplificaram com sucesso em ambas as espécies *X. fuscus* e *S. griseicapillus*. *X. fuscus* teve 63,15% de amplificações bem sucedidas e *S. griseicapillus* 57,9%, corroborando a premissa de Primmer *et al.* (2005) de escolher locos de espécies filogeneticamente próximas para testar a amplificação cruzada.

Os marcadores produzidos neste trabalho foram úteis para as análises populacionais de *Dendrocincla turdina* e a caracterização realizada até o momento neste trabalho permitiu uma compreensão da diversidade genética

presente na população de Caraguatatuba, área de Mata Atlântica. Os locos descritos neste trabalho poderão ser utilizados em outras populações da espécie e podem ainda ser testados em espécies relacionadas por meio de amplificação cruzada, aumentando a quantidade de marcadores disponíveis para estudos de genética de população e conservação.

As espécies de hábitos similares ao arapaçu-liso, sensíveis à fragmentação, com alta especialização ecológica e hábitos mais sedentários, podem estar sofrendo alterações parecidas em sua estrutura por estarem sob a mesma pressão. No entanto, a maioria dos estudos produzidos tem enfoque apenas ecológico e avaliam somente a riqueza e abundância das espécies. Assim como no presente estudo, trabalhos que caracterizem geneticamente as populações podem fornecer dados importantes para propostas de conservação, ajudando a identificar as áreas prioritárias. Estudos de genética da conservação em espécies da Mata Atlântica podem auxiliar a manter a diversidade que ainda existe neste bioma.

## 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho identificou e caracterizou dezenove locos de microssatélites, dos quais onze se apresentaram polimórficos para a população de *D. turdina* de Caraguatatuba, região de Mata Atlântica. Até o momento não havia nenhum microssatélite descrito para a espécie nem para suas congêneres.

Os marcadores desenvolvidos permitiram a análise populacional do arapaçu-liso, indicando que não houve desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, nem desequilíbrio de ligação. A população não apresentou evidências de endogamia, foi identificado um sinal de possível gargalo genético e redução da diversidade genética.

Os microssatélites descritos amplificaram com sucesso em duas espécies da família Dendrocolaptidae, indicando sua possível utilização para análises populacionais de outros grupos taxonômicos relacionados.

Portanto, o estudo produziu ferramentas genéticas importantes para trabalhos que visam compreender a diversidade e estrutura genética da espécie *D. turdina* e possivelmente de grupos próximos, capazes de contribuir com dados relevantes para programas de manejo e conservação da biodiversidade.



## 8. REFERÊNCIAS

Aleixo A, Galetti M (1997) The conservation of the avifauna in a lowland Atlantic Forest in south-east Brazil. *Bird Conservation International* 7:235-261.

Aleixo A, Vielliard JME (1995) Composição e dinâmica da comunidade de aves da Mata de Santa Genebra, Campinas, SP. *Revista Brasileira de Zoologia* 12:493-511.

Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22):4692-4693.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410

Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS (1998) *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil de Mamirauá, MCT-CNPq, Belém, Pará, Brasil.

Bardeleben C (2004) Isolation of polymorphic tetranucleotide microsatellite markers for the little greenbul (*Andropadus virens*). *Molecular Ecology Notes*. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00764.x

Bardeleben C, Gray MM, Austin J, Rosário IA (2005) Isolation of polymorphic tetranucleotide microsatellite markers for the large-billed scrubwren (*Sericornis magnirostris*). *Molecular Ecology Notes* 5:143-145.

BirdLife Internacional, <http://www.birdlife.org/> (acessado em 21 de maio de 2008).

Bornschein MR and Reinert BL (2000) Aves de três remanescentes florestais do norte do Paraná, sul do Brasil, com sugestões para conservação e manejo. *Revista Brasileira de Zoologia* 17:615-636.

Briskie JV, Mackintosh M (2004) Hatching failure increases with severity of population bottlenecks in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:558-561.

CBRO (Cmitê Brasileiro de Registros Ornitológicos) <http://www.cbro.org.br/> (acessado em 4 de fevereiro de 2010 )

Chan C, Zhao Y, Cheung M, Chambers GK (2008) Isolation and characterization of microsatellite in the kakerori (*Pomarea dimidiata*) using feathers as source of DNA. *Conservation Genetics* 9:1067-1070.

Chan Y, Arcese P (2002) Subspecific differentiation and conservation of song sparrows (*Melospiza melodia*) in the San Francisco bay region inferred by microsatellite loci analysis. *The Auk* 119(3):641-657.

Clench MH (1995) Body pterylosis os woodcreepers and ovenbirds. *The Auk* 112(3):800-804.

Corrêa CL, Collevatti RG, Caparroz R (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci for *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes) with widely cross amplification in netropical passerines. *Journal of Heredity* doi:10.1093/jhered/esp116

Dantas GPM, Santos FR, Marini MA (2009) Sex ratio and morphological characateristics of rufous gnateaters, *Conopophaga lineate* (Aves, Passeriformes) in Atlantic forest fragments. *Inheringia* 99(1):115-119.

