

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

**Evidências do efeito da fragmentação da Mata Atlântica na variabilidade e  
estruturação genética de *Chiroxiphia caudata***

**Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior**

SÃO CARLOS - SP

2014

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

**Evidências do efeito da fragmentação da Mata Atlântica na variabilidade e  
estruturação genética de *Chiroxiphia caudata***

**Leonardo Paes Niero**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS - SP

2014

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

N676ee Niero, Leonardo Paes.  
Evidências do efeito da fragmentação da mata atlântica na variabilidade e estruturação genética de *Chiroxiphia caudata* / Leonardo Paes Niero. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Ecologia. 2. Fragmentação florestal. 3. Estrutura genética. 4. Mata Atlântica. 5. *Chiroxiphia caudata*. I. Título.

CDD: 574.5 (20ª)

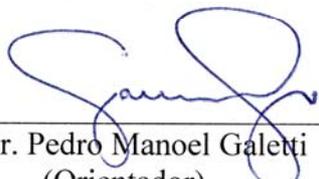
**LEONARDO PAES NIERO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

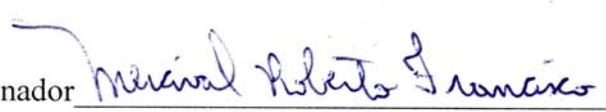
**Aprovada** em 20 de outubro de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

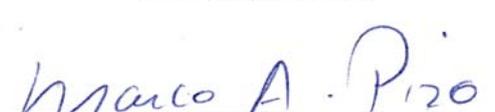
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior  
(Orientador)

1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco  
PPGERNUFSCar

2º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira  
UNESP/Rio Claro-SP

Dedico este trabalho ao meu Brasil. Caminhando pelo meu país pude ver que a natureza resiste e insiste em ser respeitada, assim como nosso povo. Cada cantinho um jeitinho de ser, uma maneira de se expressar. As desigualdades são grandes. Muitos tem pouco, enquanto poucos tem muito. Jamais desistirei de ver um Brasil melhor. Um país com tangerás, tatus, araucárias, saúvas, angicos, castanheiras e tantos outros elementos de nossa biodiversidade vivendo em harmonia com nosso povo!

## AGRADECIMENTOS

Muitos podem pensar que esta parte da dissertação foi a mais fácil de ser escrita. Para mim não foi. Colocar em poucas palavras todos e todas que me ajudaram nestes últimos dois anos não foi uma tarefa fácil. Mas vou tentar...

Agradeço minha Mãe, Rosa, pelos ensinamentos de como um ser humano deve proceder na caminhada da vida e ao meu Pai, Rinaldo, pelos ensinamentos de paciência e compreensão tão necessários em nosso viver. E minha avó Fernanda, pelo exemplo de bondade. Sem a ajuda de vocês jamais estaria aqui. O que sou hoje é fruto de meu passado e de tudo que transmitiram para mim. Só tenho a agradecer e a retribuição com certeza já começou. Amo vocês.

Ao professor Pedro Manoel Galetti Junior. Desde 2011 quando ainda estava começando minha monografia, até os dias de hoje agradeço muito pela oportunidade e pela compreensão. Com certeza o Prof. Pedro sempre soube formar e informar seus estudantes da necessidade da conservação de nossa biodiversidade. Meu muito obrigado.

No que diz respeito a amizades: lembrar de todo mundo é complicado. Sou grato a todos e todas que de alguma maneira me ensinaram algo bom para a vida.

Aos meus amigos e amigas de Jaboticabal. Obrigado por tudo. Desde moleque, sempre prezei pelas amizades e jamais esquecerei os jogos de futebol, as trilhas, a noite jaboticabalense, o colégio, as brincadeiras. Muitos já se desviaram de meu caminho pelo destino, mas sempre lembro com muita saudade e coração bem apertado dos felizes momentos que vivi nesta cidade do interior paulista. Cito alguns: Caca, Ivan, Biondi, Radamés, Laura, Raissa, Aline, Taroco, Creysson, Diego, David, Toko, Murilo, Mickers, Isabelle, Boer, Cão, Hugo, Guilhermino, Cleberck, Manu, Rafael, Buro, Zeus, Shera...

Aos meus amigos e amigas de Sorocaba. 2007 foi um ano de muitas mudanças para mim. Estar com pessoas tão boas me fortaleceu, e me fez uma pessoa feliz. Obrigado Luis, Nelly, Machadinho, Calipso, Japa, Paloma, Ju, Tiago...E um beijo especial para Isa e Gabi, amigas/irmãs que já são parte de mim...

Aos meus amigos e amigas de São Carlos. Ai vou por partes.

