

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS**

**Estruturação genética em populações do tangará-
dançarino *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae) no
corredor costeiro da Mata Atlântica (SP) e sua
importância para a conservação**

Mercival Roberto Francisco

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Galetti

**SÃO CARLOS – SP
2005**

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

F818eg

Francisco, Mercival Roberto.

Estruturação genética em populações do tangará-dançarino *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae) no corredor costeiro da Mata Atlântica (SP) e sua importância para a conservação / Mercival Roberto Francisco. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

103 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Aves. 2. Conservação (Biologia). 3. Mata Atlântica. 4. Microssatélites. 5. Genética – conservação. I. Título.

CDD: 598 (20^a)

*Dedico esta tese aos meus pais,
Maria Elisabeth Favaro
Francisco e Celso Roberto
Francisco, à minha namorada
Renata Fracácio e à minha irmã
Amanda Roberta Francisco, que
têm sido os alicerces da minha
vida.*

“Quando o estudo da casa (Ecologia) e a administração da casa (Economia) puderem fundir-se, e quando a ética puder ser estendida para incluir o ambiente, além dos valores humanos, então poderemos ser otimistas em relação ao futuro da humanidade”.

Eugene P. Odum

AGRADECIMENTOS

Sou especialmente grato a três pessoas que tiveram participações fundamentais na realização deste trabalho, e principalmente, na minha formação científica e pessoal: o meu orientador, Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, por ter compartilhado comigo nos últimos dez anos toda a sua amizade, seus conhecimentos, sua confiança, e por ter acreditado em minhas propostas, me dando a liberdade de colocá-las em prática; o Prof. Dr. Mauro Galetti, que tem me aberto inúmeras portas e com quem tenho aprendido muito sobre ecologia tropical, tendo também, acima de tudo, se tornado um grande amigo; o Dr. H. Lisle Gibbs, que tão bem me recebeu em seu laboratório para que eu pudesse realizar uma parte fundamental do presente trabalho, estando sempre disposto a compartilhar seu vasto conhecimento sobre genética populacional e a colaborar, com seu brilhantismo científico.

Sou também especialmente grato aos grandes amigos Vitor Lunardi e Terumi Hatanaka, que contribuíram de maneira decisiva para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, que tão gentilmente compartilhou conosco seu seqüenciador de DNA.

À Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama pelas discussões sobre genética populacional de aves.

A todos os alunos e docentes do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

Ao IBAMA e ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, por terem autorizado a coleta de sangue dos animais em estudo.

Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo (IF), por ter autorizado o trabalho nas unidades de conservação.

Ao CEMAVE/IBAMA, pelo fornecimento das anilhas utilizadas para a marcação das aves.

À ONG *Idea Wild*, por ter nos fornecido parte dos equipamentos de campo.

À FAPESP, CAPES, CNPq e *Ohio State University* pelo apoio financeiro.

Aos Tangarás-dançarinos, por terem gentilmente cedido as amostras de sangue para a realização das análises.

À mata Atlântica, que foi a fonte inspiradora deste trabalho.

RESUMO

Os Passeriformes neotropicais que habitam o sub-bosque das áreas florestadas têm sido considerados como sendo altamente sedentários, o que resultaria em maiores diferenciações genéticas entre as populações se comparadas com as aves de ambientes temperados. As espécies pertencentes ao gênero *Chiroxiphia* (Pipridae) realizam *displays* de corte altamente especializados, nos quais os machos se agregam em arenas tradicionais, ou *leks*, para fazerem a dança pré-copulatória. Cada *lek* consiste de 2-6 machos, havendo uma dominância hierárquica entre eles. Salvo raras exceções, apenas o macho dominante (alpha) tem acesso às cópulas, resultando numa das maiores variâncias no sucesso de acasalamento dos machos já descrita para os vertebrados. Dado que os machos subordinados (beta) gastam energia dançando, aumentando o potencial reprodutivo do macho alpha, sem receber nenhum benefício imediato, tem sido proposto que seleção de parentesco possa estar envolvida, garantindo um ganho genético para estes machos subordinados. Considerando-se que os locais dos *leks* são permanentes, se seleção de parentesco estiver envolvida espera-se que a dispersão dos machos seja limitada, enquanto as fêmeas, que são livres para visitar diferentes *leks*, seriam o sexo mais dispersivo. O sedentarismo, associado com a alta variância

no sucesso reprodutivo dos machos, bem como a possibilidade de seleção de parentesco, fazem destes animais fortes candidatos a apresentar altos níveis de estruturação interpopulacional. No presente trabalho foi investigada a extensão da variação genética intra e interpopulacional do Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata*, utilizando-se 10 *loci* polimórficos de microssatélites. Os animais ($n = 143$) foram amostrados em cinco áreas localizadas ao longo de um transecto de 415 km, que cobre a maior parte da extensão do maior corredor contínuo restante da Mata Atlântica, um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta. Níveis baixos, mas significativos, de diferenciação foram encontrados ($F_{ST} = -0,0002$ a $0,023$). Esta estruturação deve estar relacionada com aspectos sociais da espécie em estudo, e três hipóteses não exclusivas podem ser consideradas para explicar a diferenciação observada: (1) ação da deriva genética devido a um menor tamanho efetivo das populações locais causado pela grande desproporção no sucesso de acasalamento dos machos; (2) endocruzamento, se os machos contribuírem com mais de uma geração de fêmeas e (3) a potencial existência de seleção de parentesco entre os machos participantes do mesmo *lek*. Além disso, um padrão de isolamento pela distância extremamente significativo foi encontrado, indicando que a dispersão é até certo ponto limitada, o que também pode ter contribuído com a estruturação observada. Portanto, uma

porção significativa de diversidade genética de *C. caudata* está distribuída entre as populações, mesmo em escalas geográficas tão limitadas. Quando estas áreas contínuas se tornam fragmentadas, reduzindo o fluxo gênico, estes animais são provavelmente mais propensos a perder alelos e a sofrer os efeitos negativos do endocruzamento do que seriam as espécies que não são naturalmente endocruzadas, como a maioria das aves de ambientes temperados. Neste cenário, a preservação de áreas contínuas deve ser essencial para a manutenção da diversidade genética, e o corredor contínuo onde este trabalho foi realizado pode ser o último grande reservatório de diversidade genética para muitos organismos da Mata Atlântica.

ABSTRACT

Neotropical passerine birds that inhabit forests understory are thought to be highly sedentary, which may result in greater genetic differentiation among populations than in temperate species. The species of the genus *Chiroxiphia* (Pipridae) perform highly specialized courtship displays in which males aggregate at traditional arenas, or "leks", performing a precopulatory dance. Each lek consists of 2-6 males, where a linear dominance hierarchy exists. With rare exceptions, the dominant male perform all of the copulations, resulting in one of the highest variances in male mating success ever demonstrated in vertebrates. Since subordinate males (beta) expend energy dancing, increasing the fitness of the alpha male, without receiving any immediate benefit, it has been hypothesized that kin selection could be involved, providing a genetic payoff to the subordinate individuals. Considering that the leks locations are permanent, if kin selection is involved, male dispersal is expected to be limited at some level, while females, that are free to visit different leks, would be the more dispersive sex. Sedentariness associated with the high variance in male mating success, as well as the possibility of kin selection, make of these birds candidates to present high levels of interpopulation structuring. In this work we investigated the extent of

variation within and among blue-manakin, *Chiroxiphia caudata*, populations using 10 polymorphic microsatellite loci, along a 415 km transect, which covers most of the extension of the largest remaining continuum of one of the most endangered ecosystem in the planet, the Brazilian Atlantic forest. Low but significant levels of differentiation were found across populations ($F_{ST} = 0.0002$ to 0.023). This structuring must be mostly related to social aspects of the species, and three non exclusive hypothesis can be urged to explain it: (1) genetic drift due to the intra population smaller effective population size caused by the high variance in male mating success; (2) inbreeding if males contribute to more than one generation of females and (3) the existence of kin selection among males from the same lek. Besides, an isolation by distance pattern of differentiation was found, indicating that dispersal is at some level limited, which can also have contributed to the observed structuring. Thus, a significant part of the blue manakin genetic diversity was distributed among populations, even at such a limited geographic scale. When these continuous areas get disconnect reducing gene flow, these animals are probably much more prone to suffer inbreeding depression and loose alleles than species that are not naturally inbred, such as most of the temperate birds. In this scenario, preserving continuous areas must be essential to maintain the genetic

diversity, and the continuous corridor here studied can be the last large genetic repository for many Atlantic forest organisms.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Genética populacional e conservação.....	1
1.2. Aves como objetos de estudo.....	4
1.3. As aves da família Pipridae.....	5
1.4. A mata Atlântica.....	9
1.5. A técnica de microssatélites.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Áreas de estudo.....	18
4.2. Espécie em estudo.....	21
4.3. Procedimento de captura das aves.....	22
4.4. Procedimento de coleta do sangue.....	25
4.5. Extração do DNA.....	25
4.6. Isolamento de <i>loci</i> de microssatélites.....	26
4.6.1. Método PIMA.....	26
4.6.1.1. Reação de RAPD, purificação e ligação dos insertos.....	27
4.6.1.2. Transformação das bactérias.....	28
4.6.1.3. Plaqueamento das colônias.....	29
4.6.1.4. Reação de PCR das colônias.....	29
4.6.1.5. Reações de sequenciamento.....	30
4.6.2. Método baseado em enriquecimento com <i>beads</i> magnéticos.....	31
4.6.2.1. Clivagem do DNA e ligação aos oligonucleotídeos.....	32
4.6.2.2. Ligação dos fragmentos de DNA às sondas biotinizadas.....	33
4.6.2.3. Captura dos fragmentos de DNA com os <i>beads</i> magnéticos.....	34
4.6.2.4. Amplificação por PCR dos fragmentos de DNA enriquecidos.....	35
4.6.2.5. Clonagem do DNA enriquecido.....	36
4.6.2.6. Ligação.....	36
4.6.2.7. Transformação das bactérias.....	37
4.6.2.8. Plaqueamento das colônias.....	37
4.6.2.9. Mini-preps.....	38
4.6.2.10. Reações de sequenciamento dos insertos.....	39
4.6.2.11. Escolha dos <i>loci</i> e construção dos <i>primers</i>	39
4.6.2.12. Amplificação dos <i>loci</i> de microssatélites.....	39
4.6.2.13. Visualização dos resultados.....	40
4.7. Análises estatísticas.....	40
4.7.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	40
4.7.2. Desequilíbrio de ligação.....	41
4.7.3. Diferenciação genética entre os pares de populações.....	42
4.7.4. Isolamento pela distância.....	44

4.7.5. Detecção de migrantes de primeira geração utilizando-se <i>assignment tests</i>	45
4.7.6. Dispersão diferencial entre os sexos.....	47
4.7.7. Estimativas indiretas de fluxo gênico.....	48
4.7.8. Verificação da influência das áreas degradadas de Cubatão na conectividade entre os dois grandes blocos de floresta.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Amostragens.....	49
5.2. Isolamento e caracterização de microssatélites para <i>C. caudata</i>	50
5.2.1. Método PIMA.....	50
5.2.1.1. Padronização das reações de PCR e caracterização dos <i>loci</i>	51
5.2.2. Método dos <i>beads</i> magnéticos.....	52
5.3. Caracterização da variabilidade genética intrapopulacional.....	56
5.4. Estruturação populacional.....	58
5.5. Número efetivo de migrantes e número de alelos privados.....	61
5.6. Detecção de migrantes de primeira geração.....	62
5.7. Influência de Cubatão no fluxo gênico.....	67
5.8. Migração diferencial entre machos e fêmeas.....	68
6. DISCUSSÃO.....	69
6.1. Níveis de heterozigose.....	69
6.2. Estruturação populacional e fluxo gênico.....	71
6.3. <i>Assignment tests</i>	73
6.4. Dispersão diferencial entre os sexos.....	75
6.5. Implicações para a conservação.....	76
7. BIBLIOGRAFIA.....	82
ANEXO 1.....	94
ANEXO 2.....	97
ANEXO 3.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Genética populacional e conservação

A biodiversidade tem sido definida em vários níveis de organização, incluindo genes, espécies, comunidades e ecossistemas, e as atividades antrópicas têm causado grandes impactos em todos estes níveis. Estes impactos são mais aparentes nas espécies e em níveis de organização acima delas, dado que o homem presencia diariamente a destruição dos habitats, a extinção de organismos e a poluição dos ecossistemas. A diversidade genética está na base da hierarquia da biodiversidade, o que aumenta seu grau de importância. Embora a erosão da diversidade genética seja menos aparente, seus efeitos podem ser drásticos, pois esta constitui o material necessário para a adaptação e especiação dos táxons (Hughes *et al.*, 1997; Templeton *et al.*, 2001). Além disso, como em muitos sistemas hierárquicos, a diversidade genética desempenha um importante papel nos níveis superiores, sendo a variedade de espécies um resultado direto das frequências alélicas ao longo do tempo evolutivo. Estas espécies, por sua vez, são as bases da estrutura de muitas comunidades e ecossistemas (Templeton *et al.*, 2001). Tal fato tem levado à incorporação da proteção da variabilidade genética em diversas convenções internacionais que tratam de conservação biológica (Moritz & Faith, 1998).

A diversidade genética é criada pelo processo de mutação, através do qual surgem diferentes alelos. Assim como as espécies, esta variação genética ocorre no espaço e no tempo. Em algumas espécies, a diversidade alélica pode ser homogeneamente distribuída ao longo de toda a área geográfica de ocupação do táxon, e todas as populações locais contêm os mesmos alelos, sendo suas frequências similares. Por outro lado, existem espécies para as quais as populações locais têm pouca diversidade alélica, mas cada uma destas populações pode apresentar alelos diferentes e em frequências variáveis. As forças que subdividem a diversidade, criando hierarquias genéticas dentro de uma espécie (estruturação populacional) incluem os sistemas de acasalamento, a deriva genética e o fluxo gênico (Templeton *et al.*, 2001).

A divergência genética entre as populações pode ser originada a partir de diferentes fatores, como: (1) adaptações a diferentes condições ecológicas ou (2) acúmulo de mutações aleatórias (neutras ou adaptativas) em populações subdivididas por barreiras ou, simplesmente, pela distância geográfica existente entre elas. Além disso, no caso de populações pequenas e isoladas, os efeitos estocásticos da deriva genética e/ou efeitos fundadores devem ser fatores predominantes na diferenciação genética (Simberloff & Cox, 1987; Slatkin, 1987; Kark *et al.*, 1999).

A deriva diminui a variabilidade genética intrapopulacional, mas aumenta a variação interpopulacional, ao passo que o fluxo gênico aumenta a variabilidade intrapopulacional, mas reduz a variação interpopulacional. As atividades humanas, como a redução e a fragmentação dos habitats, aumentam o processo de deriva e diminuem o fluxo gênico para muitas espécies, reduzindo a variabilidade genética de populações locais e impedindo o fluxo de complexos gênicos adaptativos entre elas, causando uma ruptura do processo adaptativo localmente e globalmente dentro da distribuição dos táxons (Templeton *et al.*, 2001).

As espécies diferem quanto ao número de populações (Hughes *et al.*, 1997; Purvis & Hector, 2000). Portanto, para que a diversidade genética seja efetivamente conservada em todos os seus níveis, populações divergentes dentro de uma espécie, seja sob o ponto de vista genético ou fenotípico, devem ser consideradas como sendo unidades independentes a serem manejadas (Moritz & Faith, 1998; Waits *et al.*, 1998). Isto porque cada uma delas contribui com a variação genética total da espécie, aumentando o potencial evolutivo do táxon frente às alterações do ambiente (Franklin, 1980; Soulé, 1980; Allendorf & Leary, 1986; Lande & Barrowclough, 1987; Bouzat *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998; Bryant & Reed, 1999).

Desta maneira, o conhecimento sobre a estrutura genética das populações naturais é essencial para se determinar os limites de cada uma delas, e conseqüentemente, as escalas apropriadas para a conservação e manejo (Moritz & Faith, 1998; Cegelski *et al.*, 2003). Além disso, estudos de estruturação populacional permitem testar hipóteses sobre os fatores que estão promovendo as divergências (McDonald, 2003), possibilitando preservar não apenas a maior variabilidade genética possível dentro dos táxons, mas também os processos que levam à diversificação.

1.2. Aves como objetos de estudo

A aplicação de técnicas de genética molecular tem demonstrado nos últimos anos casos de estruturação genética em populações naturais de aves em escalas geográficas relativamente pequenas (Bates *et al.*, 1999; Kark *et al.*, 1999; Bates, 2000). Os poucos estudos existentes para as aves neotropicais têm revelado que os passeriformes que habitam o sub-bosque sombreado das florestas apresentam maiores diferenciações genéticas entre as populações, se comparados com as espécies melhor estudadas de ambientes temperados (Brumfield & Caparella, 1996; Bates *et al.*, 1999; Bates, 2000; Brown *et al.*, 2004). Tal fato tem sido atribuído ao alto grau de sedentarismo destas aves

(Bates, 2000; Brown *et al.*, 2004). Bates (2000) encontrou níveis substanciais de estruturação populacional entre espécies amazônicas mesmo em áreas de floresta contínua (áreas distanciadas 200 km umas das outras), utilizando entre 23 e 30 loci de isoenzimas. Bates *et al.* (1999) relataram estruturações filogeográficas significativas numa série de passeriformes amazônicos analisando seqüências de mtDNA (porções do citocromo-*b* e ND2). Estudos de diversidade haplotípica de mtDNA (fragmentos da região controladora, citocromo-*b*, ND6 e tRNA) também revelaram subdivisões populacionais significativas entre representantes das florestas chuvosas do sul da Costa Rica (Brown *et al.*, 2004). No entanto, apesar da grande abundância de espécies de passeriformes de sub-bosque florestal, estudos sobre a estruturação genética destas aves na região neotropical são ainda bastante escassos (Bates *et al.*, 1999; Bates, 2000; Höglund & Shorey, 2003; McDonald, 2003), e poucos utilizaram marcadores altamente variáveis, como microssatélites (Höglund & Shorey, 2003; McDonald, 2003).

1.3. As aves da família Pipridae

A família Pipridae é composta por aves frugívoras de pequeno porte, não migratórias, endêmicas da região neotropical. Habitam o sub-bosque das florestas tropicais e subtropicais, sendo raramente vistas em áreas abertas. A

maioria dos representantes desta família apresenta o comportamento de *lek*, ou seja, um número variável de machos se reúne em arenas nas quais realizam um *display* reprodutivo, sendo objetos de escolha por uma fêmea. Além disso, estas aves são marcadamente conhecidas devido ao colorido exuberante apresentado pelos machos de algumas espécies, enquanto as fêmeas são verde oliva (Ridgely & Tudor, 1994; Sick, 1997; Brumfield & Braun, 2001).

Nas espécies do gênero *Chiroxiphia*, o *display* de corte é altamente complexo. Cada *lek* é composto por dois a seis machos que se reúnem periodicamente, durante a vida toda nos mesmos poleiros (1 a 3 poleiros dentro da área de vida), onde realizam uma dança pré-copulatória (Foster, 1981; McDonald, 1993; Sick, 1997). Estes *leks* são cooperativos, dado que são necessários pelo menos dois machos para atrair e estimular a fêmea para o acasalamento (Foster, 1981; McDonald & Potts, 1994).

A evolução deste comportamento é algo bastante intrigante, pois existe uma relação de dominância hierárquica entre os participantes de cada *lek*. Os machos subordinados sofrem um grande gasto de energia ao cooperar com o macho alpha (dominante) na realização da “dança”. No entanto, salvo raras exceções, apenas o macho alpha tem acesso às cópulas (McDonald, 1993; Foster, 1981). Além disso, a posição de subordinado persiste por muitos anos, sendo que

em *Chiroxiphia linearis*, um representante da América Central, a idade média dos machos alpha é de 10,1 anos ($DP \pm 2,2$) e apenas 8% das cópulas são realizadas por machos com menos de oito anos de idade (McDonald, 1993).

Para um determinado indivíduo, qualquer comportamento que aumente a capacidade reprodutiva e o ganho genético de um outro indivíduo, às custas de seu próprio gasto de energia, pode ser favorecido se o coeficiente de parentesco entre eles exceder os custos deste comportamento (Hamilton, 1964; Dawkins, 1976). Portanto, se os machos participantes de cada *lek* forem aparentados, o ganho genético poderia ser uma explicação plausível para o aparente altruísmo fenotípico desempenhado pelos machos subordinados (McDonald & Potts, 1994; Höglund & Shorey, 2003). Além disso, se a seleção de parentesco ocorrer, espera-se que a dispersão dos machos seja limitada, ao passo que as fêmeas, que são livres para visitar diferentes *leks*, teriam uma maior dispersão.

No entanto, McDonald e Potts (1994), utilizando-se de análises de parentesco baseadas em quatro *loci* de microssatélites, verificaram que para *C. linearis* os machos alpha e seus subordinados não são aparentados, e que, portanto, reciprocidade genética não está envolvida. Explicações alternativas para a evolução deste tipo de comportamento seriam benefícios diretos, embora com um longo atraso de tempo, como acesso a algumas raras cópulas e a

ascensão ao *status* de macho alpha em um *lek* no qual as fêmeas já são fiéis (McDonald & Potts, 1994).

Por outro lado, Höglund e Shorey (2003) verificaram para a espécie *Manacus manacus* que embora os machos pertencentes a um mesmo *lek* não façam parte de um grupo familiar, os coeficientes de parentesco indicam que pelo menos alguns machos dentro dos *leks* são aparentados, e que indivíduos aparentados participam do mesmo *lek* ou de *leks* próximos, demonstrando uma certa filopatria (Höglund & Shorey, 2003). Portanto, a relação de parentesco entre os machos participantes de cada *lek* é algo ainda controverso, e a análise de outras espécies poderá contribuir com o entendimento da evolução desta forma incomum de cooperação existente em algumas aves da família Pipridae.