Dawson RJG, Gibbs HL, Hobson KA, Yezerinac SM (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79:506-514.

Dinerstein E, Olson, DM, graham PJ, Webster AL, Primm, SA, Bookbinder MP, Ledec, G (1995) A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of latin America and the Caribbean. The World bank, Washington D.C., USA.

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:3166-3170.

Dowling DK, Adcock GJ, Mulder RA (2003) Novel polymorphic microsatellite markers for paternity analysis in the red-capped robin (*Petroica goodenovii*: Aves). *Molecular Ecology Notes* 3:517-519.

Francisco MR, Galetti PM, Gibbs HL (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in the blue manakin, *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae). *Molecular Ecology Notes* 4(4):758-760.

Francisco MR, Gibbs HL, Galetti M, Lunardi VO, Galetti Jr PM (2007) Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 16(23):4908-4918.

Frankham R (2003) Genetics and conservation biology. *C. R. Biologies* 326:S22-S29.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, McInnes KH (2004) A primer of conservation genetics. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 234 pp.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge UK, Cambridge University Press, 617 pp.

Freitas PD, Martins DS, Galetti Jr PM (2008) CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. *Molecular Ecology Resources* 8:107–108.

Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2009) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2005-2008, São Paulo.

Galbusera P, Dongen S, Matthysen e (2000) Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1:163-168.

Ghizoni-Jr IR, Azevedo MAG (2005) Composição de bandos mistos de aves florestais de sub-bosque em áreas de encosta e planície da Floresta Atlântica de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* 19(2):47-53.

Gibbs HL, Tabak LM, Hobson K (1999) Characterization of microsatellite DNA loci for a neotropical migrant songbird, the Swainson's thrush (*Catharus ustulatus*). *Molecular Ecology* 8:1551-1561.

Goerck JM (1997) Patterns of Rarity in the Birds of the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Biology* 11(1):112-118.

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071-1075.

Guatura IN, Corrêa F, Costa JPO, Azevedo PUE (1996) A questão fundiária: roteiro para a solução dos problemas fundiários nas áreas protegidas da Mata Atlântica. Roteiro para a conservação de sua biodiversidade. Série Cadernos da Reserva da Biosfera, Caderno nº 1, 47 p.

Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79(2):413-425.

Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiori A, Flescher RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques* 27:500-507.

Heywood VH, Iriondo JM (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113:321:335.

International Union for Conservation of Nature (IUCN), <http://www.iucnredlist.org/> (acessado em 21 de maio de 2008).

Irested M, Fjelså J, Ericson PGP (2004) Phylogenetic relationships of woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae) – incongruence between molecular and morphological data. *Journal of Avian Biology* 35:280-288.

Jarne P and Lagoda P JL (1996) Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10):424-429.

Karasawa MMG, Vencovsky R, Silva CM (2007) Genetic structure of Brazilian wild rice (*Oryza glumaepatula* Steud., Poaceae) populations analyzed using microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 30(2):400-410.

Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasingha A, Barnwelle JW, Collinse WE, Kingf CL, Kawamotog F, Hartlc DL, Wirtha DF (2008) Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene* 410(1):105-112.

Marantz C, Aleixo A, Bevier LR, Patten MA (2003) Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). In: J. del Hoyo, A. Elliott e D. Christie (Ed). *Handbook of the birds of the World*, volume 8, Broadbills to Tapaculos. Barcelona, Espanha: Lynx Edicions. 358-447.

Marini MA, Garcia FI (2005) Conservação de Aves no Brasil. Megadiversidade 1(1):95-102.

Marques AAB, Fontana CS, Vélez E, Bencke GA, Schneider M, Reis RE (2002) Lista de referência da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. Decreto nº41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT-PUCRS/PANGEA, 2002. 52 p. (Publicações Avulsas FZB,11).

Matioli SR (2001) Biologia molecular e evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto, SP, 202 pp.

McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB (1990) Conserving the world's biological diversity. World Conservation Union, Publication Services, Switzerland.

Milá B, Bardeleben C (2005) Isolation of polymorphic tetranucleotide microsatellite markers for the wedge-billed woodcreeper *Glyphorynchus spirurus*. Molecular Ecology Notes 5:844-845.

Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Fonseca GAB, Olivieri S (1998) Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation Biology* 12(3):516-520.

MMA/SBF (Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas) (2002) Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.

Neff BD and Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55(9):1717-1733.

Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

Oliveira EJ, Pádua JG; Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29(20):294-307.

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.



Paglia AP, Paese A, Bedê LC, Fonseca M, Pinto LP, Machado RB (2004) Lacunas de conservação e áreas insubstituíveis para vertebrados ameaçados da Mata Atlântica. Anais do IV Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. Volume II – Seminários. Fundação o Boticário de Proteção à natureza e Rede Nacional Pró Unidades de Conservação. Curitiba, PR. 39-50.

Pinto LP, Bedê L, Paese A, Fonseca M, Paglia A, Lamas I (2006) Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um *hotspot* mundial. *In*: Rocha CFD, Bergallo, HG, Van-Sluys M, Alves MAS (eds) Essências em Biologia da Conservação , RiMa Editora, São Carlos, pp 69-96.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *The Journal of Heredity* 90(4):502-503.