Minha república desde 2008 até hoje. Momentos de aprendizado e zoeira hahahaha. Valeu meu mano Magrão, sempre juntos. Guzzo, Canja, Manga, Gui Loko, Dé valeu moleque,

Lucão, Vitão, OB e agora por último meus manos Roccão, Corvão e Créu. Obrigado pela amizade meus irmãos, vocês foram minha família em Sanca e jamais deixarão de ser.

Galera da bio. Quando cheguei em 2008 tudo era novo. A galera de minha turma meu muito obrigado. A galera de outras turmas mais um obrigado. Ao famoso e temido time PEDRA 90, de tantas vitórias e risadas. ENEBIO e Coletivo Malungo, meus e minhas compas, obrigado por me proporcionarem uma formação diferenciada e referenciada em questões sociais de nosso país. Um salve a Igão, Bira, Diogão, Hare, Jessy, Tiagão, Vivi, Pi, Eletra, Guarani, Julie, Jedi, Bá, Paola, Mi, Nonato, Lais, Gordo, Inhame, Massa, Geo, Provô...

A galera do Levante Popular da Juventude. Hoje e sempre meus irmãos, a batalha será até o fim. Obrigado pelos ensinamentos e pela construção coletiva por uma nova sociedade. O que não é fácil, são muitas pedradas que recebemos, mas desistir não está em nosso vocabulário. Um salve geral pros manos e minas Ed, Neto, Fê, Ju, Babi, Iri, Leitinho, Lu, GPS, Alberto, Dico, Spok, Gui, Tibo, a rapaziada da casa do hip hop Sanca, Luiza, Camila, Delay, Peste. Salve aos levantinos e levantinas de todo país. Pátria Livre! Venceremos!

Aos amigos e amigas de laboratório pela batalha diária e pelos ensinamentos. Percebi que ninguém é mais que ninguém se não nos propusermos a ajudar. Este trampo não teria terminado sem a ajuda de meus colegas, obrigado a todo LBMC. Um abraço especial pro Rapha, Ueslei, Alline, Bruno, Carol, Ro, Mari, Regina, Karen, Créu de novo, Gi, Carmen, Carla, Paola, Andreia, Lucas...

Juan, Lelê e Dani obrigado pelas contribuições em minha qualificação.

Aos Professores Mercival Roberto Francisco, Cristina Miyaki, Milton Ribeiro e Luís Fábio Silveira meu muito obrigado pelas amostras de tangarás, contribuições, oportunidades e aprendizados.

Agradecimento especial a Mata Atlântica e seus tangarás por me proporcionarem estímulo e mostrarem a necessidade da luta pela conservação de nossa biodiversidade tão agredida.

Aos órgãos de fomento a ciência pelo auxílio financeiro em nossa pesquisa e pela bolsa concedida, meu obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimento aos e as trabalhadoras do PPGERN (João e Roseli) e do DGE-UFSCar.

“Ainda acredito que o bem pode se propagar. Quando os homens deixarem o egoísmo de lado. E reconquistarem a humildade e aprenderem a se respeitar. Quebraremos as barreiras que nós mesmos erguemos, quando sinceramente apreciarmos os demais e a nós mesmos. A nossa própria história encontrará no caminho da verdade, o sentido da vitória.”

P. de E.

## ÍNDICE

1. Introdução.....	13
1.1 Mata Atlântica: contexto ambiental.....	13
1.2 A família <i>Pipridae</i> e a espécie <i>Chiroxiphia caudata</i> .....	15
1.3 Genética da conservação.....	20
1.4 A técnica dos microssatélites .....	23
1.5 Consequências genéticas da fragmentação de habitats .....	25
2. Objetivo Geral.....	29
2.1 Objetivos específicos.....	29
3. Material e métodos.....	30
3.1 Áreas de estudo.....	30
3.2 Obtenção das amostras.....	32
3.3 Extração do DNA.....	32
3.4 Amplificação dos <i>loci</i> de microssatélites.....	32
3.5 Diversidade genética.....	35
3.6 Estruturação populacional.....	36
4. Resultados.....	36
4.1 Diversidade genética.....	36
4.2 Estruturação populacional.....	41
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	50
Referências bibliográficas.....	52
Apêndices.....	62

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Indivíduo juvenil macho de *C. caudata* capturado no Parque Estadual de Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo - SP) .....29
- Figura 2: Localização das populações de *Chiroxiphia caudata* amostradas na Mata Atlântica.....31
- Figura 3: Esquematização do processo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de acordo com a proposição de Shuelke (2000) .....33
- Figura 4: Gráfico gerado pela análise de correspondência fatorial. A figura indica os agrupamentos populacionais das cinco áreas amostradas.....42
- Figura 5: Gráfico gerado pela análise bayesiana. A figura indica os agrupamentos populacionais das cinco áreas amostradas.....43