Devido à dominância do macho alpha, as espécies pertencentes ao gênero *Chiroxiphia* podem apresentar uma das maiores desproporções em número de machos que têm acesso às cópulas, em relação ao número de fêmeas, já demonstradas para os vertebrados (McDonald, 1993; 2003). O baixo poder de dispersão das aves de sub-bosque, a grande variância no sucesso de acasalamento dos machos e a possibilidade de parentesco próximo entre os representantes de cada *lek* são fatores que poderiam levar as espécies representantes deste gênero a apresentarem estruturação populacional.

McDonald (2003) não encontrou divergência genética significativa entre duas populações de *C. linearis* distanciadas por 115 km na Costa Rica, utilizando-se de quatro *loci* polimórficos de microssatélites. No entanto, estudos em outras espécies deste grupo tão diverso e em diferentes escalas geográficas são inexistentes.

1.4. A mata Atlântica

A floresta Atlântica é, depois da Amazônia, a maior formação florestal da América do Sul. Encontra-se entre os cinco principais *hotspots* do planeta, apresentando não apenas uma excepcional concentração de espécies, muitas delas endêmicas, mas também um alto grau de devastação (Myers *et al.*, 2000). Este ecossistema foi originalmente uma das florestas de maior extensão latitudinal do planeta, estendendo-se de 6 a 32°S, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, cobrindo uma área de aproximadamente 1 milhão de km², equivalente a 11% do território nacional. Atualmente restam aproximadamente apenas 7,5% deste total, tendo a Mata Atlântica sofrido uma drástica redução e fragmentação, tornando-se um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (SOS Mata Atlântica & INPE, 1992; Myers *et al.*, 2000). Hoje, em sua maior parte, o que restou está contido em pequenos fragmentos disjuntos e em algumas poucas áreas de floresta contínua (Aleixo & Galetti, 1997; Sick, 1997). No

entanto, apesar do avançado estágio de devastação, muito pouco se sabe sobre a estruturação genética das populações animais e vegetais ao longo da distribuição deste ecossistema. Também não existem informações sobre o quanto desta variação genética pode estar sendo perdida com a destruição dos habitats.

O Estado de São Paulo abriga a maior porção remanescente da mata Atlântica, contando com uma área de aproximadamente 1.815.745 ha (Ministério do Meio Ambiente, 2000), que concentra-se principalmente ao longo das regiões escarpadas e montanhosas do Vale do Ribeira, Litoral e Vale do Paraíba, somando um total de mais de 1.730.000 ha de áreas protegidas (Secretaria do Meio Ambiente, 1998).

Os dois maiores e mais importantes blocos protegidos restantes da floresta Atlântica localizam-se na Serra de Paranapiacaba (região do Vale do Ribeira) e na Serra do Mar (região do Vale do Paraíba e litoral), estado de São Paulo. Na Serra de Paranapiacaba, a união dos Parques Estaduais Intervales, PETAR, Carlos Botelho e Estação Ecológica Xituê compõem um destes blocos, com uma área de mais de 120.000 ha de florestas protegidas (Aleixo & Galetti, 1997). O segundo grande bloco compreende o Parque Estadual da Serra do Mar, uma área de 315.000 ha que abrange as cidades de Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião, Bertioga, Santos, Cubatão, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe, sendo subdividido em 13 diferentes núcleos administrativos. Estes dois blocos de

floresta são interligados por uma grande extensão de áreas não protegidas de mata Atlântica que se localiza na região que subdivide os dois maciços de serra. Juntas, estas áreas compõem o maior corredor contínuo restante deste ecossistema. Muito possivelmente, esta seja também a última área na qual a estrutura genética natural das populações de passeriformes da mata Atlântica possa ser estudada sem a influência da deriva genética causada pela fragmentação florestal imposta pelo homem.

Atualmente, embora esta área seja contínua, ela sofre um grande estreitamento na região de Cubatão, na porção central do grande corredor. Este estreitamento é causado principalmente pelo crescimento das cidades de Santos, Guarujá e Cubatão, na vertente oceânica da Serra do Mar, e pela Represa Billings, que se estende desde a grande São Paulo até a vertente continental da cadeia de montanhas, em Cubatão. O grau de desmatamento e fragmentação nesta região encontra-se também bastante avançado. Além disso, a porção mais estreita do corredor é atravessada por três grandes rodovias (Imigrantes I e II e Anchieta), que são constituídas por seis pistas de grande fluxo diário de veículos, ligando a grande São Paulo à Baixada Santista.

1.5. A técnica de microssatélites

Os microssatélites são repetições simples, de pequenas unidades do genoma, de um a seis pares de bases, organizadas em *tandem*, encontradas em todos os organismos eucariotos analisados até o momento (Bachtrog *et al.*, 2000; Kruglyak *et al.*, 2000). São amplamente dispersos pelo genoma e são bastante polimórficos em comprimento (número de repetições), sendo freqüentemente heterozigotos (Kruglyak *et al.*, 2000). A maioria dos *loci* ocorre em regiões não codificadoras de proteínas, e portanto, provavelmente muitos deles não sofrem seleção (Kruglyak *et al.*, 2000). Tais características, associadas ao grande avanço na área das análises estatísticas específicas para este tipo de marcador, fazem dos microssatélites uma ferramenta imprescindível para estudos de genética populacional (Cornuet & Luikart, 1996; Wilson & Balding, 1998; Pritchard *et al.*, 2000).

A variação dos *loci* de microssatélites é avaliada através da amplificação por PCR utilizando-se *primers* complementares às seqüências únicas flangeadoras de cada *locus*, seguido de análise em gel de eletroforese. Dado que os *loci* são espécie-específicos, de uma maneira geral, precisam ser isolados para cada espécie que esteja sendo analisada pela primeira vez (Zane *et al.*, 2002). No entanto, uma utilização mais ampla dos microssatélites tem sido ainda hoje comprometida pelo alto custo e pela dificuldade do isolamento dos *loci* e de suas

regiões flanqueadoras a partir do genoma das espécies em estudo (Lunt *et al.*, 1999). Este constitui-se também num dos principais impedimentos para o desenvolvimento de estudos sobre a diversidade genética das populações de aves neotropicais.

O sucesso do isolamento de novos *loci* de microssatélites depende não apenas do número de *loci* obtidos, mas também do grau de polimorfismo apresentado por estes. O grau de variação de um *locus* de microssatélite depende de sua taxa de mutação. Enquanto o DNA de cópia única evolui principalmente através da acumulação de substituições de bases, o mecanismo predominante na evolução dos microssatélites é o deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase. O deslizamento da polimerase ocorre durante a síntese do DNA. Neste processo, as duas fitas podem ocasionalmente se separar e voltarem a se realinhar em posição incorreta, resultando em alças não pareadas. Muitas destas alças são corrigidas pelos mecanismos de reparo da célula, e apenas uma pequena fração que não sofre reparo resulta em ganho ou perda de uma ou mais unidades repetitivas (Bachtrog *et al.*, 2000; Harr *et al.*, 2000; Kruglyak *et al.*, 2000).

A taxa de mutação, por sua vez, pode ser influenciada por alguns parâmetros, como o tamanho do microssatélite (número de repetições sem interrupções) (Glenn *et al.*, 1996; Bachtrog *et al.*, 2000), a presença de interrupções (Harr *et al.*, 2000) ou a composição de bases das unidades

repetitivas (Bachtrog *et al.*, 2000). Ainda controversa é a influência do tamanho da unidade repetitiva (Bachtrog *et al.*, 2000), da composição de bases das regiões flanqueadoras (Glenn *et al.*, 1996; Bachtrog *et al.*, 2000) e da posição do microssatélite no cromossomo (Bachtrog *et al.*, 2000).

O tamanho do microssatélite tem sido positivamente correlacionado com o grau de heterozigose e polimorfismo (Glenn *et al.*, 1996; Bachtrog *et al.*, 2000). Os microssatélites mais longos provocam um progressivo aumento na taxa de mutação. Em vertebrados, de uma maneira geral, 90% dos *loci* que apresentam mais de 10 repetições são polimórficos (Glenn *et al.*, 1996).

Os microssatélites podem ser perfeitos (sem interrupções) ou imperfeitos (com interrupções). Geralmente, os microssatélites com interrupções são menos variáveis. Uma possível explicação para isto é mais uma vez o fato de que a taxa de mutação é dependente do comprimento. Como a interrupção do microssatélite é freqüentemente assimétrica, ela gera duas unidades de comprimentos diferentes. A predominância de mutações na porção mais longa do microssatélite subdividido, bem como as maiores taxas de mutação observadas para as seqüências ininterruptas, sugerem que as interrupções constituam uma barreira para o deslizamento da DNA polimerase (Primmer & Ellegren, 1998; Harr *et al.*, 2000).

O deslizamento da DNA polimerase requer a quebra das pontes de hidrogênio entre as duas fitas de DNA. Com isto, seria esperada uma maior taxa de mutação nos microssatélites que apresentam unidades repetitivas compostas por AT, cujas ligações são mais fracas, do que naqueles compostos por GT/CA ou GA/CT (Bachtrog *et al.*, 2000). De fato, Kruglyak *et al.* (2000) encontraram maiores taxas de mutação em trinucleotídeos ricos em AT no genoma do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, para *Drosophila melanogaster*, Bachtrog *et al.* (2000) encontraram uma tendência oposta, demonstrando que a taxa de mutação em dinucleotídeos AT/TA foi significativamente mais baixa em relação a GT/CA e GA/CT. Dado que a maioria das mutações causadas pelo deslizamento da polimerase são corrigidas pelo sistema de reparo do processo de replicação do DNA, pequenas diferenças na eficiência deste mecanismo enzimático para detectar ou remover essas mutações, podem resultar em taxas de mutação diferenciadas. Se este mecanismo repara preferencialmente os eventos de deslizamento da polimerase de um dado tipo de repetição, isto poderia explicar tais diferenças (Bachtrog *et al.*, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

A detecção de populações geneticamente diferenciadas tem auxiliado na escolha de áreas prioritárias para a conservação em diversos ecossistemas, de maneira a preservar uma maior variação genética possível dentro dos taxa (Smith *et al.*, 1997; Bermingham & Moritz, 1998; Moritz & Faith, 1998; Kark *et al.*, 1999). No entanto, para a mata Atlântica, devido ao drástico grau de deteriorização, as possibilidades de planejamento são praticamente inexistentes, sendo todo o pouco que restou de primordial importância. Neste caso, a inclusão da informação genética deve ser utilizada não para que seja feita a escolha de áreas que devam ser preferencialmente mantidas, mas sim para contribuir apontando áreas que apresentem recursos genéticos diferenciados e que possam não estar recebendo subsídios suficientes para preservá-lo (como vigilância, reflorestamentos, desapropriação de novas áreas, criação de zonas de amortecimento, etc.). Isto pode auxiliar no planejamento da utilização dos limitados recursos públicos destinados à criação e manutenção de Parques e Reservas no Estado de São Paulo.

No entanto, muito pouco se sabe sobre os padrões de distribuição da diversidade genética das populações animais dentro deste ecossistema, sendo este o primeiro trabalho a investigar a estruturação genética de um passeriforme

da mata Atlântica utilizando-se marcadores de microssatélites. Embora uma única espécie esteja sendo analisada, se variações genéticas interpopulacionais forem detectadas em outras espécies em estudos futuros, isto significa que podemos estar subestimando a diversidade biológica existente na mata Atlântica, como já pressuposto por Bates (2000) para a floresta Amazônica, podendo ser este um novo e importante aspecto a ser considerado em ações que visem conscientizar órgãos públicos, a população e instituições de fomento sobre a importância da realização de projetos para a conservação deste ecossistema.

3. OBJETIVOS

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram:

- Isolar e caracterizar *loci* de microssatélites para a espécie em estudo.
- Medir, através da técnica de microssatélites, a quantidade de variação genética intra e interpopulacional existente entre cinco populações do Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae), localizadas ao longo de um transecto de 415 km que cobre a maior parte da extensão do maior contínuo restante da mata Atlântica.
- Verificar se o afunilamento deste contínuo apresentado na região de Cubatão está interferindo no fluxo gênico natural das populações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Áreas de estudo*

As aves foram amostradas em cinco localidades distribuídas ao longo de um transecto que abrange a maior parte da extensão do maior contínuo restante da mata Atlântica. Na região da Serra do Mar, foram estudados os núcleos Picinguaba (23° S, 44° W), Caraguatatuba (23° S, 45° W) e Cubatão (23° S, 46° W), pertencentes ao Parque Estadual da Serra do Mar. Na região da Serra de Paranapiacaba as aves foram amostradas no Parque Estadual de Carlos Botelho (24° S, 47° W) e no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) (24° S, 48° W) (Figura 1). A distância linear entre as áreas de estudo variou entre 85,8 (Picinguaba - Caraguatatuba) e 415 km (Picinguaba - PETAR).

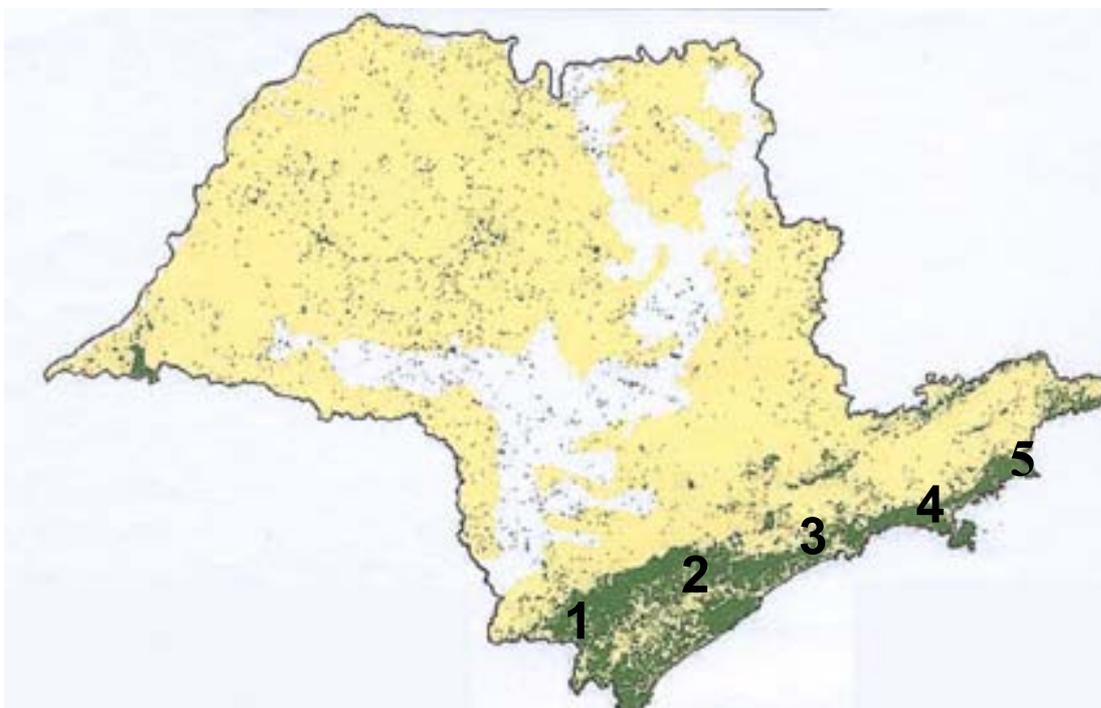


Figura 1. Áreas de estudo na mata Atlântica do Estado de São Paulo (*Mapa: SOS Mata Atlântica/INPE, 1996*). Parque Estadual do Alto Ribeira (1), Parque Estadual Carlos Botelho (2) e Parque Estadual da Serra do Mar; núcleos Cubatão (3), Caraguatatuba (4) e Picinguaba (5).

O tipo de vegetação encontrado nas áreas de estudo é predominantemente a floresta Atlântica costeira, que é distribuída principalmente ao longo das áreas de baixa a média elevação (≤ 1000 m) da vertente leste da cadeia de serras. O clima é quente e úmido, sendo as chuvas produzidas localmente nas encostas oceânicas das montanhas pelos ventos úmidos vindos do Atlântico, não havendo uma estação seca (até 3600 mm de chuva por ano). Este tipo de ambiente contrasta com as florestas semidecíduas do interior (que não foram aqui estudadas), que são distribuídas geralmente em altitudes acima de 600 m, ao longo do platô que abrange as regiões centrais e o sudeste do interior do país.

Estas áreas são caracterizadas por apresentar uma estação mais fria e de seca relativamente severa (1300 a 1600 mm de chuva por ano), que se torna mais drástica quanto mais distante do oceano (Morellato & Haddad, 2000; Oliveira-Filho & Fontes, 2000). Estas variações geoclimáticas são acompanhadas por marcantes mudanças na composição florística e na estrutura do sub-bosque, sendo as transições mais abruptas encontradas nos estados de São Paulo e Paraná (Oliveira-Filho & Fontes, 2000).

As porções úmidas da floresta atlântica que foram alvo deste trabalho são mais preservadas por localizarem-se em terrenos íngrimes e de difícil acesso. Em contraste, as florestas semidecíduas do interior, onde se localizam as áreas mais propícias para a agricultura, estão reduzidas a pequenos fragmentos devido às extensas atividades de monoculturas como café, cana de açúcar, laranja e *Eucalyptus* (Willis & Oniki, 1992).

A largura do corredor de florestas em sua área mais estreita, localizada na região de Cubatão, apresenta apenas em torno de 2 km, sendo delimitada na porção costeira pelas cidades de Santos e Cubatão, e na porção interior pela represa Represa Billings (Figura 2).

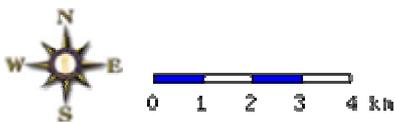
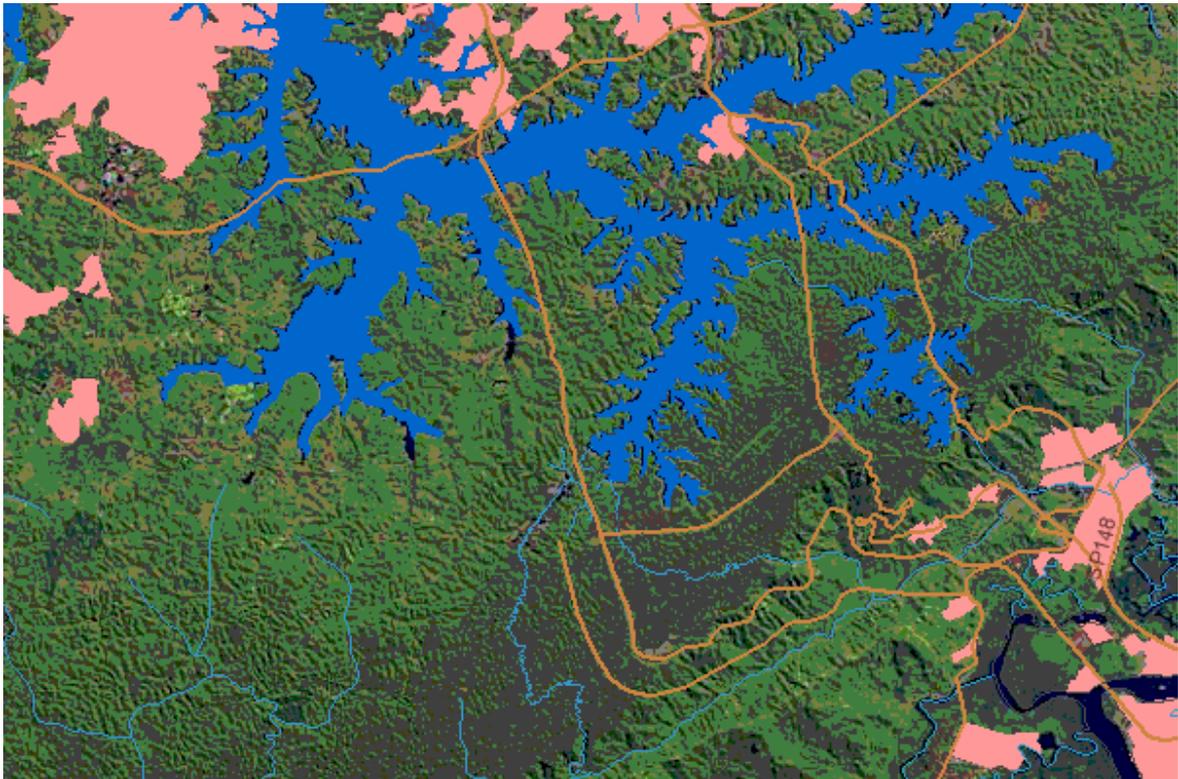


Figura 2. Vista em detalhes da região de Cubatão, onde o grande corredor de mata Atlântica sofre um drástico afinilamento causado pelas cidades (em vermelho), represamentos (em azul) e pelas rodovias (representadas por traços de cor laranja). Fonte: Sinbiota (FAPESP).

4.2. Espécie em estudo

O Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata* (Pipridae) é uma pequena ave frugívora (23,4 g; 15 cm) endêmica da floresta Atlântica (Figura 3). É muito abundante nos estratos baixo e médio das áreas florestadas (Ridgely & Tudor, 1994; Sick, 1997), ocorrendo inclusive em áreas fragmentadas (Uezu et al.,

2005). Sua distribuição abrange o sudeste do Brasil, do sul da Bahia e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, além do leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Ridgely & Tudor, 1994; Sick, 1997).



Figura 3. Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata* (Pipridae). Macho adulto fotografado em Picinguaba, SP.

4.3. Procedimento de captura das aves

As aves foram capturadas com redes de *Nylon* (redes de neblina) de 12 X 2,5 m, malha 1-1/4'' (AVINET) (Figura 4). Em cada ponto de captura foram armadas entre seis e 15 redes em seqüência. Estas estações de captura foram

montadas próximo aos *leks*, os quais foram detectados auditivamente. Um número mínimo de cinco *leks* foi amostrado em cada área de estudo. Além disso, só foram realizadas capturas em *leks* que se distanciavam por pelo menos 500 m dos demais *leks* amostrados. Estes procedimentos foram adotados para que as amostras obtidas em cada área de estudo fossem representativas da área, e não de *leks* individuais. As aves capturadas ficaram retidas, pelo menor tempo possível, em sacos de pano (tecido poroso) (Figura 5). Em seguida cada uma delas recebeu uma anilha fornecida pelo CEMAVE/IBAMA contendo uma numeração específica (Figura 6).