Poletto F, Anjos L, Lopes EV, Volpato GH, Serafini PP, Favaro FL (2004) Caracterização do microhabitat e vulnerabilidade de cinco espécies de arapaçus (Aves: Dendrocolaptidae) em um fragmento florestal do norte do estado do Paraná, sul do Brasil. *Ararajuba* 12(2):89-96.

Primack RB, Rodrigues E (2001) *Biologia da Conservação*. Ed. Planta, Londrina.

Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36:348-360.

Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary B, Moller AP, Ellegren H (1997) Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7:471-482.

Raikow RJ (1994) A phylogeny of the woodcreepers (Dendrocolaptinae). *The Auk* 111(1):104-114.

Ranta P, Blom T, Niemelä J, Joensuu E, Siitonen M (1998) The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity and Conservation* 7: 385-403.

Raymond M and Rousset F (1995) Genepop, version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.

Ribon R, Simon JE, Mattos GT (2003) Bird extinctions in atlantic forest fragments of the Viçosa region, southeastern Brazil. *Conservation Biology* 6:1827-1839.

Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.

Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.

Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Ed. Nova fronteira, Rio de Janeiro.

Spencer CC, Neigel JE, Leberg PL (2000) Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology* 9:1517-1528.

Stenzler LM and Fitzpatrick JW (2002) Isolation of microsatellite loci in the Florida Scrub-Jay *Aphelocoma coerulescens*. *Molecular Ecology Notes* 2:247-550.

Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota M, Bedê L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. *Conservatio Biology* 19(3):695-700.

Templeton AR, Robertson RJ, Brisson J, Strasburg J (2001) Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:5426-5432.

Templeton AR (2006) *Population genetics and microevolutionary theory*. Willey-Liss. New Jersey.

Van den Bussche RA, Longmire JL, Baker RJ (1995) How bats achieve a small C-value: frequency of repetitive DNA in *Macrotus*. *Mammalian Genome* 6(8):521-525.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.

Zaú AS (1998) Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. *Floresta e Ambiente* 5(1):160-170.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Desequilíbrio de ligação entre os locos, valor de P e desvio padrão (D.P.).

Loco #1	Loco#2	Valor P	D.P.
Dft01	Dft02	0.155430	0.009854
Dft01	Dft04	0.354220	0.012262
Dft02	Dft04	0.329110	0.006498
Dft01	Dft05	0.110080	0.022950
Dft02	Dft05	0.844990	0.014084
Dft04	Dft05	0.304900	0.020121
Dft01	Dft06	0.250720	0.013347
Dft02	Dft06	0.221050	0.006607
Dft04	Dft06	0.424440	0.006359
Dft05	Dft06	0.555420	0.025033
Dft01	Dft07	0.807350	0.009292
Dft02	Dft07	0.626570	0.008133
Dft04	Dft07	1.000000	0.000000
Dft05	Dft07	0.843650	0.015220
Dft06	Dft07	0.302120	0.009423
Dft01	Dft09	0.397740	0.006903
Dft02	Dft09	0.321840	0.004486
Dft04	Dft09	1.000000	0.000000
Dft05	Dft09	0.980720	0.002510
Dft06	Dft09	1.000000	0.000000
Dft07	Dft09	0.529440	0.004965
Dft01	Dft10	1.000000	0.000000
Dft02	Dft10	0.694700	0.006623
Dft04	Dft10	1.000000	0.000000
Dft05	Dft10	0.984100	0.002974

Dft06	Dft10	0.237980	0.007312
Dft07	Dft10	<b>0.011150*</b>	0.001500
Dft09	Dft10	1.000000	0.000000
Dft01	Dft11	0.153200	0.004079
Dft02	Dft11	0.310980	0.005064
Dft04	Dft11	0.079680	0.002143
Dft05	Dft11	0.612770	0.012767
Dft06	Dft11	0.602040	0.003641
Dft07	Dft11	0.256120	0.004403
Dft09	Dft11	0.138760	0.002092
Dft10	Dft11	1.000000	0.000000
Dft01	Dft12	0.557090	0.027992
Dft02	Dft12	0.992860	0.002037
Dft04	Dft12	0.180760	0.011512
Dft05	Dft12	1.000000	0.000000
Dft06	Dft12	0.519780	0.018548
Dft07	Dft12	0.249600	0.016284
Dft09	Dft12	0.171740	0.005822
Dft10	Dft12	0.978260	0.004098
Dft11	Dft12	0.348540	0.008320
Dft01	Dft16	1.000000	0.000000
Dft02	Dft16	0.229260	0.003682
Dft04	Dft16	0.233190	0.003912
Dft05	Dft16	0.512190	0.013961
Dft06	Dft16	1.000000	0.000000
Dft07	Dft16	1.000000	0.000000
Dft09	Dft16	1.000000	0.000000
Dft10	Dft16	1.000000	0.000000
Dft11	Dft16	0.489300	0.002226
Dft12	Dft16	0.416290	0.009339

\*valor sem correção, após correção seqüencial de Bonferroni valor P = 0,6132.