## LISTA DE TABELAS

Tabela1: Sequências dos <i>loci</i> específicos para <i>C. caudata</i> utilizados no estudo e já adicionadas com a cauda M13. Estão representadas também as temperaturas de anelamento específicas para cada <i>locus</i> em graCelsius.....	34
Tabela 2: Para cada <i>locus</i> utilizado nas análises estão indicados os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC), a quantidade de alelos e a variação no comprimento.....	37
Tabela 3. Localidade: PECB. Informações sobre diversidade genética.....	38
Tabela 4. Localidade: PESC. Informações sobre diversidade genética.....	38
Tabela 5. Localidade: EEB. Informações sobre diversidade genética.....	39
Tabela 6. Localidade: RMG. Informações sobre diversidade genética.....	39
Tabela 7. Localidade: FCA. Informações sobre diversidade genética. ....	40
Tabela 8. Valores do número de alelos, número efetivo de alelos médio e riqueza alélica média para cada população.....	41
Tabela 9. Comparação par-a-par entre as populações e seus valores de FST.....	41
Tabela 10. Estimativa de diferenciação genética de Jost (Dest) para todos os pares de populações amostradas.....	43

## Resumo

A fragmentação de habitats é uma das principais ameaças à biodiversidade e um dos principais desafios enfrentados pela biologia da conservação. Este estudo avaliou os efeitos da fragmentação de habitat sobre a variabilidade genética de *Chiroxiphia caudata*, uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Foram utilizados 9 *loci* de microsatélites para a análise de 78 indivíduos inseridos em cinco áreas de Mata Atlântica. Encontramos desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg para déficit de heterozigotos e valores positivos de FIS em todas as populações. Foram encontrados alelos privados em todas as áreas. Quanto a estruturação populacional, as análises de  $F_{st}$ , Dest, análise Bayesiana e análise de correspondência fatorial indicam que as populações são estruturadas geneticamente e que somente a distância não pode explicar a diferenciação entre as áreas. Aparentemente esta espécie não teve sua variabilidade reduzida a partir do processo de fragmentação. A fragmentação e suas consequências quanto a diminuição do fluxo gênico pode estar atuando de maneira a aumentar a diferenciação entre áreas, inclusive áreas próximas que já apresentam indícios de início de diferenciação. A utilização de *C. caudata* como modelo de estudo da Mata Atlântica mostra que áreas mais fragmentadas possuem um papel muito importante para espécie, abrigando grande diversidade genética. Mesmo não sendo considerada uma espécie muito especializada quanto aos seus hábitos, o modelo de estudo baseado em *C. caudata* mostrou que mesmo espécies mais generalistas podem ser afetadas pela fragmentação. Quando tratamos de espécies mais especializadas, este panorama pode se tornar ainda pior.

Palavras-chave: *Chiroxiphia caudata*, fragmentação florestal, estrutura genética, Mata Atlântica.

**Abstract:**

Habitat fragmentation is one of the main threats to biodiversity and one of the main challenges faced by conservation biology. This study assessed the habitat fragmentation effects on the genetic variability of *Chiroxiphia caudata*, which is an Atlantic Forest endemic bird species. Nine microsatellite loci were used for the analysis of individuals from five Atlantic Forest areas. We found departure from HWE is due to heterozygotes deficit and positive values for the inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ) for all populations. Private alleles were found in all areas.  $F_{st}$ ,  $D_{est}$ , Bayesian and factorial correspondence analyses indicated that populations are genetically structured, but the distance could not explain the differentiation between areas. Apparently, this species did not suffer from a reduction in its variability because of the habitat fragmentation process. The fragmentation and its consequences as the reduction of gene flow may be acting in order to increase the differentiation between areas, including nearby areas that already show evidence of early differentiation. The choice of *C. caudata* for this study concerning the Atlantic Forest revealed the most fragmented areas played an important role for the specie by sheltering great genetic diversity within itself. Although not considered a very specialized specie as to their habits, the study model based on *C. caudata* showed that even more generalist species may be affected by fragmentation. When dealing with more specialized species, this scenario can become even worse

Keywords: *Chiroxiphia caudata*, forest fragmentation, genetic structure, Atlantic Forest.