Figura 4. Tangará-dançarino capturado numa rede de neblina.



Figura 5. Sacos de pano utilizados para a contenção das aves durante o trabalho de campo.



Figura 6. Marcação de uma fêmea do Tangará-dançarino utilizando uma anilha de alumínio fornecida pelo CEMAVE/IBAMA.

4.4. Procedimento de coleta do sangue

Uma gota de sangue (10 a 20 μ L) foi retirada através de um pequeno corte na ponta de uma das unhas de cada ave (Figura 7). Este sangue foi removido com auxílio de uma micropipeta para um tubo *Eppendorf* de 1,5 ml, juntamente com uma gota do anti-coagulante EDTA, e armazenado em álcool etílico 100%. Depois deste procedimento, a unha ave foi limpa com etanol 70% e uma solução hemostática líquida foi aplicada no local para estancar o sangramento. Após aproximadamente dois minutos os animais foram soltos sem sofrerem danos.



Figura 7. Coleta de amostra de sangue de um exemplar de *C. caudata* a partir de um pequeno corte na ponta de uma das unhas.

4.5. Extração do DNA

O DNA foi obtido de acordo com o protocolo convencional de extração utilizando-se Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (Sambrook *et al.* 1989).

4.6. Isolamento de loci de microsatélites

Para o isolamento de *loci* de microsatélites para a espécie em estudo, duas metodologias alternativas foram utilizadas:

4.6.1. Método Pima

O método PIMA (*PCR isolation of microsatellite arrays*) (Lunt *et al.*, 1999) baseia-se na amplificação do DNA com diferentes *primers* de RAPD. Os produtos obtidos são ligados a plasmídeos (vetores T) e clonados em bactérias *Escherichia coli*. Após o crescimento das colônias, os vetores são amplificados por PCR utilizando-se um par de *primers* do vetor (*M13 forward* e *M13 reverse*), os quais flanqueiam o inserto, e um *primer* de microsatélites rico em bases GC, (5' TGTGGCGGCCGC(TG)₈ 3'). Desta maneira, quando o *primer* de microsatélites encontra uma seqüência homóloga, isto resulta numa pequena banda em adição à banda obtida com os iniciadores do vetor que flanqueiam o inserto. Os insertos das colônias que apresentam a banda menor adicional são seqüenciados e analisados para a verificação da possível existência de *loci* de microsatélites.

4.6.1.1. Reação de RAPD, purificação e ligação dos insertos

Foram testados 12 *primers* de RAPD (Tabela 1) para a amplificação do DNA de um único indivíduo de *C. caudata*, seguindo-se as mesmas condições de amplificação para todos os *primers*. Foram utilizados para a clonagem os produtos dos *primers* que resultaram na amplificação de várias bandas e na não amplificação da reação controle.

Em cada reação foram utilizados 10ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs, tampão de amplificação 1X, 50 ng do *primer*, 3mM de MgCl₂ e 1U de *Taq polimerase*, num volume total de 25µl. O termociclador PTC-100TM MJ-Research foi programado para uma desnaturação inicial de 92°C (3 min), seguido de 40 ciclos de 92°C (1 min), 36°C (1,5 min), 72°C (2 min), e uma extensão final de 72°C (3 min). Nas reações controle todos os reagentes estavam presentes, exceto o DNA.

Tabela 1. *Primers* de RAPD testados para a realização do isolamento de microssatélites através do método PIMA.

<i>Primer</i>	Seqüência	Referência
A9	GGGTAACGCC	Garcia <i>et al.</i> (1994)
A10	GTGATCGCAG	Garcia <i>et al.</i> (1994)
A20	GTTGCGATCC	Garcia <i>et al.</i> (1994)
B11	GTAGACCCGT	Garcia <i>et al.</i> (1994)
B14	TCCGCTCTGG	Garcia <i>et al.</i> (1994)
B20	GGACCCTTAC	Garcia <i>et al.</i> (1994)
101	GCGCCTGGAG	Tassanakajon <i>et al.</i> (1997)

174	AACGGGCAGG	Tassanakajon <i>et al.</i> (1997)
428	GGCTGCGGTA	Tassanakajon <i>et al.</i> (1997)
456	GCGGAGGTCC	Tassanakajon <i>et al.</i> (1997)
457	CGACGCCCTG	Tassanakajon <i>et al.</i> (1997)
459	GCGTCGAGGG	Tassanakajon <i>et al.</i> (1997)

Em seguida, 20 μ L do produto de amplificação de cada um dos *primers* selecionados foram colocados num único tubo e a mistura foi purificada. Para isto utilizou-se o Kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System*, da Promega. Os fragmentos de DNA purificados foram ligados em vetores utilizando-se o kit *pGEM-T Easy Vector*, da Promega.

4.6.1.2. Transformação das bactérias

Para a transformação das bactérias, 5 μ l da ligação (plasmídeos + insertos) foram adicionados a 200 μ l de uma suspensão em glicerol de bactérias competentes (*E. coli*). A mistura foi colocada em gelo por 20 minutos e posteriormente exposta a um choque térmico a 42°C, em banho-maria, por 50 segundos. Em seguida, a mistura foi novamente colocada em gelo por 2 minutos. Oitocentos microlitros de meio LB líquido foi acrescentado às bactérias transformadas, e a cultura foi posta para crescer por 1,5 h a 37°C, com agitação.

4.6.1.3. *Plaqueamento das colônias*

Após o crescimento, esta cultura foi centrifugada por cinco segundos para a remoção do excesso de meio líquido, e foi posteriormente plaqueada (duas placas). Cada placa continha 25 ml de meio LB sólido com ampicilina na concentração 1 µl/ml. Quinze minutos antes da transferência das bactérias, 50 µl de X-Gal e 100 µl de Ampicilina foram espalhados com auxílio de uma Alça de Drigalski sobre o meio sólido das placas. As placas foram colocadas em estufa a 37°C *over night* para o crescimento das colônias. Em seguida foram armazenadas em geladeira. As colônias recombinantes foram replaqueadas. Cada nova placa foi subdividida em 96 quadrados numerados.

4.6.1.4. *Reação de PCR das colônias*

As colônias recombinantes, após replaqueadas em meio sólido, foram novamente crescidas em meio líquido em placas (*Mega Plate*) para 96 amostras. Para isto, cada compartimento da placa foi preenchido com 1 ml de meio LB líquido com ampicilina. Cada colônia recombinante foi tocada com auxílio de palitos de madeira esterilizados, e em seguida os palitos foram mergulhados nos compartimentos do *Mega Plate* contendo meio líquido. Posteriormente, os palitos foram removidos e o *Mega Plate* vedado com fita plástica. Estas novas culturas foram incubadas por 20 h, a 37°C, com agitação.

As reações de PCR das colônias foram realizadas em placas para 96 amostras. Um carimbo de metal com encaixe perfeito entre a *Mega Plate* e a placa de PCR foi utilizado para tocar as colônias em meio líquido e em seguida tocar o *mix* já presente na placa de PCR. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PTC-100TM MJ-Research, contendo: 0,2 mM de dNTPs, tampão de amplificação 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq polimerase*, 50 ng de cada *primer* flanqueador dos insertos (*M13 Forward* e *M13 Reverse*) e 50 ng do *primer* para microsatélite, num volume final de 20µl. O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 94°C (4 min), seguido de 40 ciclos de 95°C (40 s), 55°C (40 s) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72°C (5 min).

Os produtos de amplificação foram observados em géis de agarose 1%, e as colônias que apresentaram duas bandas no gel, sendo a maior banda menor do que 1 kb, foram selecionadas para seqüenciamento.

4.6.1.5. Reações de seqüenciamento

Cinquenta microlitros de cada colônia selecionada foram retirados da *Mega Plate* e postos para crescer novamente em 4 ml de meio LB líquido com ampicilina, *over night*, a 37°C, com agitação. *Mini-preps* destas culturas foram realizadas com auxílio do kit *FlexiPrep* (Pharmacia Biotech).

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems Inc.), utilizando-se o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

4.6.2. Método baseado em enriquecimento com beads magnéticos

Uma biblioteca genômica parcial foi construída para a espécie em estudo, seguindo-se a metodologia de enriquecimento apresentada por Hamilton *et al.* (1999). Esta metodologia baseia-se na captura de fragmentos de DNA que contêm potenciais *loci* de microssatélites através da hibridização com sondas biotinizadas de seqüências repetitivas, e posterior recuperação destes fragmentos utilizando-se *beads* magnéticos marcados com streptavidina. Os fragmentos de DNA que se anelam às sondas ficam retidos pelos *beads*, que por sua vez são retidos por uma coluna magnética, permitindo que os fragmentos que não apresentem potenciais *loci* de microssatélites sejam eliminados através de lavagens sucessivas. Além disso, os números de cópias dos fragmentos de DNA enriquecidos são multiplicados via PCR utilizando-se *primers* que se anelam a oligonucleotídeos previamente ligados a ambas as extremidades de cada fragmento, permitindo também que estes fragmentos de DNA sejam clonados em vetores com terminações TA.

4.6.2.1. Clivagem do DNA e ligação aos oligonucleotídeos

Aproximadamente 4 µg de DNA de um único indivíduo foi digerido com as enzimas de restrição Rsa I e BstU I (New England Biolabs Inc.), seguindo-se as recomendações do fabricante. O DNA digerido foi aplicado num gel de agarose (1%), e os fragmentos com tamanhos entre 300 e 800 pb foram isolados, utilizando-se o kit *QIA quick Gel Extraction* (Quiagen), e diluídos num volume final de 20µl de tampão TE. Em seguida, os fragmentos de DNA foram ligados, em suas ambas extremidades, a oligonucleotídeos (*linkers*) de dupla fita (Tabela 2), com o objetivo de criar sítios de ligação de *primers* para reações de PCR subseqüentes. Para tornar a ligação possível, estes oligonucleotídeos foram comercialmente fosfatados.

Tabela 2. *Linkers* utilizados para criar sítios de ligação de *primers* para posterior reação de PCR em cada um dos fragmentos de DNA.



Para garantir que os oligonucleotídeos estivessem em dupla fita, 100 µl de cada um deles (concentração inicial de 10 µM) foi colocado num tubo de PCR, com concentração final de NaCl de 100 mM. Esta mistura foi aquecida a 95°C e posteriormente resfriada vagarosamente à temperatura ambiente.

Em seguida, os oligonucleotídeos foram ligados aos fragmentos de DNA utilizando-se a seguinte reação:

- 7,0 µl dos oligonucleotídeos em dupla fita
- 2,0 µl da enzima T4 DNA ligase (Promega)
- 1,5 µl do tampão da enzima
- 4,5 µl de H₂O
- volume total (20µl) do DNA digerido anteriormente isolado do gel de agarose.

Estes componentes foram incubados a 16°C *overnight*.

4.6.2.2. *Ligação dos fragmentos de DNA às sondas biotinizadas*

Os fragmentos de DNA contendo os oligonucleotídeos foram hibridizados a um conjunto de oito sondas biotinizadas de seqüências repetitivas para microssatélites tetranucleotídicos (Tabela 3). Para isto, num tubo de PCR foi montada a seguinte reação:

- 25 µl de solução Hyb (12x SSC, 0,2% SDS)
- 5 µl do *mix* de sondas biotinizadas (10 µM de cada uma delas)
- 10 µl do DNA ligado aos oligonucleotídeos

- 10 μl de H_2O

TOTAL = 50 μl

A hibridização foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research), programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C , seguido de uma rápida queda de temperatura para 70°C , e reduções de $0,2^\circ\text{C}$ a cada 5 segundos por 99 ciclos, atingindo a temperatura de $50,2^\circ\text{C}$. Em seguida, permaneceu a 50°C por 10 minutos, sendo posteriormente reduzida em $0,5^\circ\text{C}$ a cada 5 segundos até atingir 40°C , e finalmente 15°C .

Tabela 3. Conjunto de sondas biotinizadas utilizadas no enriquecimento do DNA de *Chiroxiphia caudata* para microssatélites tetranucleotídicos.

(AAAC) ₆
(AAAG) ₆
(AATC) ₆
(AATG) ₆
(ACCT) ₆
(ACAG) ₆
(ACTC) ₆
(ACTG) ₆

4.6.2.3. Captura dos fragmentos de DNA com os beads magnéticos

Um total de 50 μl da suspensão de *beads* magnéticos (*Dynabeads M-280 streptavidin*, Dynalbiotech) foi previamente lavado por duas vezes utilizando-se 250 μl de tampão TE, e duas vezes com 250 μl de solução Hyb. Em cada lavagem, os *beads* foram precipitados utilizando-se uma coluna magnética e o

sobrenadante foi descartado. Em seguida, os *beads* foram resuspendidos em 150 μ l de solução Hyb.

Num tubo de 1,5 ml, os 50 μ l da mistura de DNA + sondas foi misturado aos *beads* e incubado num *shaker* à baixa rotação em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os *beads* foram lavados por duas vezes com 400 μ l da solução Hyb e duas vezes com 400 μ l da solução de lavagem (0,2x SSC, 0,1% SDS). Em seguida, os *beads* foram novamente lavados com 400 μ l da solução de lavagem aquecida a 50°C. Os *beads* foram resuspendidos em 200 μ l de tampão TLE e foram incubados a 95°C por 5 minutos, e este sobrenadante (contendo o DNA enriquecido) foi removido para outro tubo de 1,5 ml.

O DNA enriquecido foi precipitado adicionando-se 22 μ l de NaOAc (3M) e 444 μ l de etanol 95%. Após uma centrifugação de 10 minutos o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com 0,5 ml de etanol 70%. Em seguida, o *pellet* foi resuspendido em 25 μ l de tampão TE.

4.6.2.4. Amplificação por PCR dos fragmentos de DNA enriquecidos

O DNA enriquecido passou por uma extensão por PCR utilizando-se como *primer* o oligonucleotídio não fosfatado (Tabela 2). A reação de PCR constituiu-

se de 5 µl de tampão de amplificação 10X, 150 µM de dNTPs, 0,5 µM do oligonucleotídeo não fosfatado, 2 mM de MgCl₂, 0,3 µl de Taq polimerase (5U/µl), 30,2 µl de H₂O e 5 µl de DNA enriquecido. O termociclador (PTC-200, MJ Research) foi programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, e 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 1,5 minutos, seguido de uma extensão final de 72°C por 30 minutos.

4.6.2.5. Clonagem do DNA enriquecido

O produto de PCR da amostra de DNA enriquecido foi clonado utilizando-se o kit *TOPO TA Cloning Version P* (Invitrogen Life Technologies).

4.6.2.6. Ligação

A reação de ligação foi constituída por 2 µl do produto de PCR (insertos), 1 µl de solução salina (fornecida pelo kit), 2 µl de água estéril e 1 µl do vetor. Esta reação foi incubada a temperatura ambiente por 25 minutos e em seguida guardada em freezer (-20°C) até o momento de ser utilizada na fase de transformação das bactérias.

4.6.2.7. *Transformação das bactérias*

Para a transformação das bactérias, 2 μ l da ligação foram adicionados a 100 μ l de uma suspensão de bactérias competentes (*E. coli*). A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e posteriormente exposta a um choque térmico a 42°C, em banho-maria, por 30 segundos. Em seguida, a mistura foi novamente colocada em gelo por 2 minutos. As bactérias transformadas foram postas para crescer em 250 μ l de meio líquido SOC (Invitrogen Life Technologies) por 1 h a 37°C, com agitação.

4.6.2.8. *Plaqueamento das colônias*

Após o crescimento, esta cultura foi plaqueada (duas placas). Cada placa continha 25 ml de meio LB sólido com ampicilina na concentração 1 μ l/ml. Quinze minutos antes da transferência das bactérias, 40 μ l de X-Gal (40 mg/ml) foram espalhados com auxílio de uma Alça de Drigalski sobre o meio sólido das placas. As placas foram colocadas em estufa a 37°C *overnight* para o crescimento das colônias. Em seguida foram armazenadas em geladeira. As colônias recombinantes foram replaqueadas. Cada nova placa foi subdividida em 46 quadrados numerados.

4.6.2.9. Mini-preps

As colônias recombinantes, após serem replaqueadas em meio sólido, foram novamente crescidas em tubos *falcon* contendo 2ml de meio LB líquido com ampicilina. Cada colônia recombinante foi tocada com auxílio de palitos de madeira esterilizados, e em seguida os palitos foram mergulhados nos tubos *falcon* numerados contendo o meio líquido. Estas novas culturas foram incubadas *overnight*, a 37°C, com agitação. Em seguida, 1,5 ml da suspensão de bactérias de cada tubo foi removida para um tubo de *eppendorff* e centrifugado por 10 segundos para concentrar as células. O excesso de meio líquido foi removido e as mini-preps foram realizadas seguindo-se um protocolo padrão de extração utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.

As mini-preps das colônias foram amplificadas utilizando-se os *primers* M13 *Forward* (5'- CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG -3') e M13 *Reverse* (5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG -3') para a obtenção dos insertos. Foram realizadas reações de PCR com volume total de 20 µl, contendo 0,2 mM de dNTPs, tampão de amplificação 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq polimerase*, 50 ng de cada *primer* e 1µl de DNA das mini-preps diluído 99:1 em tampão TE. O termociclador (PTC-200, MJ Research) foi programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, e 35 ciclos de 40

segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Uma pequena porção dos produtos de PCR (3 µl) foi aplicada em géis de agarose (1%) e os insertos com tamanho entre 300 e 1000 pb foram escolhidos para serem seqüenciados.

4.6.2.10. Reações de seqüenciamento dos insertos

Os insertos foram seqüenciados num seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems Inc.), utilizando-se o kit *BigDye*. As reações de extensão seguiram as especificações do fabricante.

4.6.2.11. Escolha dos loci e construção dos primers

Foram selecionados os microssatélites com um número mínimo de cinco repetições sem interrupção. Os *primers* foram construídos com auxílio do *software Primer3* (Rosen & Skaletsky, 2000).

4.6.2.12. Amplificação dos loci de microssatélites

As amplificações dos *loci* de microssatélites foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ-Research), programado para uma desnaturação inicial de 94°C (3 minutos) e 35 ciclos de 94°C (30 segundos), 45-65°C (30

segundos) e 72°C (30 segundos), seguido de uma extensão final de 72°C (5 minutos).

Em cada reação foram utilizados 0,2 mM de dNTps, tampão de amplificação 1X, 3 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer*, 1 U de *Taq polymerase* e 150 ng de DNA, completando um volume total de 10 µl.

4.6.2.13. Visualização dos resultados

Para a caracterização dos *loci* obtidos, os segmentos amplificados foram separados em géis de poliacrilamida 7,5% em cuba de sequenciamento. A visualização foi feita através da coloração com nitrato de prata (Commincini *et al.*, 1995). No entanto, as análises definitivas foram realizadas em seqüenciador (ABI 377) utilizando-se de *primers* marcados com fluorescência.

4.7. Análises estatísticas

4.7.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi estimado comparando-se as heterozigotes observadas (H_O) e esperadas (H_E) e calculando-se o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). Estes valores foram obtidos para cada *locus* juntando-se todas as populações e, dentro de cada população, para cada *locus* separadamente e para a média de todos os *loci*. A significância das diferenças entre os valores de

H_E e H_O foram obtidas utilizando-se o software GENEPOP (versão 3.4, Raymond & Rousset, 1995). Para isto, a partir dos gametas das amostras observadas foram geradas outras amostras com genótipos obtidos através da união randômica dos alelos, e o *score test* (U test) (Rousset & Raymond, 1995) foi utilizado para se calcular a probabilidade de união aleatória dos gametas em cada uma destas amostras.

O F_{IS} foi calculado de acordo com Weir e Cockerham (1984), utilizando-se o software FSTAT (Goudet, 1995). Para se verificar se os valores de F_{IS} diferiram significativamente de zero, mais uma vez populações foram recriadas randomicamente, com genótipos derivados da união aleatória dos gametas presentes na população observada. Em seguida, o F_{IS} foi calculado para cada uma destas populações randômicas, criando-se uma distribuição de valores de F_{IS} (distribuição nula). A proporção de valores de F_{IS} presentes nesta distribuição que foram maiores ou iguais ao valor de F_{IS} obtido para população observada representa a probabilidade de F_{IS} diferir significativamente de zero.

4.7.2. Desequilíbrio de ligação

Para se calcular a ocorrência de desequilíbrio de ligação foram feitas tabelas de contingência para cada par de *loci*, utilizando-se *Fisher Exact Test* para estimar se os genótipos de um *locus* foram independentes dos genótipos do

outro *locus* em termos de frequência de ocorrência. Esta análise foi realizada no software GENEPOP, considerando-se todas as populações juntas.

4.7.3. Diferenciação genética entre os pares de populações

A distância genética entre os pares de populações foi estimada considerando-se todos os *loci* em conjunto através de dois tipos de índices de fixação, os quais assumem modelos distintos de evolução dos microssatélites; o F_{ST} , que assume o modelo de alelos infinitos (*Infinite Alleles Mutation*, IAM), e o R_{ho} , que assume o modelo de mutação por passos (*Stepwise Mutation Model*, SMM). De acordo com o IAM (Kimura & Crow, 1964), cada mutação cria um novo alelo seguindo-se uma taxa de mutação μ . Conseqüentemente, este modelo não admite a ocorrência de homoplasia. Já o SMM (Kimura & Otha, 1978) assume um cenário em que cada mutação cria um novo alelo, tanto adicionando quanto excluindo uma unidade de repetição do microssatélite com igual probabilidade, $\mu/2$, em ambas as direções. Conseqüentemente, alelos com tamanhos diferentes seriam mais distantemente relacionados do que alelos com tamanhos similares. Além disso, homoplasia é admitida.

Os valores de F_{ST} foram calculados de acordo com Weir e Cockerham (1984). Para se testar se os valores diferiram significativamente de zero foi utilizado o procedimento de randomização implementado no software FSTAT

(versão 2.9.3.2) (Goudet, 1995), não assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos foram permutados aleatoriamente entre as duas populações de cada par. Para cada um destes pares de populações criados por randomização foi construída uma tabela de contingência de alelos versus amostra, e a probabilidade da distribuição alélica ser idêntica entre as duas populações foi obtida através do *log-likelihood (G) exact test*, (Goudet *et al.*, 1996). Com isto, obteve-se uma distribuição de valores de G (distribuição nula) que puderam ser comparados com o valor de G obtido para a amostra observada. A proporção de valores de G obtidos por randomização que foram maiores ou iguais ao valor observado representa a probabilidade de F_{ST} diferir significativamente de zero.

O R_{ho} (Goodman, 1997) é um derivado do R_{ST} de Slatkin (1995) implementado no software Rst Calc (Goodman, 1997). O R_{ST} original estima a diferenciação genética levando-se em consideração a variância do tamanho dos alelos dentro e entre as populações. Ele assume que as amostras tenham tamanhos iguais e que todos os *loci* tenham variâncias equivalentes. No entanto, esta situação é raramente encontrada na natureza. Para contornar o problema da variância de tamanho dos alelos Rst Calc transforma os dados de maneira que cada alelo passa a ser expresso não mais pelo número de unidades de repetição, mas sim pelo desvio padrão em relação à média global do número de repetições.

Isto também reduz os efeitos resultantes do fato de os tamanhos amostrais serem diferentes. Assim, a fórmula do R_{ho} é expressa como:

$$R_{ho} = S_b / (S_b + S_W)$$

Onde: S_b = componente de variância obtido juntando-se as duas populações.
 S_W = duas vezes a média das variâncias obtidas dentro de cada população.

As probabilidades de que os valores de R_{ho} tenham diferido significativamente de zero foram calculadas através do procedimento de randomização apresentado no software Rst Calc, sendo o valor de P representado pela proporção de randomizações que resultaram em valores de R_{ho} maiores ou iguais ao valor obtido para a amostra observada.

4.7.4. Isolamento pela distância

A existência de isolamento pela distância entre as populações foi estimada testando-se a ocorrência de correlação linear entre distância genética (valores de F_{ST}) e a distância geográfica (km) dos pares de populações. Para isto, foi utilizado o teste de Mantel. A significância do teste foi obtida através do procedimento de randomização apresentado no programa ISOLD, implementado no software GENEPOP. Primeiramente foi construída uma semi-matriz de valores de F_{ST} versus o logaritmo natural das distâncias geográficas (\ln km), e um coeficiente de correlação foi calculado para a mostra observada. Em seguida,

o coeficiente de correlação foi calculado em amostras criadas por randomização, nas quais os valores das linhas e colunas da semi-matriz foram aleatoriamente trocados de posição. Com isto, criou-se uma distribuição nula de valores do coeficiente de correlação, e a significância do teste foi dada como sendo a proporção de randomizações que resultaram em valores maiores ou iguais ao valor obtido para a amostra observada.

4.7.5. Detecção de migrantes de primeira geração utilizando-se assignment tests

O objetivo dos *assignment tests* é atribuir ou excluir indivíduos das populações onde foram amostrados, além de detectar a possível população de origem com base em seus genótipos (Pritchard *et al.*, 2000; Piry *et al.* 2004). Dado que estes métodos permitem inferir sobre onde um determinado indivíduo foi ou não nascido, eles possibilitam estimar migração em tempo real (Paetkau *et al.* 2004; Rannala & Mountain, 1997).

Para cada indivíduo aqui analisado foi calculada a probabilidade de pertencer, bem como a probabilidade de ser excluído da população onde foi amostrado, utilizando-se o software GENECLASS2 (Piry *et al.*, 2004). Esta análise parte de populações pré-definidas e aplica um critério frequentista (Paetkau *et al.*, 1995) e um critério Bayesiano (Rannala & Mountain, 1997) para o cálculo das probabilidades. Para aqueles indivíduos detectados como

imigrantes, foram calculadas também as probabilidades de serem excluídos das demais populações amostradas.

Para o cálculo da probabilidade de cada indivíduo pertencer à população onde foi capturado, este programa oferece três opções: calcular diretamente a probabilidade de cada genótipo individual pertencer à população onde foi amostrado (L_{home}); calcular a proporção de L_{home} em relação ao maior valor de probabilidade encontrado para um determinado indivíduo entre todas as populações amostradas, incluindo aquela onde foi capturado (L_{home}/L_{max}) ou calcular a proporção de L_{home} em relação ao maior valor de probabilidade encontrado para um determinado indivíduo entre todas as populações amostradas excluindo-se aquela onde foi capturado ($L_{home}/L_{max_not_home}$). Dado que muito possivelmente algumas populações que são potenciais fontes de indivíduos imigrantes não foram amostradas, a probabilidade de cada genótipo individual pertencer à população onde o indivíduo foi capturado foi calculada utilizando-se diretamente L_{home} , como sugerido por Paetkau *et al.* (2004) e Piry *et al.* (2004).

Para o cálculo das probabilidades dos indivíduos serem excluídos das populações onde foram amostrados foi utilizado o procedimento de randomização (Monte Carlo) de Paetkau *et al.* (2004), implementado no software GENECLASS2. Genótipos multilocus foram criados aleatoriamente a partir dos

gametas multilocus amostrados, mantendo-se o tamanho das populações. Posteriormente, o L_{home} foi calculado para cada indivíduo simulado, exceto ele próprio (*leave-one-out-procedure*). Com isto, cria-se uma distribuição de valores de L_{home} simulados. A probabilidade de um determinado genótipo presente na população observada ser de um indivíduo imigrante pode ser determinada a partir do *ranking* de seu valor de L_{home} observado na distribuição obtida por randomização. Um valor de $\alpha = 0,05$ foi utilizado, por ter demonstrado ser o mais adequado quando utilizando-se L_{home} (Paetkau *et al.*, 2004).

4.7.6. Dispersão diferencial entre os sexos

O número de indivíduos imigrantes detectados foi utilizado para se comparar dispersão diferencial entre os sexos. Para isto foi construída uma tabela de contingência comparando-se as proporções de machos e fêmeas residentes e imigrantes encontrados ao longo de todas as populações. A significância foi testada aplicando-se o teste G, utilizando-se o software BioEstat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000). Além disso, foram comparados os valores de L_{home} obtidos para machos e fêmeas, utilizando-se os procedimentos frequentista e Bayesiano, através de um teste t.

4.7.7. Estimativas indiretas de fluxo gênico

Estimativas indiretas do número efetivo de migrantes (N_m) foram obtidas para cada par de populações utilizando-se dois métodos distintos; um método baseado nos valores de F_{ST} (Wright, 1943; $N_m = \{1 - F_{ST}\}/4F_{ST}$) e um método baseado na frequência de alelos privados (Slatkin, 1985; $\ln pl = a \ln (N_m) + b$). No método dos alelos privados pl representa a média das frequências dos alelos privados nas duas populações, e a e b são constantes dependentes do tamanho das amostras. Esta análise foi realizada utilizando-se o software GENEPOP.

4.7.8. Verificação da influência das áreas degradadas de Cubatão na conectividade entre os dois grandes blocos de floresta

Se a distância genética encontrada para os pontos de amostragem que flanqueiam a região de Cubatão se apresentar significativamente maior do que a distância genética entre pontos de cada um dos lados contínuos não degradados, isto significa que o grau de impacto encontrado nesta área pode estar reduzindo o fluxo gênico entre as aves da Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba. Para testar esta hipótese, o valor de F_{ST} encontrado para Caraguatatuba versus Carlos Botelho (áreas que flanqueiam Cubatão) foi comparado com os valores obtidos para Caraguatatuba versus Picinguaba e Carlos Botelho versus PETAR (áreas dentro dos contínuos não degradados) corrigidos para a distância geográfica

encontrada entre Caraguatatuba e Carlos Botelho. Esta correção foi realizada assumindo-se a existência de correlação linear entre distância geográfica e distância genética. Comparou-se também o valor de F_{ST} esperado de acordo com a fórmula obtida na análise de correlação pela distância (teste de Mantel) com o valor observado. Além disso, testou-se a possibilidade de Cubatão funcionar como um sumidouro de indivíduos devido ao alto grau de devastação. Para isto, foram comparadas, através de um teste G, as proporções de indivíduos imigrantes e residentes detectados através do *assignment test* para Cubatão e para as demais áreas.

5. RESULTADOS

5.1. Amostragens

Entre 2003 e 2005 foram capturados 143 indivíduos de *C. caudata*. O número de horas de captura, número de horas/rede e o número de indivíduos capturados para cada área são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Total de horas de captura, número de horas/rede e número de indivíduos capturados para cada área de coleta.

Área	Total de horas de captura	*Número de horas/rede	Número de indivíduos capturados
<i>Núcleo Caraguatatuba</i>	149:30h	2.108,6	20
<i>Núcleo Picinguaba</i>	129:00h	1.097	30
<i>Núcleo Cubatão</i>	66:00h	354	22
<i>PETAR</i>	72:00h	324	32
<i>Carlos Botelho</i>	98:00h	582	39

*Uma hora/rede equivale à uma hora de captura com uma rede de 12 X 2,5 m.

Obs: O número de horas gasto na localização dos animais, bem como para a montagem das redes não foi aqui considerado.

5.2. Isolamento e caracterização dos loci de microssatélites para *C. caudata*

5.2.1. Método PIMA

Foram selecionados os iniciadores de RAPD A10, A20, B11, B14, B20 (Garcia *et al.*, 1994) e 459 (Tassanakajon *et al.*, 1997) por serem estes os que resultaram em várias bandas e na não amplificação do controle. O padrão de bandas obtido com estes produtos de RAPD após a junção e purificação é apresentado na figura 8.

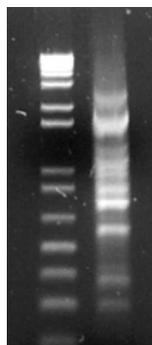


Figura 8. Produtos de RAPD utilizados para o isolamento de *loci* de microssatélites através da metodologia PIMA após purificação (*ladder* de 1kb).

Após o procedimento de clonagem, foram obtidas no total 442 colônias recombinantes (Anexo 1). Trinta e três delas (7,5%) foram selecionadas para seqüenciamento por apresentarem duas bandas no gel, sendo a maior delas menor do que 1 kb. Das 66 seqüências obtidas (*forward* e *reverse*), dois *loci* de microssatélites foram encontrados (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição dos *loci* de microssatélites isolados para *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae) através da metodologia PIMA.

<i>Locus</i>	Descrição	Iniciadores	*Tamanho
<i>CHIR1</i>	(GA) ₂ GT (GA) ₁₁ 5' GCA TAA ACA ATC AGT GAC AAC 3' GG (GA) ₃ AA 5' GTT TGG TTG GGT AGG GAT 3' (GA) ₄		141pb
<i>CHIR2</i>	(GT) ₂ AT (GT) ₄ GA 5' TCA GAT AAC ATT TAC AAT GAA CG 3' (GT) ₃ (GA) ₆ 5' CTA TTT ATC TCT ACC CCA CCT AT 3'		147pb

*Tamanho esperado do produto de amplificação.

5.2.1.1. Padronização das reações de amplificação e caracterização dos *loci*

A melhor condição de amplificação para o *locus CHIR1* foi obtida utilizando-se 150 ng de DNA e uma concentração de MgCl₂ de 2,5 mM. Para o *locus CHIR2*, embora a concentração de MgCl₂ mais adequada tenha sido também 2,5 mM, melhores resultados foram obtidos com uma quantidade de DNA de 100 ng. A temperatura de *melting* mais adequada para o *locus CHIR1* foi 55°C, e para o *locus CHIR2* foi 53°C. No entanto, ambos os *loci* apresentaram-se monomórficos.

5.2.2. Método dos beads magnéticos

De um total de 900 colônias replaqueadas, 550 foram crescidas em meio LB líquido para realização das mini-preps. As primeiras 172 colônias foram amplificadas via PCR utilizando-se os *primers* M13F e M13R para verificação do tamanho dos insertos, e destas, 106 foram escolhidas para serem seqüenciadas (Anexo 2). Vinte e duas seqüências (20,75%) apresentaram *loci* de microsatélites constituídos de um número mínimo de cinco repetições sem interrupção. Dez destes *loci* (45,45%) amplificaram com sucesso e apresentaram polimorfismo quando analisados em géis de poliacrilamida (Anexo 3). Os demais *loci* foram monomórficos. Embora o enriquecimento tenha sido realizado com sondas para microsatélites tetranucleotídicos, os *loci* dinucleotídicos foram os mais comuns ($n = 7$) (Tabela 6).

Para os 10 *loci* polimórficos, após todos os indivíduos terem sido analisados em seqüenciador automático, o número de alelos por *locus* variou de 5 a 28 (Tabela 6), e as heterozigoses observadas variaram de 0,61 a 0,90 (Tabela 7). Apenas quatro dos 45 pares de *loci* analisados se apresentaram significativamente ligados ($P > 0,05$) (Tabela 8). Quando o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado juntando-se todas as populações, seis *loci* apresentaram níveis significativos de perda de heterozigose através do *score test*, e quatro

deles apresentaram valores de F_{IS} positivos e significativamente diferentes de zero (Tabela 7).

Tabela 6. Sequências dos *primers*, unidades repetitivas dos *loci*, temperatura ótima de *annealing* (T_a °C), tamanho do clone, número de alelos e número de indivíduos analisados (N) para 23 *loci* de microssatélites isolados para *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae).

<i>Locus</i>	Sequências dos <i>primers</i>	Microssatélite	T_a (°C)	Clone (pb)	Nº. alelos (N)
Polimórficos					
<i>CHIR1-16</i>	5' - AGAGCCACCTAGTTAAACTGC - 3' 5' - TTAGATCACCTGGTGTATGTT - 3'	(GATA) ₂ AATA (GATA) ₁₁ GACA (GATA) ₂	50,0	161pb	28 (143)
<i>CHIR1-18</i>	5' - TTACCTAGAAGCAGAGGTAG - 3' 5' - ACTCTGATGAAATGGTATGC - 3'	(CA) ₁₄	45,0	164pb	17 (143)
<i>CHIR2-9</i>	5' - CACTCTTACTACTCAACATATTC - 3' 5' - ACTGCTAAGAGAGAATACCAG - 3'	(CA) ₆ CG(CA) ₁₄	51,0	141pb	24 (143)
<i>CHIR3-2</i>	5' - TTTCACCTTGGGAACAGCTC - 3' 5' - AATCACAGGCAAGCCTTCAG - 3'	(AC) ₁₀	55,0	159pb	7 (143)
<i>CHIR3-15</i>	5' - AGTAAGATAGTAGTGGGAATCG - 3' 5' - TACTGCTACATGCTACAGACC - 3'	(CAA) ₁₀	49,3	156pb	14 (143)
<i>CHIR3-22</i>	5' - TGAAGTCCAGAGACAACAG - 3' 5' - GAACATAATGCAACTTCTGAG - 3'	(GT) ₃ GCAC (GT) ₁₆	52,4	167pb	14 (143)
<i>CHIR3-27</i>	5' - TGCATGAATGGTGAAAGATGTC - 3' 5' - GCAGAATCACCCATAAGAGACTG - 3'	(CA) ₁₃	51,0	226pb	18 (143)
<i>CHIR4-21</i>	5' - TCATCTGAACAGTAGAGCTTTCTC - 3' 5' - CTTATCAACATTCTTCTCCCATAG - 3'	(CAAA) ₇	49,3	186pb	5 (143)
<i>CHIR4-33</i>	5' - AAAGCTGTGAACACGTAAGTGC - 3' 5' - AATCTCCACTTTGTGGGACAG - 3'	(CT) ₇ (CA) ₁₄ (TA) ₃ (CA) ₄	49,3	153pb	19 (143)
<i>CHIR4-34</i>	5' - TCTCATCACACACTCCCTTGAG - 3' 5' - TGTTCTTTCTTCCAGCTTCTGAC - 3'	(CA) ₁₂ GACG(CA) ₇	49,3	217pb	18 (143)
Monomórficos					
<i>CHIR1-19</i>	5' - CTTTAATGCCACCCAATAAG - 3' 5' - GTCCGGAATAAAGACAAGTG - 3'	(GAT) ₉ (TAT) ₈	46,7	177pb	1 (24)
<i>CHIR1-31</i>	5' - TTCTTCCAAAGGTCTCTGCAC - 3' 5' - AAGGCCTAGCTAGCAGAATCAC - 3'	(CAAA) ₆	54,8	213pb	1 (24)
<i>CHIR2-1</i>	5' - GTTTAAGGCCTAGCTAGCAG - 3' 5' - TGAAAGGGACTGAGAATGC - 3'	(CA) ₆ AA (CA) ₁₅	45,0	163pb	1 (24)
<i>CHIR2-26</i>	5' - TGCATGTCTTTCATTTCG - 3' 5' - TAGCTAGCAGAATCACACAG - 3'	(CT) ₃₆	45,0	227pb	1 (24)
<i>CHIR2-31</i>	5' - GTAAATTGCAGATACATCAAACC - 3' 5' - TAAGGCCTAGCTAGCAGAATC - 3'	(CCTGT) ₇ (CCTAT) ₆ (CCTGT) ₁₀	47,4	208pb	1 (24)
<i>CHIR3-1</i>	5' - CTAGCAGAATCGCTTCATCG - 3' 5' - AGAACAGTTCCCAGATGATGG - 3'	(AT) ₇	45,0	200pb	1 (24)
<i>CHIR3-18</i>	5' - ACTAATGCAACTTCTGAGTG - 3' 5' - ATACTCACAATCCTCAACG - 3'	(CA) ₁₄ TG (CA) ₄	45,0	214pb	1 (24)
<i>CHIR3-20</i>	5' - ATTCGCCCTCTGTGTTAAGG - 3' 5' - AGTGCTGTTGGGTTTGAAG - 3'	(CAA) ₆	57,8	158pb	1 (24)

<i>CHIR3-34</i>	5' – CCTTTGTTAAGATCTAATCCACACAG – 3' 5' – CAGAATCACAAGGCAACACAG – 3'	(GT) ₇ (GGGT) ₃ (GT) ₄ GG (GT) ₄ ATATGG (GT) ₄	55,0	114pb	1 (24)
<i>CHIR4-15</i>	5' – GGTGCATTACATGCATATAGGAG – 3' 5' – ACATAGTGTTCACACACAGC – 3'	(GT) ₅ AT (GT) ₃	55,0	180pb	1 (24)
<i>CHIR4-17</i>	5' – TAAGGCCTAGCCTAGCAGAATC – 3' 5' – CTGCATCATCTGCAAGGAAC – 3'	(GTTT) ₇	49,3	198pb	1 (24)
<i>CHIR4-22</i>	5' – AATGATAAATGTGACTGCAC – 3' 5' – AGTCATTAAGTTACTCCCTTG – 3'	(CAA) ₃ C (CAA) ₃ CAG (CAA) ₅ CAG (CAA) ₂ CA (CAA) ₁ CAGCA (CAA) ₆	45,0	194pb	1 (24)

Tabela 7. Estimativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg em 10 *loci* polimórficos de microssatélites isolados para o Tangará-dançarino. (N) número de indivíduos analisados, (H_O) heterozigose observada, (H_E) heterozigose esperada, (P_d) probabilidade de déficit de heterozigotos calculada utilizando-se o *score test*, (S.E.) erro padrão associado a este cálculo de déficit de heterozigose, (F_{IS}) coeficiente de endocruzamento e (P) probabilidade de os valores de F_{IS} diferirem significativamente de zero (10.000 randomizações).

Locus	N	H_O	H_E	P_d	S.E.	F_{IS}	P
<i>CHIR1-16</i>	143	0,804	0,936	0,000*	0,000	0,141	0,005*
<i>CHIR1-18</i>	143	0,902	0,893	0,476	0,022	-0,010	0,720
<i>CHIR2-9</i>	143	0,902	0,901	0,623	0,023	-0,001	0,600
<i>CHIR3-2</i>	143	0,615	0,654	0,017*	0,001	0,060	0,175
<i>CHIR3-15</i>	143	0,769	0,862	0,000*	0,000	0,109	0,005*
<i>CHIR3-22</i>	143	0,860	0,781	0,997	0,001	-0,102	1,000
<i>CHIR3-27</i>	143	0,699	0,859	0,000*	0,000	0,187	0,005*
<i>CHIR4-21</i>	143	0,699	0,664	0,482	0,007	-0,053	0,850
<i>CHIR4-33</i>	143	0,832	0,871	0,010*	0,002	0,045	0,080
<i>CHIR4-34</i>	143	0,671	0,864	0,000*	0,000	0,223	0,005*

(*) representa os valores estatisticamente significativos.

Tabela 8. Probabilidade da ocorrência de equilíbrio de ligação (P) para os pares de *loci* de microssatélites isolados para o Tangará-dançarino considerando-se todas as populações amostradas juntamente, através do *Fisher Exact Test*. S.E. é o erro padrão associado a este cálculo.