Foto: Paulo Victor Queijo Zima. Indivíduo macho de *C. caudata* capturado no Parque Estadual de Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo - SP)

## **1.Introdução Geral**

### **1.1 Mata Atlântica: contexto ambiental**

A América Latina é o local onde se localiza a Mata Atlântica, um dos 25 *hotspots* da biodiversidade mundial. O conceito de *hotspot* foi introduzido no ano de 1988. É caracterizado pela presença de muitos endemismos e por uma acentuada perda de vegetação natural. Estas áreas já ocuparam quase 12% da superfície terrestre porém, perderam 70% de sua cobertura original. Hoje ocupam apenas 2% da superfície do planeta. Mesmo assim, abrigam mais de 60% das espécies terrestres. A conservação destas áreas se torna prioritária, fazendo com que tenhamos menos riscos de extinção de espécies (GALINDO-LEAL E CÂMARA, 2003, MYERS, 1988; MYERS, et al., 2000). Estes ambientes são altamente antropizados. Possuem densidades populacionais maiores do que em outras regiões do planeta e contam com taxas de crescimento da população que ultrapassa as taxas mundiais. Sabe-se que os impactos humanos estão intrinsecamente ligados as extinções e a perda da biodiversidade (CINCOTTA et al., 2000).

Os riscos que afetam o equilíbrio biológico da Mata Atlântica são grandes, principalmente pelo alto grau de devastação ao qual este bioma está inserido. A rapidez nas alterações deste *hotspot* nos leva a pensar de maneira urgente em planos de conservação (GALINDO-LEAL e CÂMARA, 2003). As taxas de desmatamento são crescentes em diversas regiões. Em termos totais, este bioma apresenta taxa de redução da vegetação natural de 0,5% por ano. A taxa extrema de devastação é atingida na região metropolitana de São Paulo. Nesta região a taxa pode chegar a 2,9% por ano de redução de áreas naturais (TEIXEIRA et al., 2009). Da cobertura original de 139 milhões de hectares, restam apenas 15,7 milhões de hectares. Ou seja, nos restam apenas 11,73% de Mata Atlântica nativa, distribuídas nas sub-regiões biogeográficas da Serra do Mar (representando 36,5% dos remanescentes nativos), Araucária, Bahia, Brejos Nordestinos, Diamantina, Interior, Pernambuco e São Francisco, que representa apenas 4,7% da vegetação remanescente (RIBEIRO et al. 2009).

Sua especial importância biológica mostra-se em sua grande variedade de composições e fisionomias (METZGER, 2009). Seu território se estende por uma diversa gama de latitudes, cobre diversas zonas climáticas e está presente em elevações desde o nível do mar até 2.900m de altitude (MANTOVANI, 2003). Tais condições favorecem a alta diversidade e a presença de endemismos. Somente a Mata Atlântica é responsável por abrigar de 1-8% das espécies do planeta, totalizando de 20000 espécies de plantas,

1400 espécies de vertebrados terrestres e milhares de espécies de invertebrados. Existem mais de 8000 espécies endêmicas de plantas, 148 espécies de aves, 71 de mamíferos, 94 de répteis e 286 de anfíbios. Possui também formações raras como mangues, restingas e florestas secas que abrigam uma fauna bastante especializada (LAURANCE, 2009; MITTERMEIER et al., 2005; MYERS et al., 2000; SILVA e CASTELETI, 2003).

Este contexto onde a Mata Atlântica está inserida é bastante preocupante. Esta floresta tropical é provavelmente uma das mais ameaçadas, mesmo contando com uma rica biodiversidade (METZGER, 2009). Torna-se necessário que sejam compreendidos dois tipos de questões para que a conservação dos remanescentes seja feita de maneira eficaz. A primeira referente aos aspectos históricos e sociais do uso e ocupação deste território e a segunda aos processos ecológicos e evolutivos.

A ocupação histórica deste bioma nos mostra uma grande desigualdade social quanto a posse das terras. Além deste aspecto de concentração das terras, mais de 120 milhões de pessoas vivem neste local, apresentando uma alta atividade econômica. A consequência desta realidade são as grandes alterações nos usos e ocupações das terras. Embora existam áreas fortemente urbanizadas, como as cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, muitas áreas rurais historicamente tem passado por diversos usos intensivos da terra como, a cana-de-açúcar, o pau-brasil, café, pecuária, etc. Mais recentemente podemos citar os monocultivos da soja, pinus e eucalipto (GALINDO-LEAL e CÂMARA, 2003; METZGER, 2009), outros tipos de pressões antrópicas como a caça, produção de biocombustíveis e a expansão urbana também agravam esta realidade (LAURANCE, 2009). Neste contexto de intensas atividades de mudanças ambientais, as áreas mais preservadas nos dias atuais são aquelas de mais difícil acesso. Áreas íngremes tornam a ocupação humana mais difícil e por isso se mantêm mais conservadas (SILVA et al., 2007).