Locus	P	S.E.
1-16 X 1-18	0,163	0,008
1-16 X 2-9	1,000	0,000
1-18 X 2-9	0,977	0,003
1-16 X 3-2	0,041 *	0,004
1-18 X 3-2	0,684	0,008
2-9 X 3-2	0,075	0,004

1-16 X 3-15	0,420	0,010
1-18 X 3-15	0,599	0,010
2-9 X 3-15	0,457	0,010
3-2 X 3-15	0,523	0,009
1-16 X 3-22	0,073	0,005
1-18 X 3-22	0,442	0,010
2-9 X 3-22	0,666	0,010
3-2 X 3-22	0,091	0,004
3-15 X 3-22	0,448	0,010
1-16 X 3-27	0,687	0,010
1-18 X 3-27	0,973	0,003
2-9 X 3-27	0,448	0,011
3-2 X 3-27	0,187	0,007
3-15 X 3-27	0,636	0,010
3-22 X 3-27	0,697	0,009
1-16 X 4-21	0,308	0,009
1-18 X 4-21	0,715	0,008
2-9 X 4-21	0,416	0,009
3-2 X 4-21	0,004 *	0,000
3-15 X 4-21	0,393	0,009
3-22 X 4-21	0,282	0,008
3-27 X 4-21	0,379	0,009
1-16 X 4-33	0,367	0,010
1-18 X 4-33	0,935	0,005
2-9 X 4-33	0,927	0,005
3-2 X 4-33	0,299	0,008
3-15 X 4-33	0,029 *	0,003
3-22 X 4-33	0,225	0,009
3-27 X 4-33	0,920	0,005
4-21 X 4-33	0,698	0,008
1-16 X 4-34	0,928	0,005
1-18 X 4-34	0,002 *	0,000
2-9 X 4-34	0,224	0,009
3-2 X 4-34	0,820	0,007
3-15 X 4-34	0,842	0,007
3-22 X 4-34	0,932	0,005
3-27 X 4-34	0,325	0,010
4-21 X 4-34	0,521	0,009
4-33 X 4-34	0,845	0,007

(*) representa os valores estatisticamente significativos.

5.3. Caracterização da variabilidade genética intrapopulacional

Na tabela 9 são apresentados os níveis de variabilidade encontrados em cada população individualmente. Todas as populações analisadas apresentaram déficits significativos de heterozigotos quando a média de todos os *loci* foi considerada. Além disso, os valores médios de F_{IS} foram todos positivos e diferiram significativamente de zero, com exceção de Cubatão, que foi também positivo, mas não significativamente diferente de zero. No entanto, nenhum dos *loci* apresentou déficit significativo de heterozigose em todas as populações analisadas. Além disso, muitos dos *loci* que apresentaram déficits significativos de heterozigose em determinadas populações apresentaram excesso de heterozigotos em outras (*CHIR1-16*, *CHIR3-2*, *CHIR3-27* e *CHIR4-33*), o que é evidenciado pelos valores negativos (no entanto não significativos) de F_{IS} . Tal fato sugere que os déficits de heterozigose média encontrados para cada população, bem como para cada *locus* juntando-se todas as populações, sejam resultado de endocruzamento e/ou deriva, e não de alelos nulos. Além disso, indivíduos que não amplificaram nenhuma banda para um determinado *locus* não foram observados, o que sugere que se alelos nulos estiverem presentes, seus efeitos devem ser reduzidos.

Tabela 9. Número de indivíduos analisados (N), heterozigotes observada (H_O) e esperada (H_E) e o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) calculados para cinco populações do Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata*, distribuídas ao longo do maior contínuo restante da mata Atlântica. P_d é o valor de significância para a diferença entre H_O e H_E (déficit de heterozigotos). S.E. é o erro padrão associado ao cálculo de P_d . P_f é a probabilidade dos valores de F_{IS} diferirem significativamente de zero, obtidos a partir de 100.000 randomizações.

	N	H_O	H_E	P_d	S.E.	F_{IS}	P_f
Picinguaba							
CHIR 1-16	30	0,766	0,928	0,002*	0,000	0,177	0,006*
CHIR 1-18	30	0,833	0,915	0,012*	0,001	0,090	0,111
CHIR 2-9	30	0,966	0,925	0,897	0,004	-0,045	0,915
CHIR 3-2	30	0,666	0,608	0,535	0,003	-0,097	0,846
CHIR 3-15	30	0,733	0,846	0,048*	0,002	0,135	0,049*
CHIR 3-22	30	0,833	0,723	0,928	0,001	-0,155	0,963
CHIR 3-27	30	0,666	0,871	0,000*	0,000	0,238	0,001*
CHIR 4-21	30	0,766	0,658	0,687	0,002	-0,167	0,982
CHIR 4-33	30	0,900	0,889	0,646	0,006	-0,012	0,685
CHIR 4-34	30	0,700	0,907	0,001*	0,000	0,232	0,001*
Média	30			0,000*	0,000	0,054	0,019*
Caraguatatuba							
CHIR 1-16	20	0,750	0,862	0,011*	0,001	0,133	0,085
CHIR 1-18	20	0,850	0,863	0,315	0,007	0,016	0,527
CHIR 2-9	20	0,850	0,865	0,497	0,008	0,018	0,512
CHIR 3-2	20	0,750	0,696	0,063	0,001	-0,080	0,789
CHIR 3-15	20	0,750	0,877	0,030*	0,001	0,148	0,068
CHIR 3-22	20	0,950	0,793	0,998	0,000	-0,203	0,996
CHIR 3-27	20	0,550	0,785	0,000*	0,000	0,304	0,007*
CHIR 4-21	20	0,700	0,665	0,093	0,000	-0,053	0,723
CHIR 4-33	20	0,800	0,854	0,127	0,004	0,065	0,290
CHIR 4-34	20	0,500	0,827	0,000*	0,000	0,402	0,001*
Média	20			0,000*	0,000	0,082	0,003*
Cubatão							
CHIR 1-16	22	0,682	0,921	0,001*	0,000	0,264	0,001*
CHIR 1-18	22	0,954	0,898	0,923	0,003	-0,064	0,915
CHIR 2-9	22	0,863	0,868	0,197	0,006	0,006	0,564
CHIR 3-2	22	0,409	0,630	0,012*	0,000	0,356	0,033*
CHIR 3-15	22	0,773	0,883	0,066	0,002	0,127	0,098
CHIR 3-22	22	0,909	0,784	0,960	0,000	-0,163	0,967
CHIR 3-27	22	0,818	0,777	0,349	0,006	-0,054	0,793
CHIR 4-21	22	0,818	0,628	0,991	0,000	-0,310	0,992

CHIR 4-33	22	0,864	0,895	0,191	0,005	0,036	0,406
CHIR 4-34	22	0,773	0,869	0,013*	0,001	0,114	0,132
Média	22			0,001*	0,000	0,037	0,111
Carlos Botelho							
CHIR 1-16	39	0,923	0,889	0,717	0,006	-0,039	0,835
CHIR 1-18	39	0,923	0,880	0,933	0,003	-0,049	0,882
CHIR 2-9	39	0,846	0,903	0,284	0,008	0,064	0,158
CHIR 3-2	39	0,641	0,678	0,306	0,003	0,056	0,342
CHIR 3-15	39	0,769	0,830	0,101	0,003	0,075	0,187
CHIR 3-22	39	0,846	0,790	0,754	0,006	-0,071	0,883
CHIR 3-27	39	0,692	0,842	0,025*	0,002	0,180	0,015*
CHIR 4-21	39	0,641	0,639	0,478	0,003	-0,003	0,576
CHIR 4-33	39	0,820	0,846	0,309	0,005	0,031	0,388
CHIR 4-34	39	0,615	0,849	0,000*	0,000	0,278	0,001*
Média	39			0,007*	0,002	0,054	0,008*
PETAR							
CHIR 1-16	32	0,812	0,953	0,001*	0,000	0,150	0,003*
CHIR 1-18	32	0,937	0,896	0,855	0,005	-0,047	0,867
CHIR 2-9	32	0,968	0,883	0,795	0,006	-0,099	0,990
CHIR 3-2	32	0,594	0,666	0,166	0,002	0,110	0,257
CHIR 3-15	32	0,812	0,869	0,239	0,005	0,067	0,231
CHIR 3-22	32	0,812	0,775	0,826	0,005	-0,049	0,761
CHIR 3-27	32	0,750	0,802	0,099	0,006	0,066	0,284
CHIR 4-21	32	0,625	0,705	0,217	0,002	0,116	0,187
CHIR 4-33	32	0,781	0,871	0,005*	0,001	0,104	0,086
CHIR 4-34	32	0,750	0,861	0,062	0,003	0,131	0,057
Média	32			0,000*	0,000	0,054	0,007*

(*) representa os valores estatisticamente significativos.

5.4. Estruturação populacional

Os valores de F_{ST} encontrados foram moderados, no entanto, significativos para a maioria dos pares de populações (Tabela 10). Os valores variaram de -0,0002 a 0,023. A população de Caraguatatuba não diferiu significativamente quando comparada com suas populações adjacentes, sendo Picinguaba ao norte e

Cubatão ao sul. Para todos os demais pares de populações os valores de F_{ST} foram significativamente diferentes de zero.

Uma correlação extremamente significativa foi encontrada entre os valores de F_{ST} e o logaritmo natural das distâncias geográficas lineares dos diferentes pares de populações (teste de Mantel; $P = 0,008$; 100.000 randomizações), sugerindo a ocorrência de um padrão de diferenciação caracterizado pelo isolamento pela distância (Figura 9).

As medidas de diferenciação utilizando o segundo índice de fixação (R_{ho}) não detectaram divergências significativas entre as populações do Parque Estadual da Serra do Mar (Picinguaba, Caraguatatuba e Cubatão). Por outro lado, reforçou a existência de diferenciação entre as duas populações amostradas na Serra de Paranapiacaba (Carlos Botelho e PETAR) (Tabela 10). No entanto, alguns resultados incoerentes foram obtidos. Especificamente, tanto Picinguaba quanto Cubatão divergiram significativamente de Carlos Botelho, mas não do PETAR, que se encontra mais distante geograficamente. Similarmente, Caraguatatuba não divergiu significativamente de Carlos Botelho, mas Cubatão, que está mais próximo desta área diferiu significativamente. Também não foi encontrada correlação linear significativa entre os valores de Rho e distância geográfica (teste de Mantel; $P = 0,516$; 100.000 randomizações).

Tabela 10. Estimativas da distância genética e do fluxo gênico entre cinco populações do Tangará-dançarino. F_{ST} foi calculado de acordo com Weir e Cockerham (1984) e P_f é a probabilidade de que ele tenha diferido significativamente de zero, a qual foi obtida através do procedimento de randomização implementado no software FSTAT (10.000 randomizações) (Goudet, 1995). R_{ho} foi calculado utilizando-se o software Rst Calc (Goodman, 1997) e a probabilidade de que os valores tenham diferido significativamente de zero (P) foi também obtida através de um procedimento de randomização implementado no programa (10.000 randomizações). N_m é uma estimativa do fluxo gênico efetivo derivada do F_{ST} , e N_m^* é uma estimativa de fluxo gênico baseada nas frequências de alelos privados. Km é a distância geográfica linear existente entre os pares de populações.

Par de Populações	F_{ST}	P_f	R_{ho}	P	N_m	N_m^*	Km
Picinguaba X Cubatão	0,0089	0,020*	0,0006	0,473	27,839	3,696	179,3
Picinguaba X Carlos Botelho	0,0160	0,005*	0,0245	0,009*	15,375	3,910	332,2
Picinguaba X PETAR	0,0227	0,005*	0,0103	0,124	10,763	3,125	415,0
Caraguatatuba X Picinguaba	0,0052	0,325	-0,0001	0,491	47,826	5,176	68,2
Caraguatatuba X Cubatão	-0,0002	0,185	0,0119	0,207	1249,75	3,656	110,0
Caraguatatuba X Carlos Botelho	0,0144	0,005*	0,0087	0,196	17,111	2,975	266,2
Caraguatatuba X PETAR	0,0171	0,005*	0,0112	0,143	14,369	3,523	344,3
Cubatão X Carlos Botelho	0,0076	0,005*	0,0461	0,001*	32,645	2,978	154,0
Cubatão X PETAR	0,0117	0,005*	0,0030	0,321	21,117	3,718	233,2
Carlos Botelho X PETAR	0,0108	0,005*	0,0637	0,000*	22,898	2,679	85,8

(*) representa os valores estatisticamente significativos.

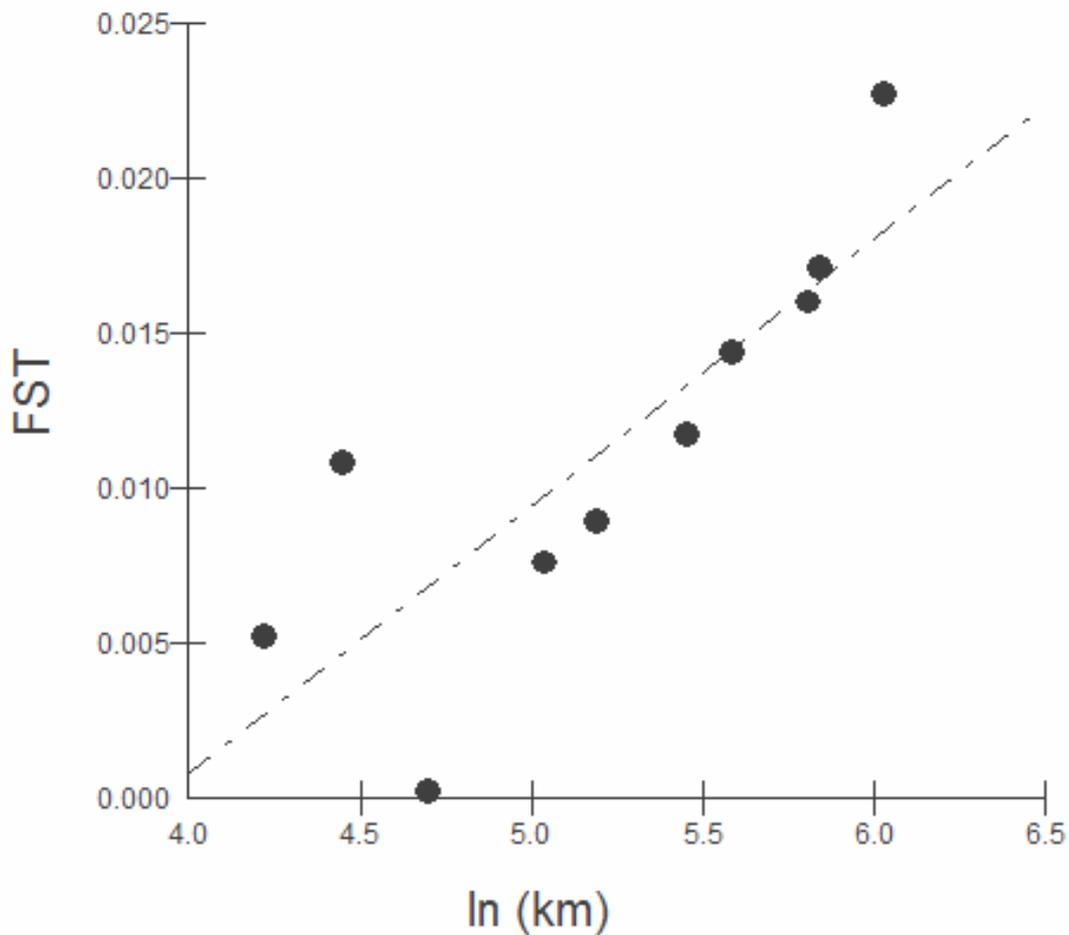


Figura 9. Plotagem dos valores de F_{ST} e o logaritmo natural das distâncias geográficas lineares dos pares de populações. A equação linear da reta ajustada é $\{F_{ST} = - 0.0339 + 0.0086 \ln(\text{km})\}$.

5.5. Número efetivo de migrantes e número de alelos privados

O número efetivo de migrantes variou de moderado a alto entre os diferentes pares de populações. Os valores obtidos através do método baseado nos valores de F_{ST} foram várias ordens de magnitude maiores do que os valores obtidos pelo método dos alelos privados. Enquanto os valores obtidos através do

F_{ST} variaram de 10,76 a 1.250,25, os alelos privados mostraram valores que variaram de 2,68 a 5,18 (Tabela 10).

Apenas o *locus* *CHIR4-21* não apresentou alelos privados. Dos 164 alelos encontrados neste estudo, 39 (23,8%) estavam presentes numa única população. As populações apresentaram individualmente entre 4 (Cubatão) e 12 (PETAR) alelos privados ($7,80 \pm 3,19$), representando 4,1 a 10,4% do número total de alelos dentro de uma população. O número médio de alelos privados por *locus* foi $3,90 \pm 2,51$, e as frequências destes alelos dentro das populações onde foram encontrados variou de 0,013 a 0,068.

5.6. Detecção de migrantes de primeira geração

Os critérios frequentista e Bayesiano utilizados para se estimar a probabilidade de cada indivíduo pertencer a uma dada população excluíram 22 aves das localidades onde foram capturadas ($P < 0,05$), sugerindo que estes sejam potenciais imigrantes de primeira geração (Tabela 11). Onze destes indivíduos foram excluídos de todas as populações estudadas, indicando que possam ter emigrado de populações não amostradas. Por outro lado, cinco indivíduos não puderam ser excluídos de mais de uma área, o que impediu a determinação de suas origens exatas. Apenas cinco aves detectadas como imigrantes foram atribuídas a apenas uma potencial população de origem, não

tendo sido excluídas de apenas uma das populações amostradas. Três indivíduos capturados em Picinguaba não foram excluídos apenas de Caraguatatuba, enquanto um indivíduo amostrado em Caraguatatuba não pôde ser excluído apenas de Picinguaba. Um imigrante detectado no PETAR também não pôde ser excluído apenas de Caraguatatuba (Tabela 12).

Tabela 11. Probabilidade de cada indivíduo pertencer à população onde foi capturado (L_home) calculada através da do *assignment test* (Piry *et al.*, 2004) utilizando-se dois tipos de procedimentos; o procedimento frequentista e o Bayesiano. *P* é a probabilidade de cada indivíduo ser excluído da população de origem, obtido através do procedimento de randomização (Monte Carlo) de Paetkau *et al.* (2004), implementado no software GENECLASS2. (M) representa os machos e (F) as fêmeas.

Picinguaba				
Sexo	Método de Frequentista		Método Bayesiano	
	L_Home	<i>P</i>	L_Home	<i>P</i>
M	19,931	0,0104*	22,23	0,0067*
F	16,989	0,2154	18,977	0,1073
M	15,33	0,5827	15,3	0,6814
M	16,691	0,2757	16,537	0,4291
F	16,25	0,0671	16,943	0,0921
M	16,497	0,3066	16,509	0,4258
M	16,584	0,2872	17,47	0,2615
M	14,622	0,7568	15,743	0,5941
F	17,332	0,168	17,129	0,3195
M	17,206	0,179	17,932	0,2066
M	16,635	0,2668	18,833	0,118
M	14,215	0,8457	14,234	0,8795
M	19,085	0,0335*	19,759	0,0682
M	19,089	0,0285*	19,946	0,0556
F	17,735	0,1179	17,39	0,2823
M	17,632	0,1269	19,284	0,0874
M	20,238	0,0081*	22,642	0,0054*
M	16,201	0,3573	17,658	0,2382
F	15,694	0,5007	15,571	0,6377
M	15,865	0,4508	15,883	0,5575
F	17,187	0,1915	16,915	0,3577
M	18,218	0,07	18,786	0,1232
M	16,241	0,3606	16,298	0,47

M	16,481	0,3021	16,526	0,422
M	15,702	0,4804	16,63	0,4115
M	16,645	0,2708	17,55	0,251
M	18,419	0,0621	20,076	0,0512
M	16,926	0,2279	17,824	0,2199
M	17,202	0,1808	18,901	0,1194
F	15,693	0,4854	16,763	0,3786

Caraguatatuba

Indivíduo	Método Frequentista		Método Bayesiano	
	L_Home	P	L_Home	P
M	14,594	0,2282	15,864	0,2472
M	19,571	0,0178*	20,93	0,0466*
M	13,82	0,7151	14,69	0,7541
M	15,688	0,3501	15,745	0,5694
M	17,524	0,0000*	18,263	0,0002*
M	17,433	0,109	19,233	0,1267
F	15,583	0,3796	16,786	0,4043
F	12,873	0,6279	12,862	0,7953
M	18,503	0,0477*	18,718	0,1665
M	14,801	0,5142	15,486	0,6283
F	17,116	0,1578	17,5	0,3047
M	19,083	0,0268*	22,441	0,016*
M	19,699	0,013*	21,23	0,0381*
M	17,013	0,15	18,313	0,2033
F	16,046	0,3004	15,855	0,5563
F	16,636	0,21	18,062	0,2343
M	15,428	0,4052	22,441	0,5036
F	17,744	0,0927	21,23	0,119
M	19,133	0,0279*	18,313	0,0521
M	17,315	0,1236	18,615	0,1784

Cubatão

Indivíduo	Método Frequentista		Método Bayesiano	
	L_Home	P	L_Home	P
M	17,031	0,101	17,425	0,1602
M	15,128	0,3967	15,913	0,3468
M	17,587	0,0598	17,571	0,1442
M	17,915	0,0406*	19,929	0,0244*
M	14,288	0,5867	14,277	0,6543
M	17,962	0,0482*	17,782	0,1265
M	13,99	0,6525	14,824	0,5496
M	17,973	0,0356*	19,394	0,0366*
M	16,055	0,2252	16,635	0,2497
M	16,978	0,1047	17,724	0,134
M	16,71	0,1284	18,096	0,1007

M	17,052	0,0966	18,937	0,0564
M	15,376	0,3549	15,21	0,4712
M	16,603	0,1449	18	0,1086
M	16,185	0,1943	17,693	0,1354
F	16,949	0,1098	17,789	0,1217
M	16,145	0,2026	16,854	0,2181
M	17,557	0,066	18,118	0,107
M	12,429	0,9341	12,365	0,942
M	16,166	0,2021	17,6	0,1402
M	15,298	0,366	15,266	0,4692
M	13,874	0,6953	13,853	0,7387

Carlos Botelho

Indivíduo	Método Frequentista		Método Bayesiano	
	L_Home	P	L_Home	P
M	18,913	0,0122*	21,863	0,0021*
M	15,294	0,4064	15,322	0,5371
M	15,583	0,3463	15,547	0,4912
M	15,491	0,3581	16,463	0,3143
M	16,438	0,1896	17,471	0,1715
F	13,151	0,8659	13,104	0,9567
M	13,824	0,3565	15,749	0,1415
M	11,673	0,8545	11,702	0,9159
M	17,319	0,0849	18,172	0,1012
M	14,855	0,5114	15,847	0,4246
M	16,051	0,2533	17,17	0,2079
F	16,897	0,1279	17,839	0,1306
M	16,637	0,162	16,559	0,2977
M	16,002	0,2667	17,085	0,2109
M	16,505	0,1835	16,959	0,2391
F	17,444	0,0818	16,94	0,2314
F	18,49	0,025*	20,413	0,0154*
M	17,898	0,0429*	19,022	0,0507
M	11,307	0,936	11,316	0,9789
M	16,445	0,1849	17,384	0,1792
M	16,105	0,2446	17,142	0,2058
M	14,481	0,6003	14,529	0,7196
M	14,097	0,6921	14,128	0,8168
F	15,992	0,2692	15,814	0,4353
M	13,151	0,5106	13,159	0,6024
M	15,645	0,3441	15,668	0,4546
M	15,857	0,2903	15,843	0,4311
M	15,417	0,3789	16,474	0,3051
F	16,678	0,1513	17,555	0,1531
M	15,2	0,4373	16,287	0,3452
M	17,729	0,0545	18,697	0,0644
M	14,38	0,6314	14,415	0,7415
F	16,343	0,1986	17,979	0,1135

M	15,861	0,2841	16,732	0,2712
M	15,342	0,404	15,329	0,5323
M	15,156	0,4397	16,35	0,3274
M	14,737	0,5478	14,714	0,6847
M	15,993	0,2671	15,955	0,4159
M	18,46	0,0245*	18,372	0,0956

PETAR

Indivíduo	Método Frequentista		Método Bayesiano	
	L_Home	P	L_Home	P
M	17,058	0,183	16,99	0,2961
M	17,256	0,1494	19,096	0,0785
M	15,006	0,5816	15,952	0,48
M	14,059	0,8	14,919	0,7015
M	16,401	0,271	17,258	0,2603
M	15,079	0,572	15,995	0,4674
M	16,832	0,1998	19,438	0,0694
M	15,571	0,4545	15,588	0,5535
F	16,816	0,2078	18,373	0,1353
M	16,054	0,3459	17,014	0,2867
M	15,832	0,3914	16,851	0,316
M	15,514	0,4667	15,579	0,548
M	17,558	0,1188	17,366	0,2469
M	14,233	0,7652	14,307	0,8061
M	13,65	0,8654	13,674	0,9071
M	16,388	0,2907	17,25	0,2582
F	18,894	0,0326*	18,445	0,1332
M	18,603	0,0432*	18,419	0,1329
M	17,409	0,1291	18,282	0,1437
M	17,453	0,1358	18,342	0,1426
M	16,174	0,3311	17,067	0,2817
M	17,306	0,1448	19,149	0,0867
M	17,317	0,1503	17,161	0,2778
M	20,556	0,0047*	23,514	0,0018*
M	15,031	0,579	15,013	0,6594
M	14,619	0,6758	15,779	0,5141
M	18,332	0,0535	18,61	0,1144
M	18,299	0,0593	18,779	0,1096
M	12,889	0,6968	13,66	0,5608
M	18,801	0,0321*	20,222	0,0393*
M	19,873	0,0078*	21,648	0,0114*
M	14,295	0,7441	14,32	0,81

(*) representa os valores estatisticamente significativos.

Tabela 12. Probabilidade de cada indivíduo detectado como imigrante ser excluído de cada uma das demais populações amostradas, baseando-se nos procedimentos frequentista (Freq.) e Bayesiano (Bay.).

Local de captura	Picinguaba		Caraguatatuba		Cubatão		Carlos Botelho		PETAR	
	Freq.	Bay.	Freq.	Bay.	Freq.	Bay.	Freq.	Bay.	Freq.	Bay.
Caraguatatuba	0,034*	0,073	-	-	0,007*	0,011*	0,049*	0,149	0,018*	0,012*
Caraguatatuba	0,067	0,112	-	-	0,008*	0,011*	0,002*	0,000*	0,010*	0,007*
Caraguatatuba	0,318	0,267	-	-	0,033*	0,042*	0,005*	0,000*	0,035*	0,013*
Caraguatatuba	0,017*	0,009*	-	-	0,012*	0,013*	0,007*	0,007*	0,032*	0,062
Caraguatatuba	0,060	0,050	-	-	0,034*	0,080	0,008*	0,009*	0,029*	0,011*
Picinguaba	-	-	0,015*	0,031*	0,009*	0,010*	0,016*	0,014*	0,038*	0,041*
Picinguaba	-	-	0,084	0,233	0,009*	0,048*	0,004*	0,017*	0,007*	0,028*
Picinguaba	-	-	0,033*	0,043*	0,003*	0,000*	0,002*	0,000*	0,018*	0,008*
<i>Picinguaba</i>	-	-	0,049*	0,193	0,069	0,161	0,053	0,039*	0,061	0,195
<i>Cubatão</i>	0,108	0,076	0,116	0,071	-	-	0,010*	0,009*	0,113	0,068
Cubatão	0,017*	0,045*	0,008*	0,043*	-	-	0,005*	0,005*	0,027*	0,056
<i>Cubatão</i>	0,684	0,763	0,613	0,668	-	-	0,430	0,340	0,178	0,177
Carlos Botelho	0,040*	0,069	0,012*	0,022*	0,036*	0,009*	-	-	0,001*	0,000*
<i>Carlos Botelho</i>	0,058	0,114	0,019*	0,042*	0,009*	0,018*	-	-	0,103	0,231
Carlos Botelho	0,048*	0,042*	0,035*	0,073	0,009*	0,007*	-	-	0,008*	0,009*
Carlos Botelho	0,015*	0,009*	0,048*	0,116	0,006*	0,005*	-	-	0,009*	0,018*
<i>PETAR</i>	0,058	0,102	0,090	0,139	0,072	0,075	0,137	0,127	-	-
PETAR	0,034*	0,071	0,121	0,233	0,011*	0,011*	0,005*	0,004*	-	-
PETAR	0,038*	0,066	0,009*	0,006*	0,005*	0,002*	0,009*	0,003*	-	-
PETAR	0,005*	0,003*	0,001*	0,003*	0,001*	0,001*	0,007*	0,004*	-	-
PETAR	0,005*	0,009*	0,003*	0,012*	0,004*	0,010*	0,000*	0,004*	-	-

(*) representa os valores estatisticamente significativos.

5.7. Influência de Cubatão no fluxo gênico

Os valores de F_{ST} obtidos para os dois pares de populações presentes dentro das áreas contínuas e melhor preservadas (Picinguaba versus Caraguatatuba e Carlos Botelho versus PETAR) quando corrigidos para a distância geográfica encontrada entre Caraguatatuba e Carlos Botelho (áreas que flanqueiam as regiões degradadas de Cubatão), se apresentaram maiores (0,020 e

0,033, respectivamente) do que os valores observados para Caraguatatuba versus Carlos Botelho (0,014). Além disso, o valor de F_{ST} obtido para Caraguatatuba versus Carlos Botelho de acordo com a equação linear do teste de Mantel foi igual ao valor observado diretamente, indicando que os níveis de degradação encontrados nesta região aparentemente não estão afetando o fluxo gênico entre os dois grandes blocos de serra para a espécie em estudo.

As porcentagens de indivíduos imigrantes encontradas nas diferentes populações através do *assignment test* foram: Picinguaba (13,33%), Caraguatatuba (30%), Cubatão (13,63%), Carlos Botelho (10,26%) e PETAR (15,62%). A hipótese de que Cubatão possa estar funcionando com um sumidouro de indivíduos devido ao elevado grau de deteriorização da área também foi rejeitada, dado que as proporções de indivíduos residentes e imigrantes entre as populações analisadas não diferiram significativamente (teste G; $G = 2,6$, $P = 0,63$).

5.8. Migração diferencial entre machos e fêmeas.

A proporção de indivíduos residentes e imigrantes não diferiu significativamente entre os machos (16,66%) e fêmeas (8,7%) (teste G com correção de Yates, $G = 0,46$; $P = 0,49$) (Tabela 13). As médias dos valores de L_{home} obtidos através dos procedimentos frequentista e Bayesiano,

respectivamente, foram $16,34 \pm 1,77$ e $17,17 \pm 2,27$ para os machos e $16,54 \pm 1,39$ e $17,23 \pm 1,87$ para as fêmeas. Tanto para o procedimento frequentista quanto para o Bayesiano as médias dos valores de L_{home} não foram significativamente diferentes quando comparados entre machos e fêmeas (teste t, $t = 0,613$; $P = 0,54$ e $t = 0,12$; $P = 0,90$). Estes dados sugerem um padrão de dispersão similar entre machos e fêmeas.

Tabela 13. Proporções de machos e fêmeas detectados como sendo residentes e imigrantes através do procedimento de exclusão de Paetkau *et al.* (2004), implementado no software GENECLASS2.

	Residentes	Imigrantes	Total
Machos	100	20	120
Fêmeas	21	2	23

6. DISCUSSÃO

6.1. Níveis de heterozigose

Déficit significativo de heterozigose não foi encontrado em estudos prévios realizados no gênero *Chiroxiphia* (McDonald, 2003). No entanto, valores de F_{IS} significativamente diferentes de zero foram observados para uma população de *Manacus manacus* (Höglund & Shorey, 2003), um outro representante da família Pipridae que também apresenta comportamento de *lek*. Neste caso, a razão para a perda de heterozigose foi atribuída à moderada relação

de parentesco existente entre os machos pertencentes aos diferentes *leks*. Análises utilizando marcadores moleculares têm levantado evidências de que os machos de algumas outras espécies de aves que apresentam o comportamento de *lek* se reúnem com indivíduos que apresentam pelo menos algum tipo de relação de parentesco para a realização do *display* reprodutivo. Alguns exemplos conhecidos seriam *Pavo cristatus* (Petrie *et al.*, 1999), *Tetrao tetrix* (Höglund *et al.*, 1999) e *Tympanuchus pallidicinctus* (Bouzat & Johnson, 2003). Nestes casos, perda de heterozigose é geralmente apresentada, devido à dispersão limitada dos indivíduos (Höglund & Shorey, 2003). No entanto, no estudo realizado por McDonald (2003) apenas quatro *loci* de microssatélites foram utilizados, e cada um deles apresentava um número máximo de quatro alelos. A baixa variabilidade destes *loci* pode ter contribuído para a não detecção de perda de heterozigose. Embora a hipótese de relação de parentesco entre os membros do *lek* tenha sido rejeitada para *C. linearis* (McDonald & Potts, 1994), uma correlação significativa entre distância dos *leks* e grau de parentesco foi encontrada para *Manacus manacus* (Höglund & Shorey, 2003). Portanto, esta questão permanece ainda controversa para as aves representantes da família Pipridae. Estudos futuros, comparando-se a relação de parentesco entre os machos participantes de diferentes *leks* de *C. caudata*, poderão ajudar no

esclarecimento do papel da seleção de parentesco no grau de heterozigose das populações.

6.2. Estruturação populacional e fluxo gênico

De acordo com o modelo clássico de Wright (1931), assumindo-se uma série de condições ideais, um migrante efetivo por geração seria suficiente para evitar a diferenciação populacional causada pela deriva, mantendo os valores de F_{ST} próximos a 0,2. Este nível de divergência deve permitir que as adaptações locais ocorram, mas sem que alelos sejam fixados ou perdidos em diferentes subpopulações (Wang, 2004). Altos níveis de fluxo gênico foram aqui observados, excedendo o número de um migrante por geração em todos os pares de comparações, tanto quando se utilizou a metodologia baseada nos valores de F_{ST} quanto com o método baseado nos alelos privados.

Apesar dos níveis substanciais de fluxo gênico, e conseqüentemente, dos baixos valores dos índices de fixação ($< 0,023$), os F_{ST} diferiram significativamente de zero em oito dos 10 pares de populações. Esta estruturação está certamente relacionada aos aspectos sociais da espécie em estudo, dado que não existem barreiras físicas separando as áreas de estudo. Três hipóteses não exclusivas podem ser levantadas para explicar os baixos, mas significativos, níveis de diferenciação: (1) ação da deriva genética devido a um menor tamanho

efetivo das populações locais causado pela grande desproporção no sucesso de acasalamento dos machos; (2) endocruzamento, se os machos contribuírem com mais de uma geração de fêmeas e (3) a potencial existência de seleção de parentesco entre os machos participantes do mesmo *lek*. Dado que vários *leks* foram amostrados em cada área de estudo, se seleção de parentesco estiver envolvida, seus efeitos podem estar diluídos nos dados aqui apresentados. Também se torna claro que os níveis de diferenciação são dependentes da distância geográfica, seguindo o modelo de isolamento pela distância de Wright (1943). Tal fato demonstra que a dispersão apresenta níveis de limitação, o que também pode ter contribuído com a estruturação observada. Além disso, estes dados vêm confirmar a capacidade de dispersão limitada dos passeriformes que habitam o sub-bosque das florestas tropicais (Bates, 2000; Brown *et al.*, 2005).

A inadequabilidade do índice R_{ho} , que ficou evidenciada através da incoerência de alguns resultados, pode ser resultante de diferentes fatores: (1) dados simulados têm demonstrado que para tamanhos amostrais moderados a pequenos (< 50) e número de *loci* de 10 ou menos, F_{ST} é a metodologia mais adequada e (2) quando o número de migrantes é alto, a migração se torna mais importante do que as mutações, tornando as estimativas de F_{ST} mais precisas (Gaggiotti *et al.*, 1999).

6.3. Assignment tests

No procedimento de detecção de migrantes de primeira geração implementado no software GENECLASS2, um indivíduo que é excluído da população onde foi amostrado é atribuído à população para a qual ele apresente o maior valor de L_{home} observado dentre todas as populações analisadas, mesmo que a sua população real de origem não tenha sido amostrada. Para contornar este problema, para cada indivíduo detectado como imigrante foi calculada também a probabilidade de ser excluído de cada uma das populações consideradas no estudo, o que garante a possibilidade de se rejeitar todas as populações no caso de a verdadeira população fonte não ter sido amostrada.

No presente trabalho, os indivíduos detectados como imigrantes não puderam ser atribuídos com confiabilidade às suas populações de origem, dado que alguns indivíduos não puderam ser excluídos de mais de uma das potenciais populações fontes de emigrantes. Este baixo poder da análise é provavelmente atribuído aos níveis moderados de diferenciação encontrados entre os pares de populações, como já relatado previamente numa série de trabalhos baseados em dados simulados e empíricos (Eldridge *et al.*, 2001; Manel *et al.*, 2003; Cegelski *et al.*, 2003). De fato, tem sido demonstrado que uma confiabilidade satisfatória para os testes de atribuição/exclusão de indivíduos a determinadas populações pode ser atingido apenas com valores de F_{ST} variando de 0,08 a 0,10, além de

tamanhos amostrais variando entre 30 e 50 e um número mínimo de 10 *loci* polimórficos de microssatélites apresentando heterozigose média de 60% (para uma revisão, ver Cegelski *et al.*, 2003). Embora algumas destas premissas tenham sido aqui atingidas, os valores de F_{ST} variaram de -0,0002 a 0,023. Provavelmente, devido a estes baixos valores de F_{ST} alguns imigrantes verdadeiros tenham também deixado de atingir o valor crítico necessário para serem detectados (erros tipo II, Paetkau *et al.*, 2004).

O método de exclusão apresentado no software GENECLASS2 baseia-se no uso de populações pré-definidas. Este procedimento foi considerado como sendo o mais adequado para os dados aqui apresentados porque os demais métodos disponíveis, que atribuem indivíduos às populações ao mesmo tempo em que estimam o número de populações e suas frequências alélicas, podem não apresentar uma performance satisfatória em situações em que o padrão de diferenciação seja o isolamento pela distância (Pritchard *et al.*, 2000; Pritchard, 2003). Um exemplo destes métodos seria o modelo de agrupamento apresentado no software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Na prática, muitos indivíduos apresentariam níveis de parentesco consideráveis em populações múltiplas, o que pode resultar em valores de K (número de populações) biologicamente irreais (Pritchard *et al.*, 2000; Pritchard, 2003).

Embora os padrões de migração em tempo real não puderam ser determinados, o número de indivíduos imigrantes foi considerado como sendo uma maneira adequada para se medir dispersão diferencial entre os sexos e para se testar a hipótese de que Cubatão possa estar funcionando como um sumidouro de indivíduos.

6.4. Dispersão diferencial entre os sexos

Embora o número de fêmeas aqui analisadas tenha sido muito menor em relação ao número de machos (aproximadamente 1:5), quando as proporções de residentes/imigrantes de ambos os sexos foram comparadas através de uma tabela de contingência a diferença não foi significativa. Da mesma maneira, os valores de L_{home} não diferiram significativamente entre machos e fêmeas, indicando que ambos os sexos têm as mesmas probabilidades de pertencerem às populações onde foram amostrados. Estes dados estão de acordo com os resultados previamente encontrados por McDonald (2003) para *C. linearis*, na Costa Rica, onde machos e fêmeas apresentaram taxas similares de migração. Embora machos jovens de primeiro ano possam apresentar plumagem de fêmea em algumas espécies de píprídeos (Höglund & Shorey, 2003), para *C. caudata*, dados de reprodução em cativeiro indicam que os machos apresentam uma

mancha de cor laranja na fronte logo após deixarem o ninho. Por isto, a sexagem molecular dos indivíduos verdes não foi realizada.

A razão sexual desproporcional aqui encontrada se deve certamente a problemas de amostragem. De acordo com Willis & Oniki (1988), os machos de *C. caudata* vocalizam mais e são mais conspícuos do que as fêmeas, e também voam mais, sendo conseqüentemente capturados nas redes de neblina com maior frequência. Uma razão sexual de aproximadamente (1:2) é encontrada entre os espécimes de museus, mas a proporção real na natureza deve ser próxima de (1:1) (Willis, 1988). Neste estudo, o desvio na proporção sexual foi provavelmente alto devido ao fato de as redes de neblina terem sido armadas próximo aos *leks*, e os machos devem passar mais tempo nestes locais do que as fêmeas (Sick, 1997).

6.5. Implicações para a conservação

A possibilidade de que o afunilamento do corredor de florestas, bem como os demais impactos encontrados na região de Cubatão, possa estar interrompendo o fluxo de gênico de *C. caudata* entre a Serra do Mar e a Serra de Paranapiacaba foi rejeitada. Quando os valores de F_{ST} obtidos para os dois pares de populações presentes dentro das áreas contínuas e melhor preservadas foram corrigidos para a distância geográfica encontrada entre Caraguatatuba e Carlos

Botelho (áreas que flanqueiam as regiões degradadas de Cubatão), ambos se apresentaram maiores do que os valores observados para Caraguatatuba versus Carlos Botelho. Da mesma maneira, o valor de F_{ST} obtido para Caraguatatuba versus Carlos Botelho de acordo com a equação linear do teste de Mantel foi igual ao valor observado diretamente. As correlações lineares puderam ser assumidas para a conversão dos valores de F_{ST} devido à forte correlação encontrada entre distância genética (F_{ST}) e distância geográfica obtida através do teste de Mantel.

A hipótese de que Cubatão possa estar funcionando com um sumidouro de indivíduos também não foi comprovada, dado que as proporções de indivíduos residentes e imigrantes entre as populações analisadas não diferiram significativamente. No entanto, *C. caudata* é uma espécie relativamente resistente aos impactos antrópicos, persistindo em áreas que apresentam certos níveis de degradação (Uezu *et al.*, 2005). Portanto, estes dados não podem ser generalizados para demais espécies. Certamente, a região de Cubatão pode funcionar como uma barreira para muitas espécies, como alguns grandes representantes da família Formicariidae que se tornaram raros na região (observação pessoal).

A análise de taxa de migração em tempo real (*assignment test*) seria a maneira mais adequada para se testar as influências de Cubatão no fluxo gênico.

No entanto, neste trabalho um grau de confiança satisfatório não pôde ser obtido com este tipo de análise. Alternativamente, o isolamento entre as áreas poderia ser muito recente para serem detectados pelo F_{ST} , dado que os dois blocos adjacentes de floresta são grandes e o processo de deriva seria lento para levar à diferenciação. No entanto, possivelmente esta não seja a razão para o fluxo contínuo de *C. caudata* na região, pois diversos indivíduos foram capturados mesmo sob as palafitas das grandes rodovias que atravessam a área, indicando que estas aves cruzam por entre este tipo de ambiente.

O corredor de floresta Atlântica composto pela Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba apresenta uma grande concentração de aves ameaçadas, abrigando espécies como o cracídeo *Pipile jacutinga*, os psitacídeos *Touit melanonota*, *Amazona vinacea* e *Triclaria malachitacea*, os cotingídeos *Tijuca atra*, *T. condita*, *Carpornis melanocephalus*, *Lipaugus lanioide* e *Calyptura cristata*, os tiranídeos *Phylloscartes oustaleti* e *P. difficilis*, dentre muitas outras (Aleixo & Galetti, 1997; Collar *et al.*, 1997). Os estudos de diversidade genética e fluxo gênico nesta área podem ser de grande importância, pois certamente esta é a localidade que oferece as melhores chances de manutenção de populações viáveis para muitas destas aves. Além disso, muito possivelmente sirva também como fonte de indivíduos colonizadores para diversas áreas fragmentadas e ilhas oceânicas.