Além de questões mais diretas quanto a biodiversidade, existe uma grande perda da diversidade biocultural e muitos dos conhecimentos tradicionais de manejo deste sistema ecológico já se perderam. Comunidades indígenas vem perdendo sua cultura e seu território devido a colonização desenfreada e hoje existem apenas 134mil indígenas vivendo no domínio da Mata Atlântica (GALINDO-LEAL e CÂMARA, 2003).

Como consequência do processo histórico, a fragmentação deste ecossistema foi inevitável. Atualmente a Mata Atlântica conta com mais de 245 mil fragmentos, sendo 83% destes fragmentos menores do que 50 hectares. Mais de 50% destes fragmentos

tem suas regiões centrais a menos de 100m da borda (RIBEIRO et al. 2009). Esta situação de fragmentação gera problemáticas ecológicas e evolutivas para as espécies da Mata Atlântica. No caso das aves, cerca de 660 espécies habitam este bioma, sendo aproximadamente 200 endêmicas da Mata Atlântica. A maioria das espécies (63%) preferem habitats não perturbados. Quanto as espécies endêmicas, apenas 8,5% ocupam habitats perturbados que em sua grande maioria sofrem com efeitos da fragmentação (GOERCK, 1997). Entender as ameaças da fragmentação florestal e buscar soluções para este processo são cruciais para a manutenção da biodiversidade da Mata Atlântica, assim como propor ações de restauração florestal e criação de corredores ecológicos (LAURANCE, 2009). O efeito da fragmentação pode ser notado principalmente pelas alterações na composição de espécies nos remanescentes (LOPES et al., 2009) e muitos estudos vem dando a orientação para se compreender como a fragmentação pode influenciar nos processos ecológicos (METZGER, 2009).

Ao final da década de 30 existiam apenas 6 áreas de proteção da Mata Atlântica, na década de 70 já existiam 90. Os últimos anos indicam um aumento significativo no número de áreas protegidas, ultrapassando a quantidade de 650 áreas. No entanto, muitas dessas áreas foram escolhidas de maneira oportunista e não baseadas em conceitos da biologia da conservação (GALINDO-LEAL e CÂMARA, 2003).

Se tomarmos em consideração o cenário ambiental brasileiro, fora as áreas protegidas, outras áreas da Mata Atlântica estão sendo comprometidas pelos efeitos antrópicos e conseqüentemente favorecendo o processo de fragmentação mesmo com leis ambientais e medidas para se frear o desmatamento (TEIXEIRA et. al, 2009).

Mesmo com toda esta problemática quanto a fragmentação e devastação do bioma, o que se tem nos dias atuais de áreas protegidas da Mata Atlântica é apenas 1% de sua cobertura original. Dos remanescentes florestais, apenas 14,4% estão sobre proteção. Este número pode se reduzir a 9,3% caso não sejam considerados outros tipos de vegetação dentro das áreas de proteção. Para agravar ainda mais a situação, 61% dos fragmentos remanescentes estão a mais do que 25km de distância das áreas de proteção. Algumas prioridades devem ser compreendidas como estratégia de conservação: (a) as maiores áreas devem ser priorizadas para proteção; (b) fragmentos menores devem ser entendidos como ligações para a biodiversidade imersa em matrizes não florestais; (c) as matrizes também devem ser repensadas para que se possa diminuir o efeito de borda nos fragmentos, já que o efeito negativo das matrizes sobre os pequenos fragmentos é grande (RIBEIRO et al. 2009).

O que não podemos nos esquecer é que as extinções de espécies são definitivas. Atualmente na Mata Atlântica existem mais de 110 espécies ameaçadas, sendo 29 classificadas como criticamente em perigo. Algumas espécies, principalmente aves, já foram extintas (GALINDO-LEAL e CÂMARA, 2003). Entender como a fragmentação de habitat pode afetar os diferentes tipos de processos ecológicos é fundamental para a formulação de conhecimento que seja compatível com a conservação deste bioma.

## **1.2. A família *Pipridae* e a espécie *Chiroxiphia caudata***

Conhecido popularmente como tangará-dançarino, tangará-dançador ou rendeira, esta espécie está inserida na ordem dos passeriformes e pertence à família *Pipridae*. Os piprídeos são conhecidos pelo seu atraente colorido e cerimônias pré-nupciais frequentemente coletivas. Representam uma das famílias mais abundantes nos sub-bosques tropicais, ocupando áreas das Américas Central e do Sul (SNOW 2004; TRAYLOR e FITZPATRICK, 1982). Existem algumas discordâncias quanto ao total de espécies e gêneros, porém os números giram em torno de 50 espécies e 15 gêneros (GILL e DONSKER, 2013; REMSEN et al., 2013)

A partir da análise filogenética de 14 espécies de tangarás, resultou uma hipótese que comprova a relação entre tiranídeos e os tangarás "core" (*Antilophia*, *Chiroxiphia*, *Corapipo*, *Dixiphia*, *Heterocercus*, *Ilicura*, *Lepidothrix*, *Manacus*, *Masius*, *Machaeropterus*, *Pipra* e *Xenopipo*). Os resultados apoiam fortemente que estes gêneros, pertencentes ao grupo "core" são um grupo monofilético (MCKAY et al. 2010). *Chiroxiphia caudata*, inserida dentro da família dos piprídeos, possui maior relação filogenética com as espécies incluídas na sub-família Piprinae e na sub-divisão Illicurini, juntamente com *I. militaris*, *M. chrysopterus*, *C. gutturalis*, *C. altera*, *C. leucorrhoea*, *A. galeata*, *A. bokermanni*, *C. pareola*, *C. linearis*, *C. lanceolata* e *C. boliviana* (OHLSON; FJELDSÅ; ERICSON, 2013)

Os piprídeos apresentam características comuns quanto a morfologia. As fêmeas são em sua maioria maiores que os machos e de coloração esverdeada, diferentemente dos machos que após o período de maturação apresentam uma grande variedade de colorações. Características de vocalização são específicas entre as espécies. Tais vocalizações são geralmente realizadas por machos para definição de territórios e chamados para danças pré-nupciais. Fêmeas em geral são mais silenciosas (SICK, 1997).

Quanto as cerimônias pré-nupciais e seu comportamento de seleção sexual pode-se destacar alguns pontos. São em sua maioria poligâmicos, comportamento facilitado pela

abundância de alimentos e a capacidade da fêmea em criar os filhotes sozinha. Esta família apresenta um típico sistema de acasalamento, onde existe a formação de *leks* (agrupamento de machos que realizam danças pré-nupciais para atrair fêmeas na estação reprodutiva). Os machos mantêm seu território e realizam danças e vocalizações pré-nupciais para atrair as fêmeas (PRUM, 1998; SICK, 1997; SNOW, 2004). As danças pré-nupciais são marcadas por uma vocalização de um macho alfa para o agrupamento de outros machos. Tais danças podem ocorrer na presença ou não das fêmeas. Após a saída da fêmea do cortejo os machos cessam a dança por um período, retomando-a logo em seguida para atração de mais fêmeas. As danças são geralmente realizadas em poleiros que tendem a ser utilizados pelos mesmos machos por vários anos (SICK, 1997).

Um estudo comportamental realizado por McDonald (2003) mostrou que machos de *Chiroxiphia linearis* apresentam a maior variação no sucesso reprodutivo masculino gravado em vertebrados por causa da elevada desproporcionalidade no sucesso reprodutivo obtido pelo macho *alfa* dominante em relação aos machos subordinados. Este fator pode explicar o tamanho reduzido de populações de *Chiroxiphia caudata* (assumindo um comportamento semelhante dos machos reprodutivos) e estar associado a estruturação populacional genética encontrada nas populações de estudo de Francisco et al. (2007).

Os piprídeos são aves que mesmo estreitamente aparentadas habitam regiões não sobrepostas, embora com áreas limítrofes. Quando encontrados em mais de uma espécie por região, estas pertencem a gêneros distintos (SICK, 1997).

A espécie *Chiroxiphia caudata* apresenta pequeno porte, pesando de 6g a 7g e medindo de 10cm a 13cm. Tem como hábitat a Mata Atlântica, ocupando áreas no Paraguai, Argentina e Brasil, ocorrendo desde o sul Bahia até sul e sudeste do país. Em sua distribuição geográfica pode sobrepor-se com a distribuição de outros piprídeos (NAROSKY e YZURIETA, 2006; SICK, 1997). Existe uma diferença marcante entre machos e fêmeas. Os machos são coloridos, com tons de azul, preto e um topete vermelho. As fêmeas apresentam coloração verde oliva (SICK, 1997). O dimorfismo sexual apresentado pode ser explicado pela forte pressão de seleção sexual durante a escolha, por parte da fêmea para o acasalamento, fazendo com que os machos se tornassem mais vistosos (SNOW, 2004; PRUM, 1997). A seleção sexual além de interferir nos processos comportamentais e morfológicos, também age sobre a formação de linhagens evolutivas distintas (ANCIÃES et al., 2009).