Grande parte dos estudos previamente realizados sobre a estruturação populacional de passeriformes florestais na região neotropical teve como objetivo testar teorias relacionadas com a diversificação genética causada por barreiras físicas, principalmente na região amazônica, como a influência dos grandes rios, o processo da vicariância ao longo da Cordilheira dos Andes e o papel dos refúgios florestais (Brumfield & Capparella, 1996; Bates et al. 1999; Bates, 2000). Além disso, muitas vezes o número de áreas de amostragem considerado foi muito reduzido para que o padrão geral de distribuição da diversidade genética fosse determinado (Höglund & Shorey, 2003; McDonald, 2003). Embora estes tipos de barreiras não sejam encontrados na mata Atlântica, o presente estudo vem demonstrar que níveis de subdivisão populacional podem ocorrer ao longo de seus habitats contínuos, sendo esta estruturação provavelmente mais relacionada com aspectos comportamentais das aves estudadas. Portanto, uma parcela significativa da diversidade genética de *C. caudata* está distribuída entre as diferentes populações, mesmo em escalas geográficas tão limitadas. Um padrão de isolamento pela distância, com um grande número de alelos privados, sugere que todas as áreas ao longo do corredor estudado sejam de grande importância para a conservação, não havendo localidades preferenciais dentro deste contínuo.

O endocruzamento naturalmente presente nas populações locais, bem como a distribuição não homogênea da diversidade genética ao longo do espaço, podem sugerir que quando as áreas de florestas contínuas se tornam fragmentadas, reduzindo o fluxo gênico, estes animais seriam mais propensos a sofrer os efeitos negativos do endocruzamento, e a perder alelos, do que seriam as aves que não são naturalmente endocruzadas, como a maioria dos passeriformes de regiões temperadas (Dawson *et al.* 1997; Gibbs *et al.* 2000; Bulgin *et al.* 2003; Scribner *et al.* 2003; Patten *et al.* 2004). Neste tipo de cenário, a preservação de áreas contínuas seria de extrema importância para a manutenção da diversidade genética, e o corredor contínuo de mata Atlântica aqui estudado pode ser o último grande reservatório de diversidade genética para muitas espécies de animais deste ecossistema. Estudos futuros em áreas fragmentadas poderão vir a confirmar esta possibilidade. Neste sentido, os dados aqui apresentados poderão servir como controle para análises envolvendo *C. caudata*.

No entanto, a inclusão da informação genética em planos de conservação e manejo pode muitas vezes não apresentar resultados satisfatórios devido à inadequação dos dados gerados. Embora a identificação de populações divergentes dentro de uma única espécie possa ser algo importante, quando se trata da conservação de ecossistemas é preciso se avaliar padrões mais gerais.

Uma maneira apropriada para se incorporar informação espacial na diversidade genética é avaliar os padrões de diferenciação de diferentes espécies co-distribuídas, para que possam ser identificadas áreas em que as comunidades como um todo tenham passado, ou ainda estejam passando, por períodos de evolução independente (Bermingham & Moritz, 1998; Moritz & Faith, 1998). Embora uma única espécie esteja sendo analisada neste trabalho, trata-se de um passo inicial para o entendimento da estruturação genética das populações de aves da mata Atlântica. Em trabalhos futuros, outras espécies deverão ser incorporadas para que os padrões gerais de distribuição da diversidade genética neste ecossistema se tornem conhecidos. Se o mesmo padrão de distribuição espacial da diversidade genética encontrado para *C. caudata* se repetir para outras espécies, a conservação da maior proporção possível da variabilidade genética da avifauna de mata Atlântica dependerá da manutenção da integridade deste último grande corredor em toda a sua extensão. Para isto, medidas políticas como a criação de unidades de conservação nas áreas não protegidas que conectam os dois grandes blocos de floresta seriam de fundamental importância.

7. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Allendorf FW, Leary RF (1986) Heterozygosity and Fitness in Natural Populations of Animals. Em *Conservation Biology-The Science of Scarcity and Diversity*. Soulé, M. E. ed. Sinauer associates, INC. Publishers Sunderland, Massachusetts. Pg. 57-76.
- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS (2000) BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. *Sociedade Civil Mamirauá e CNPq*.
- Bachtrog D, Agis M, Imhof M, Schlotterer C (2000) Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs - Evidence from *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1277-1285.
- Bates JM, Hackett SJ, Goerck JM (1999) High levels of mitochondrial DNA differentiation in two lineages of antbirds (*Drymophila* and *Hypocnemis*). *The Auk*, 116, 1093-1106.

- Bates JM (2000) Allozymic genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *The Condor*, 102, 770-783.
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7, 367-369.
- Bouzat JL, Cheng HH, Lewin HA, Westemeier RL, Brawn JD, Paige AKN (1998) Genetic Evaluation of a Demographic Bottleneck in the Greater Prairie Chicken. *Conservation Biology*, 12, 836-843.
- Bouzat JL, Johnson K (2003) Genetic structure among closely spaced leks in a peripheral population of lesser prairie chickens. *Molecular Ecology*, 13, 499-505.
- Brown LM, Ramey II RR, Tamburini B, Gavin TA (2004) Population structure and mitochondrial DNA variation in sedentary Neotropical birds isolated by forest fragmentation. *Conservation Genetics*, 5, 743-757.
- Brumfield RT, Capparella AP (1996) Historical diversification of birds in Northwestern South America: a molecular perspective on the role of vicariant events. *Evolution*, 50, 1607-1624.
- Brumfield RT, Braun MJ (2001) Phylogenetic relationships in Bearded manakins (Pipridae: *Manacus*) indicate that male plumage color is a misleading taxonomic marker. *The Condor*, 103, 248-258.

- Bryant EH, Reed DH (1999) Fitness decline under relaxed selection in captive populations. *Conservation Biology*, 13, 665-669.
- Bulgin NL, Gibbs HL, Vickery P, Baker AJ (2003) Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionary distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology*, 12, 831-844.
- Cegelski CC, Waits LP, Anderson NJ (2003) Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Molecular Ecology*, 12, 2907-2918.
- Collar N, Wege DC, Long A (1997) Patterns and causes of endangerment in the New World avifauna. *Ornithological monographs*, 48, 237-260.
- Comincini S, Leone P, Redaelli L, De Giuli L, Zhang Y, Ferreti L (1995) Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 112, 415-420.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001-2014.
- Dawkins R (1976) *The selfish gene*. Oxford University Press, Oxford.

- 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.
- Eldridge MDB, Kinnear JE, Ornum ML (2001) Source populations of dispersing rock-wallabies (*Petrogale lateralis*) identified by assignments tests on multilocus genotypic data. *Molecular Ecology*, 10, 2867-2876.
- Foster MS (1981) Cooperative behavior and social organization of the Swallow-Tailed manakin (*Chiroxiphia caudata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 9, 166-177.
- Franklin IR (1980) Evolutionary Changes in Small Populations. In *Conservation Biology – An Evolutionary – Ecological Perspective*.
- Gaggiotti EO, Lange O, Rassmann K & Gliddon C (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8, 1513-1520.
- Gibbs HL, Dawson RJG, Hobson KA (2000) Limited differentiation in microsatellites DNA variation among northern populations of the yellow warbler: evidence for male-biased gene flow? *Molecular Ecology*, 9, 2137-2147.

- Glenn T, Stephan W, Dessauer HC, Braun MJ (1996) Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 1151-1154.
- Goodman SJ (1997) RST CALC: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Molecular Ecology*, 6, 881-885.
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- Goudet J, Raymond M, Demeeus T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144, 1933-1940.
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behavior. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 1-6.
- Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiori A, Flesher RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27, 500-507.
- Harr B, Zangerl B, Schlotterer C (2000) Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1001-1009.

- Höglund J, Alatalo RV, Lundberg A, Rintamaki PT, Lindell J (1999) Microsatellite markers reveal the potential for kin selection in black grouse leks. *Proceedings of the Royal Society of London series B*, 266, 813-816.
- Höglund J, Shorey L (2003) Local genetic structure in a white-bearded manakin population. *Molecular Ecology*, 12, 2457-2463.
- Hughes JB, Daily GC, Ehrlich PR (1997) Population diversity: its extent and extinction. *Science*, 278, 689-694.
- Kark S, Alkon PU, Safriel UN, Randi E (1999) Conservation priorities for Chukar partridge in Israel based on genetic diversity across an ecological gradient. *Conservation Biology*, 13, 542-552.
- Kimura M, Crow F (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49, 725-738.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and the distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75, 2868-2872.
- Kruglyak S, Durrett R, Schug MD, Aquadro CF (2000) Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1210-1219.

- Lande R, Barrowclough G (1987) Effective population size, genetic variation, and their use in population management. Em *Viable Populations for Conservation*. Soulé, M. E. ed. Cambridge University Press. Pg. 87-123.
- Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR (1999) An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology*, 8, 891-894.
- Manel S, Berthier P, Luikart G (2002) Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology*, 16, 650-659.
- McDonald DB (1993) Demographic consequences of sexual selection in the long-tailed manakin. *Behavioral Ecology*, 4, 297-309.
- McDonald DB (2003) Microsatellite DNA evidence for gene flow in neotropical lek-mating Long-tailed manakin. *The Condor*, 105, 580-586.
- McDonald DB, Potts WK (1994) Cooperative display and relatedness among males in a lek-mating bird. *Science*, 266, 1030-1032.
- Ministério do Meio Ambiente (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da mata Atlântica e Campos Sulinos. *Brasília, DF*.
- Morellato LP, Haddad CFB (2000) The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, 32, 786-792.

- Moritz C, Faith DP (1998) Comparative phylogeography and identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7, 419-429.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Oliveira-Filho AT, Fontes MAL (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and influence of climate. *Biotropica*, 32, 793-810.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling L, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4, 347-354.
- Paetkau D, Slade R, Burdens M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13, 55-65.
- Patten MA, Rotenberry JT, Zuk M (2004) Habitat selection, acoustic adaptation, and the evolution of reproductive isolation. *Evolution*, 58, 2144-2155.
- Petrie N, Krupa A, Burke T (1999) Peacocks leks with relatives even in the absence of social and environmental cues. *Nature*, 401, 155-157.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95, 536-539.

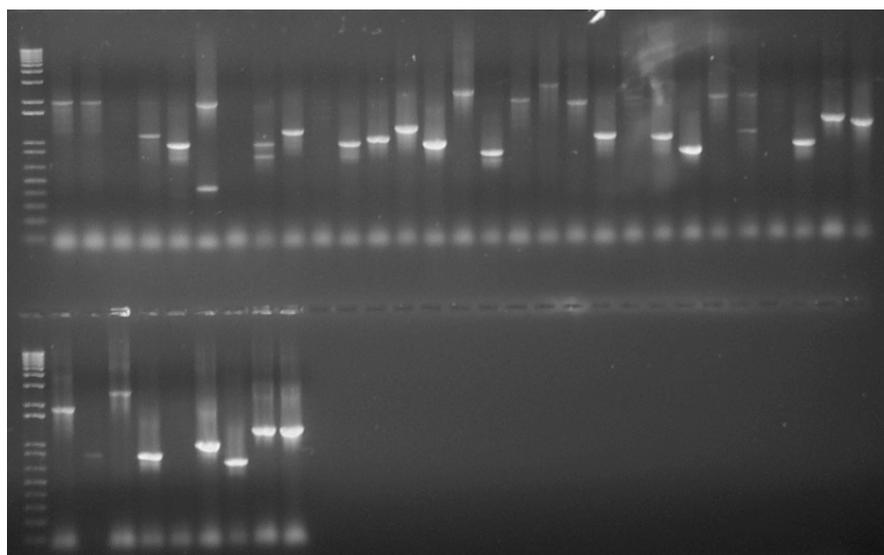
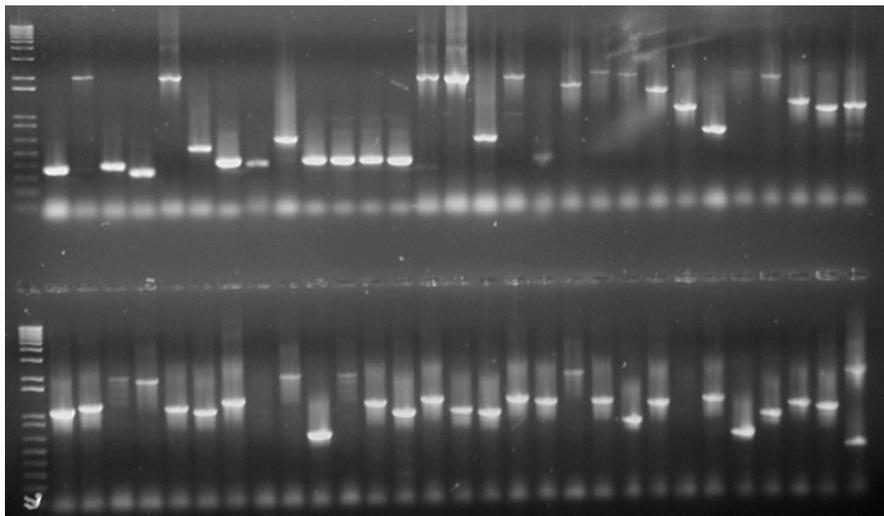
- Primmer CR, Ellegren H (1998) Patterns of molecular evolution in Avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 997-1008.
- Pritchard JK, Matthew S, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Pritchard JK (2003) Documentation for structure software: version 2.0. Available at <http://pritch.bsd.unichicago.edu>.
- Purvis A, Hector A (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405, 212-219.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 9197-9201.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop, Version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Ridgely RS, Tudor G (1994) The birds of South America, Volume II. *University of Texas Press*, Austin.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. Em *Bioinformatics methods and protocols*. Krawetz, S. & Misener, S. eds. Humana Press, Totowa, NJ. Pg. 365-386.

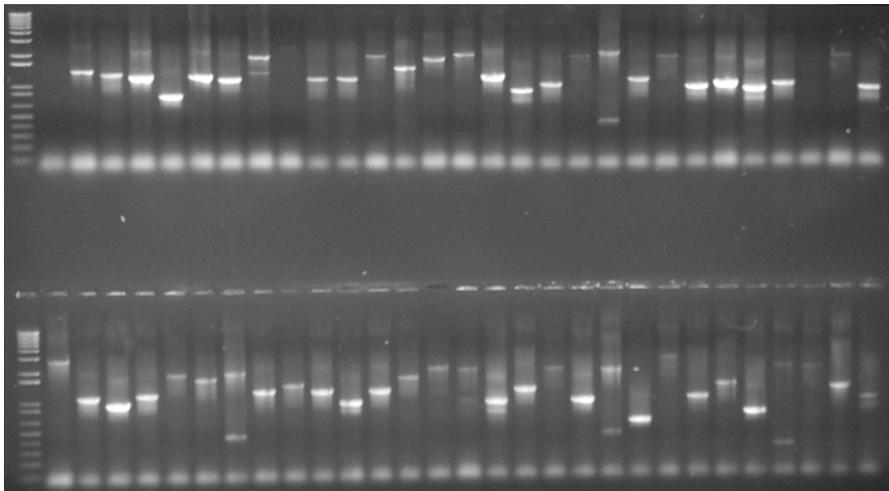
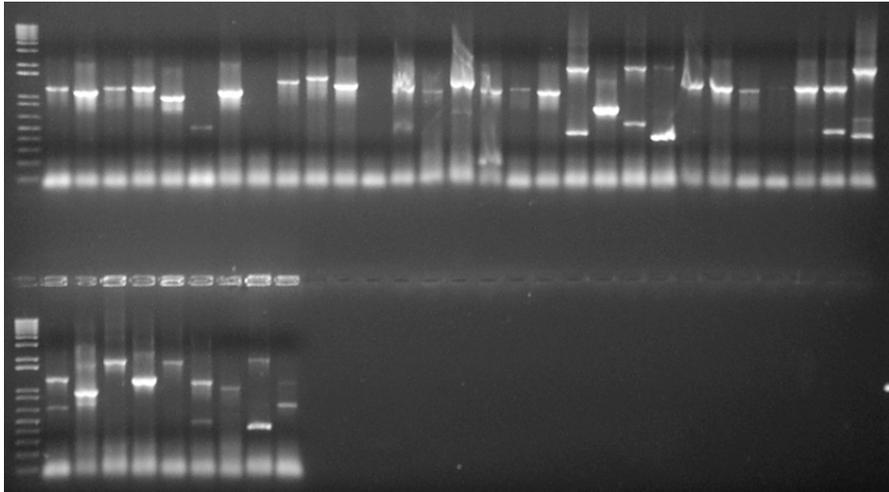
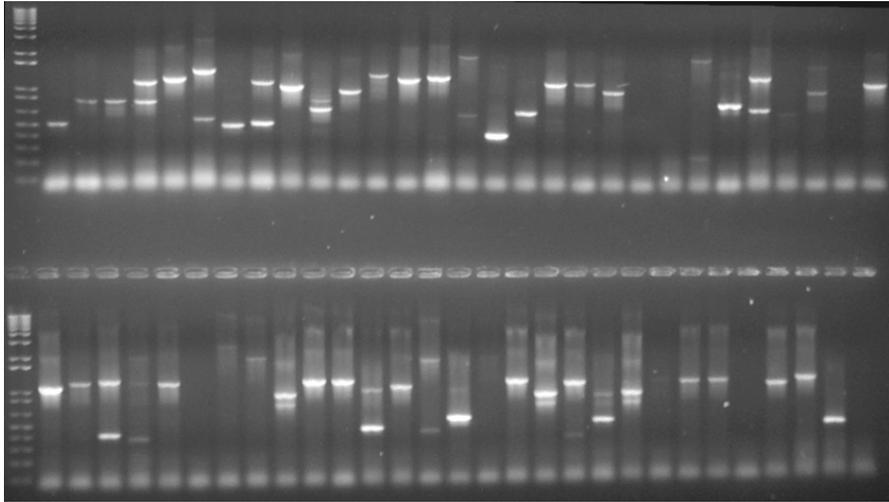
- Rousset F, Raymond M (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140, 1413-1419.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scribner KT, Malecki RA, Batt BDJ, Inman RL, Libants S, Prince HH (2003) Identification of source population for Greenland Canada geese: genetic assessment of a recent colonization. *The Condor*, 105, 771-782.
- Secretaria do Meio Ambiente (1998) Projeto de Preservação da mata Atlântica. *São Paulo, SP*.
- Sick H (1997) Ornitologia Brasileira. *Ed. Nova Fronteira, RJ*.
- Simberloff D, Cox J (1987) Consequences and costs of conservation corridors. *Conservation Biology*, 1, 63-71.
- Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39, 53-65.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236, 787-792.
- Smith TB, Wayne RK, Girman DJ, Bruford MW (1997) A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*, 276, 1855-1857.
- SOS Mata Atlântica, INPE (1992) Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica no período de 1985-1990. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica.

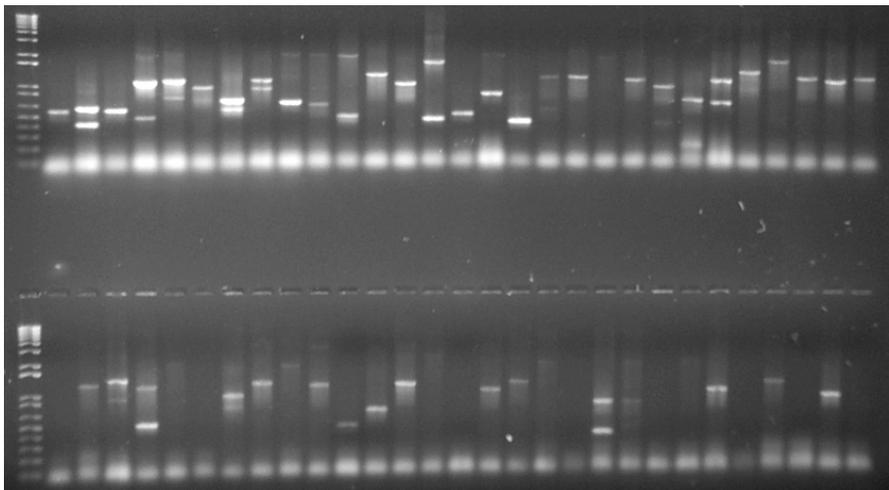
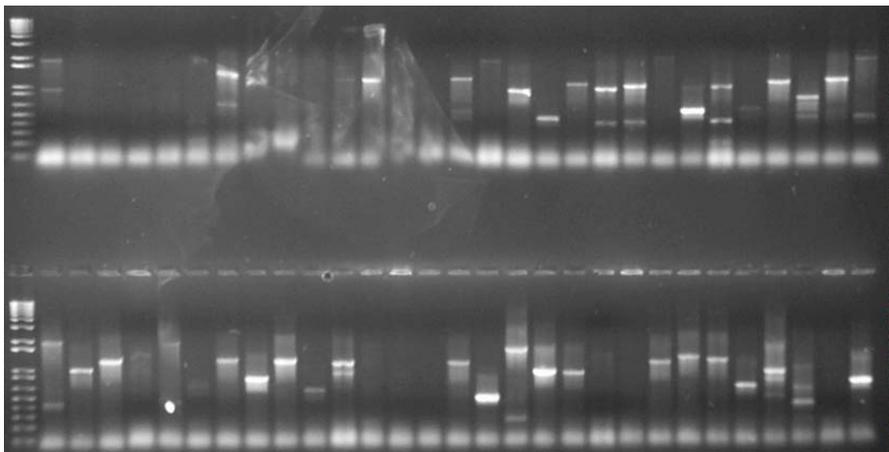
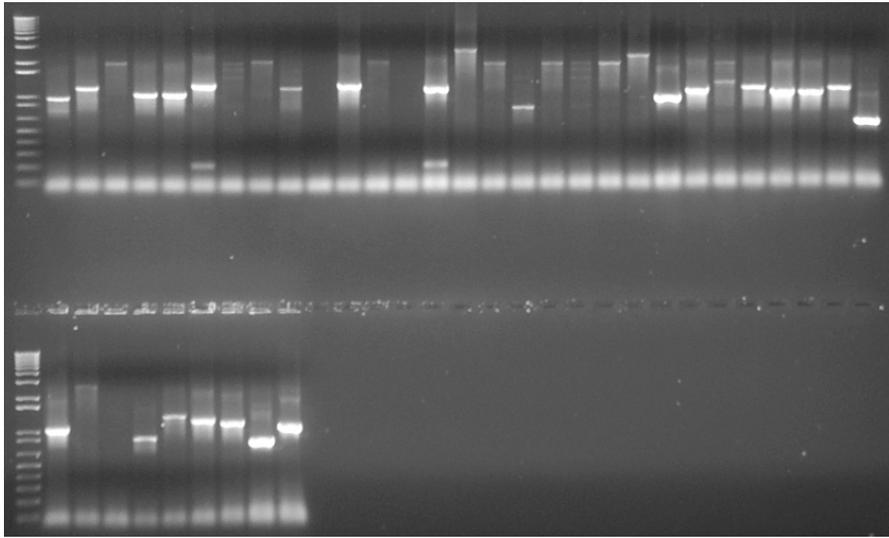
- Soulé ME (1980) Thresholds for survival: maintaining the fitness and evolutionary potential. Em *Conservation Biology - An Evolutionary and Ecological Perspective*. Soulé, M. E. & Wilcox, B. ed. Sinauer Associates, INC Publishers, Sunderland, Massachusetts. Pg. 151-170.
- Templeton AR, Robertson RJ, 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 of the United States of America*, 98, 5426-5432.
- Uezu A, Metzger JP, Vielliard JME (2005) Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. *Biological Conservation*, 123, 507-519.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.
- Young DL, Allard MW, Moreno JA, Miyamoto MM, Ruiz CR, Pérez-Vieira RA (1998) DNA fingerprint variation and reproductive fitness in the plain pigeon. *Conservation Biology*, 12, 225-227.
- Waits LP, Talbot SL, Ward RH, Shields GF (1998) Mitochondrial DNA phylogeography of the north american brown bear and implications for conservation. *Conservation Biology*, 12, 408-417.