Figura 1. Indivíduo juvenil macho de *C. caudata* capturado no Parque Estadual de Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo - SP). Nota-se que a coloração atraente dos machos só é evidente após o período de desenvolvimento para a idade adulta. Foto: Paulo Victor Queijo Zima

A partir do vocalizar do macho dominante ou alfa, outros machos são atraídos a fim de colaborar com a dança e assim atrair as fêmeas que visitam diversos poleiros (SICK, 1997). Durante a realização da dança os machos se enfileiram em uma mesma direção sobre um galho (palco). O indivíduo verde (fêmea ou macho imaturo) em uma das pontas é a referência para o movimento dos machos, que se deslocam nesta direção. Ao chegar próximo deste indivíduo o macho dançarino voa e se recoloca no final da fila, retornando novamente a movimentação. Todo este ritual é acompanhado por vocalizações específicas deste comportamento. Uma nova vocalização encerra a dança e é realizada pelo macho alfa (SICK, 1997).

Este comportamento é bastante intrigante. Os machos se reúnem em áreas específicas com território entre 30 – 35 hectares(ha). Nestas áreas utilizam poleiros e formam arenas ou *leks* que possuem um macho dominante (alfa). Este macho na grande maioria das vezes é o responsável pela cópula, fazendo com que os outros machos gastem energia e cooperem para atrair a fêmea, porém não realizem cópula, mesmo os que já atingiram maturidade sexual. A idade média de início da cópula para os machos é de 8 anos e a expectativa de vida de 10 anos. Alguns dos machos subordinados podem nunca se reproduzir (FOSTER, 1981; HÖGLUND e ALATALO, 1995; MCDONALD, 1993). Um fato especial dos tangarás-dançarinos é que o cortejo nupcial pode ser feito para um macho imaturo, com plumagem ainda verde que deve assumir o papel de fêmea. A dança realizada por machos jovens é geralmente mais desorganizada do que

a realizada por machos mais experimentados (SICK, 1997). Estudos comportamentais de *C. caudata* mostram que existe uma hierarquia dentro dos *leks* e que a sua composição quanto aos machos presentes se altera de ano para ano. Um *lek* em alguns anos pode ter sua composição completamente alterada (FOSTER, 1981). Além disso, parece haver um sistema de *leks*, onde os machos podem se utilizar de mais de um *lek* e assumir diferentes posições hierárquicas dependendo do *lek* utilizado (BRODT et al. 2013)

O cuidado parental corresponde às fêmeas. Seus territórios se localizam próximos aos ninhos e longe dos poleiros de cortejo. Constroem uma cestinha frágil, afixada em uma forquilha. Como material para o ninho utilizam teias de aranhas, alguns fungos negros também podem fazer parte da estrutura, ajudando inclusive a camuflá-lo na mata (SICK, 1997).

Em relação ao comportamento alimentar, os tangarás apresentam uma dieta onívora, alimentando-se de frutos (GALETTI e PIZO, 1996) e esporadicamente de insetos (LOPES, 2005)

O tangará (*Chiroxiphia caudata*) desde o primeiro século após a colonização brasileira, já era citado por seu comportamento distinto, sendo apreciado pelos colonizadores. (SICK, 1997).

Mesmo em um contexto ambiental de alta fragmentação de habitat, *Chiroxiphia caudata* tem seu status de conservação definido como pouco preocupante. Esta classificação é baseada em sua grande distribuição geográfica (maior do que 20.000km<sup>2</sup>) e pelo fato de que, mesmo não havendo uma quantificação precisa da população, acredita-se que a população tenha mais de 10.000 indivíduos e com declínio populacional menor que 10% em 10 anos ou 3 gerações (IUCN, 2013)

O que se sabe sobre sua locomoção em ambientes fragmentados é que os indivíduos de *Chiroxiphia caudata* evitam áreas de borda e preferem áreas de interior. Este fato não exclui sua movimentação entre fragmentos. Sua área de vida se torna maior em ambientes mais fragmentados, em relação a ambientes contínuos (HANSBAUER et al., 2008b). O aumento da área de vida para *C. caudata* em áreas fragmentadas está relacionado com uma maior busca por alimento, abrigo e locais para nidificação. Machos apresentam menores e mais estáveis áreas de vida, já as fêmeas em época pré-reprodutiva aumentam sua área de vida e podem chegar a uma área total de 460ha e moverem-se por manchas de hábitat com distância de 3,5km (HANSBAUER et al., 2008a). *C. caudata* é capaz de fazer uso de tipos de habitats antropizados de vários graus, e pode perceber a paisagem em tons de cinza em vez de preto e branco, ou seja,

não é tão específico quanto a utilização de hábitat (HANSBAUER et al., 2010). Um estudo realizado por Uezu et al. (2005) mostrou que dentro de um cenário de fragmentação de hábitat, *C. caudata* pode utilizar corredores ecológicos como hábitat e que a distância entre as manchas parece não impactar a abundância da espécie, assim como não representa elevados custos para a dispersão. Desta forma, todos os fragmentos estudados se mostraram funcionalmente ligados e a distribuição e abundância da espécie estão mais relacionadas com fatores locais, como disponibilidade de recursos.