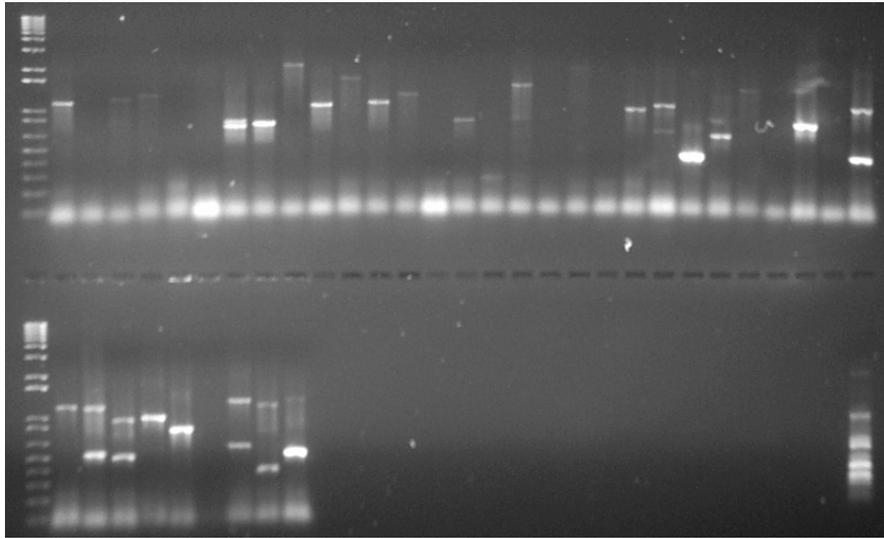
- Wang J (2004) Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology*, 18, 332-343.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Willis EO, Oniki Y (1988) Bright crowns of female and young males Swallow-tailed manakin, *Chiroxiphia caudata* (Shaw and Nodder 1973) (Aves, Pipridae). *Revista Brasileira de Biologia*, 48, 439-441.
- Willis EO, Oniki Y (1992) Losses of São Paulo birds are worse in the interior than in Atlantic Forests. *Ciência e Cultura*, 44, 326-328.
- Wilson IJ, Balding DJ (1998) Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics*, 150, 499-510.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-259.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 128, 114-138.

(ANEXO 1) PCR de 442 colônias recombinantes utilizando-se os *primers* M13F e M13R, além do *primer* do PIMA, rico em GC, para a detecção de insertos contendo potenciais *loci* de microssatélites. (*ladders* de 1kb).

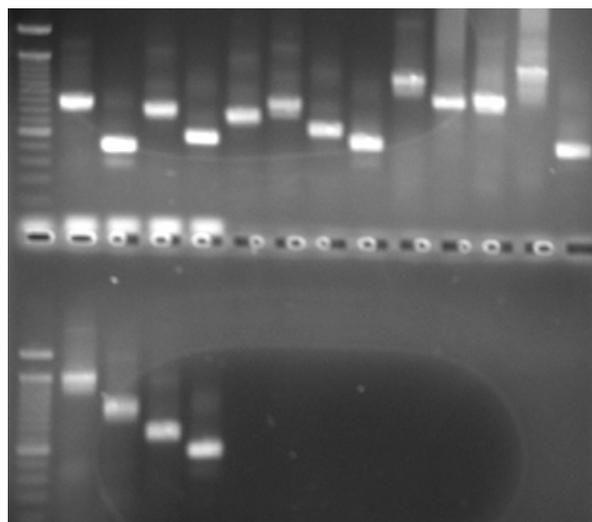


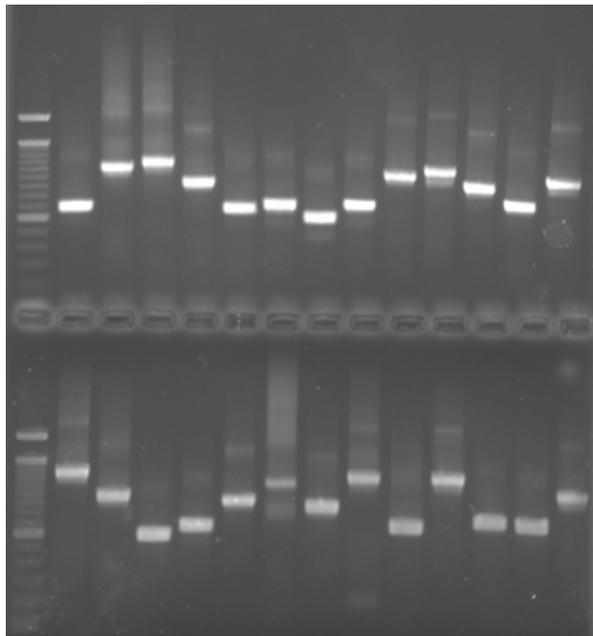
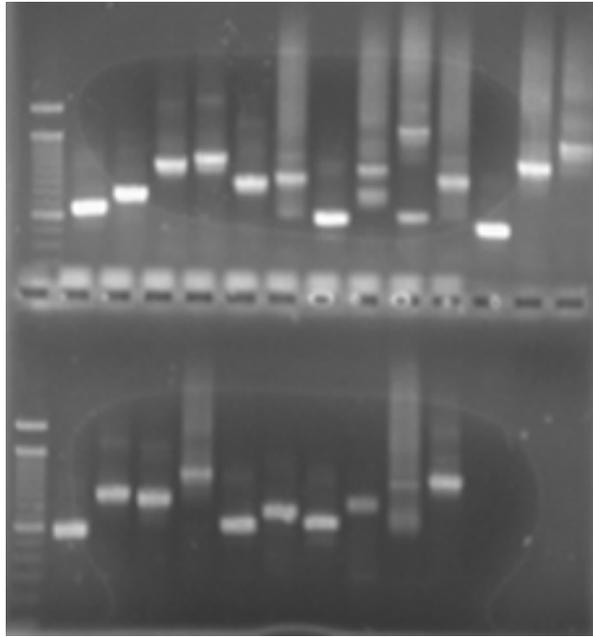


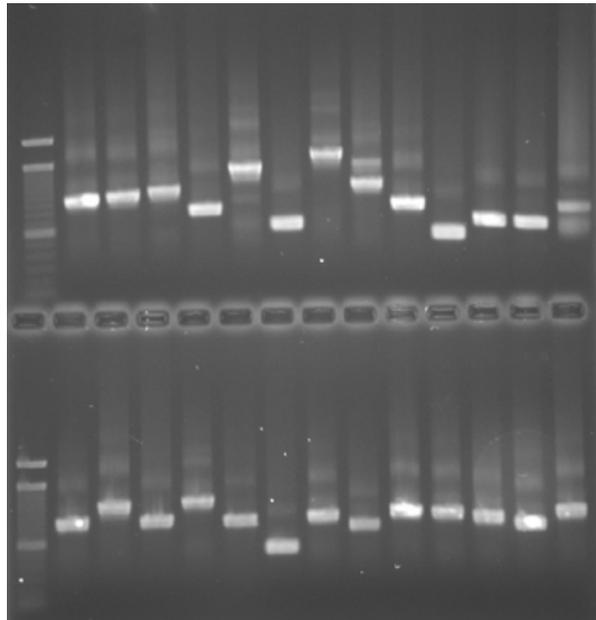
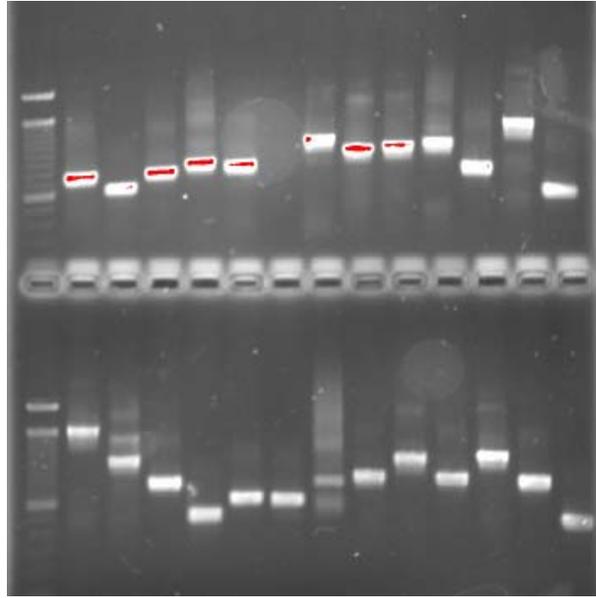


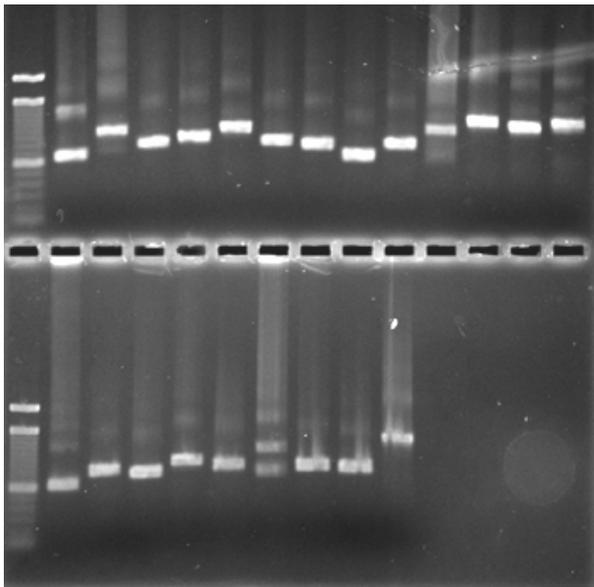
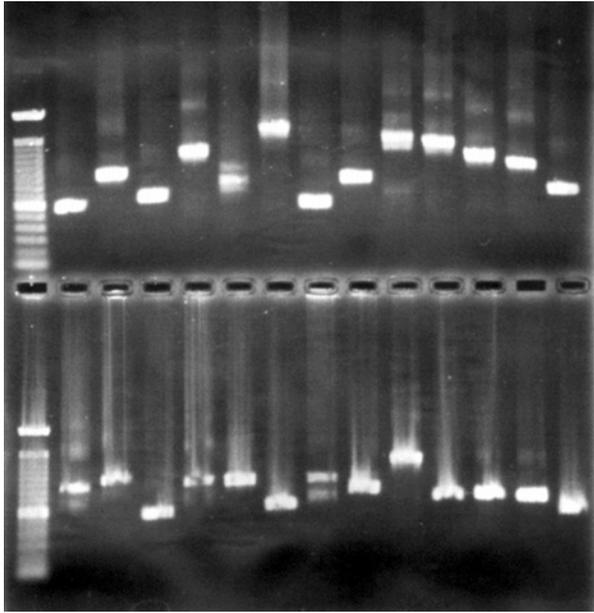
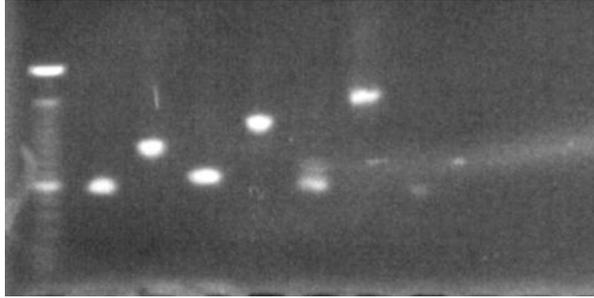


(ANEXO 2) Produtos de PCR de 172 clones com insertos enriquecidos para a detecção de *loci* de microssatélites, através da metodologia dos *beads* magnéticos, em géis de agarose, para a escolha de insertos com tamanhos entre 300 e 1000 pb para a realização de sequenciamento. (ladders de 100pb).



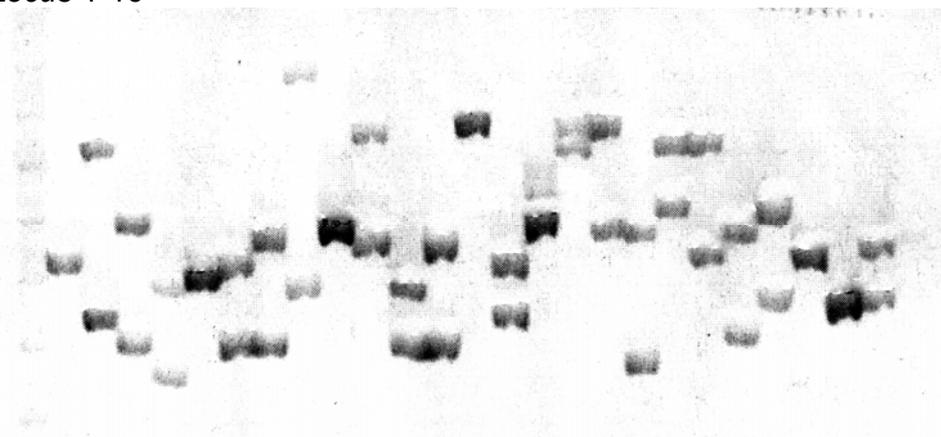




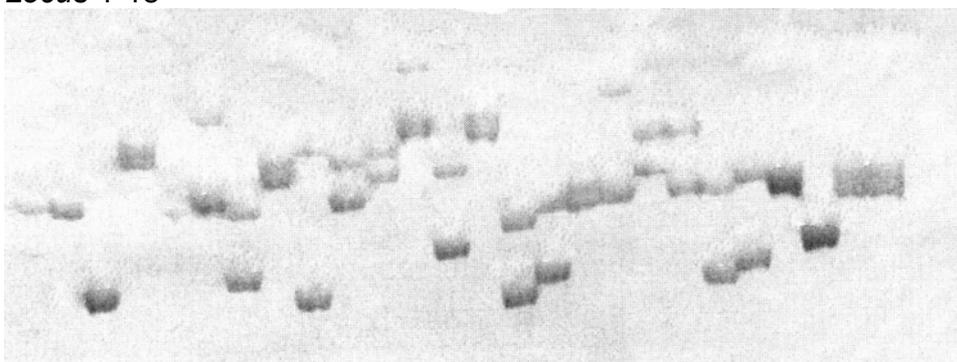


(ANEXO 3) Géis de poliacrilamida utilizados na caracterização dos *loci* polimórficos de microssatélites. O tamanho dos alelos foi determinado com auxílio de *ladder* de 10pb.

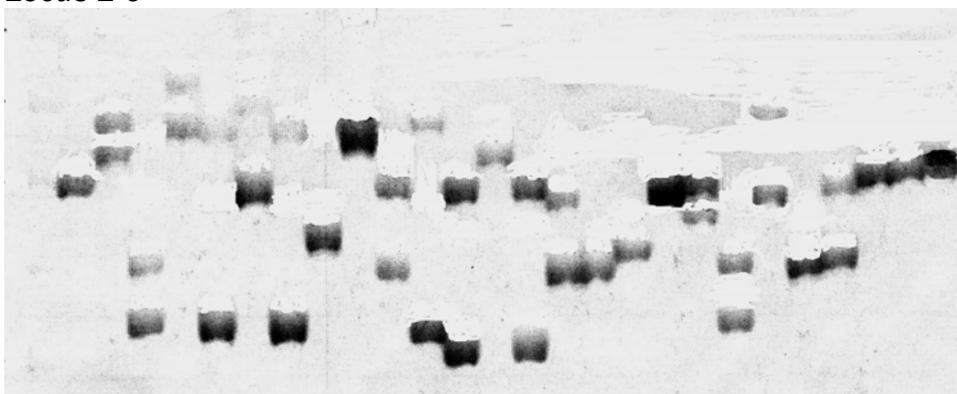
Locus 1-16



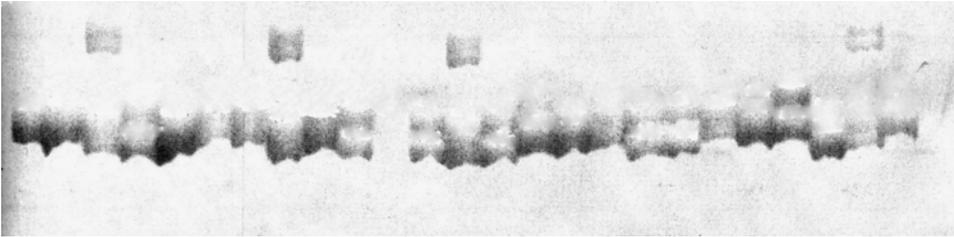
Locus 1-18



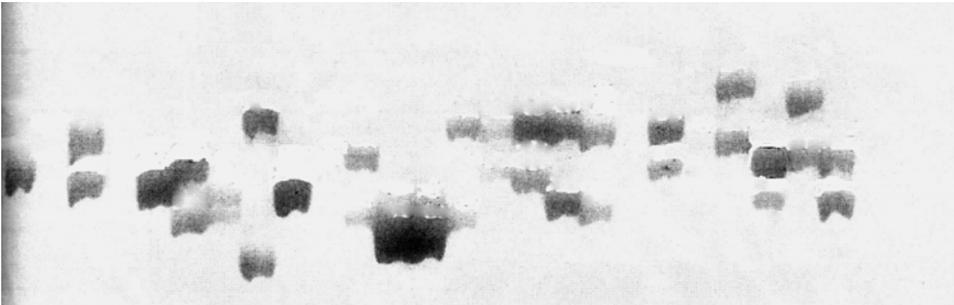
Locus 2-9



Locus 3-2



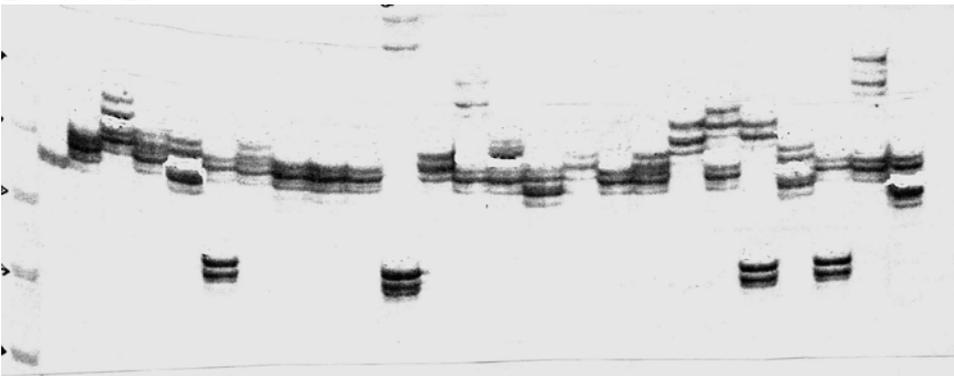
Locus 3-15



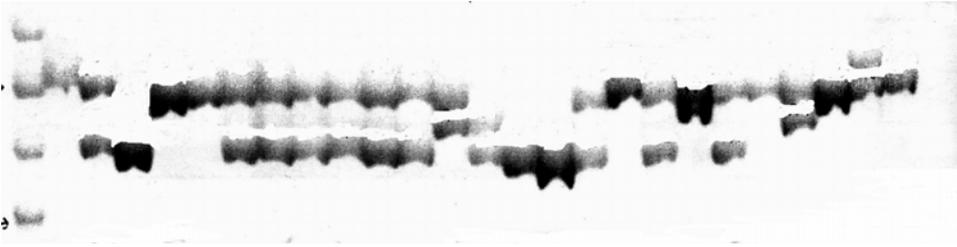
Locus 3-22



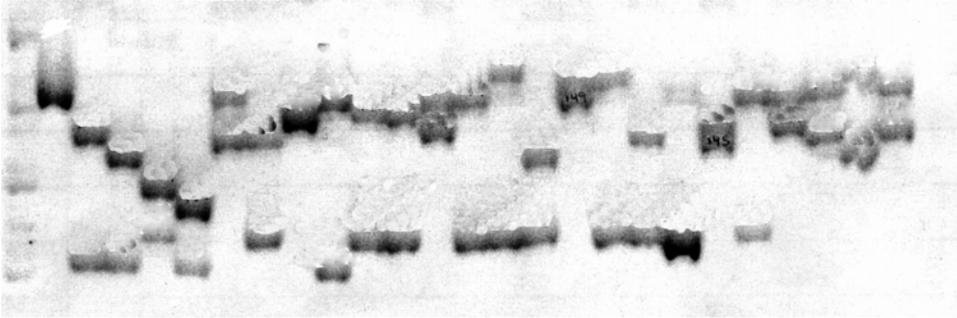
Locus 3-27



Locus 4-21



Locus 4-33



Locus 4-34