Estudos genéticos com *Chiroxiphia caudata* nos mostram importantes informações. Um primeiro exemplo de estudo é o trabalho realizado por Francisco et al. (2004) descrevendo *primers* específicos para utilização de marcadores microssatélites em análises de variabilidade genética. Outro estudo mostrou que análises de parentesco realizadas com amostras de diversos *leks* indicaram que os machos não são necessariamente aparentados. Este fato traz novas perspectivas sobre qual o mecanismo de seleção que influencia a formação de *leks* e o acasalamento apenas do macho alfa (FRANCISCO et al., 2009). Análises de variabilidade foram feitas entre populações situadas dentro do contínuo de Mata Atlântica (Serra de Paranapiacaba e Serra do Mar). Como resultado, as populações se mostraram diferenciadas geneticamente, ou seja, mesmo em um ambiente sem barreiras naturais ou antrópicas as populações se mostraram estruturadas geneticamente. Tal fato pode estar associado com as características comportamentais dos tangarás (FRANCISCO, 2007).

### **1.3 Genética da conservação**

Genética da conservação é uma ciência aplicada que envolve os conhecimentos relacionados à genética evolutiva e molecular para a conservação da biodiversidade. (FRANKHAM, 2010). Os genes são um dos níveis de conservação indicados pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Esta orientação diz respeito a urgência nos processos de conservação da biodiversidade contida em genes, espécies e ecossistemas. Todos estes níveis devem ser levados em conta para uma real manutenção da biodiversidade (MCNEELY et al., 1990). O desafio mais importante para os estudos genéticos que visam a biologia da conservação é abordar as questões genéticas de forma prática na gestão das populações fragmentadas selvagens de espécies ameaçadas (FRANKHAM, 2010a).

A redução da diversidade genética, a base de todos os processos ecológicos, pode ter efeitos negativos de extrema preocupação, uma vez que são os genes e as forças evolutivas que os regulam, os responsáveis pela adaptação das espécies as novas

condições ambientais e a especiação. O que se tem com o passar do tempo são mudanças nas frequências alélicas e a constante evolução das espécies que se integrarão a comunidades e ecossistemas (TEMPLETON et al., 2001). As mudanças nas frequências alélicas serão fruto da deriva genética (que diminui a variação genética dentro, mas aumenta a diferenciação genética entre as populações locais) e fluxo gênico (o que aumenta a variação dentro, mas diminui a diferenciação entre as populações locais), assim como características comportamentais da espécie (TEMPLETON et al., 2001; TEMPLETON, 2006)

Atividades humanas na maioria das vezes favorece os efeitos da deriva e diminui o fluxo gênico de muitas espécies, reduzindo a variação genética nas populações locais e evitando a propagação de complexos adaptativos fora de sua população de origem. Prejudicando, assim, os processos de adaptação local e global de determinada espécie. Alguns trabalhos argumentam que, embora a fragmentação induzida pelo homem possa perturbar a adaptação, este processo pode produzir novas espécies através de efeito fundador. No entanto, a teoria genética populacional e experiências práticas dizem justamente o contrário e preveem que a maioria dos eventos de fragmentação causadas pelas atividades humanas facilitará não especiação, mas a extinção local. Efeitos fundadores desempenham um papel importante na macroevolução de certos grupos, mas apenas quando as oportunidades ecológicas estão em expansão, em vez de estarem em contração (como é o caso do processo fragmentativo). O impacto geral das atividades humanas sobre a diversidade genética perturba ou diminui a capacidade de adaptação, especiação e mudança macroevolutiva. Este impacto acabará por diminuir a biodiversidade em todos os níveis (TEMPLETON et al., 2001).

Das várias formas de utilizar a genética em estudos conservacionistas podemos citar dois itens: aplicação da genética molecular para obter informações importantes para a conservação das espécies (sexo, tamanho da população, história demográfica, sistema de acasalamento, estrutura populacional, fluxo gênico, parentesco, dieta, doenças) e manejo genético para minimizar a endogamia e perda de diversidade genética nas populações e espécies em ambientes naturais (FRANKHAM, 2010a)

Temos avanços positivos nas técnicas genéticas aplicadas para a conservação de espécies ameaçadas mantidas em cativeiro. Hoje já se consegue minimizar os efeitos deletérios das populações em cativeiro, o que facilita inclusive a reintrodução dos animais. Por outro lado o conhecimento da genética da conservação de grupos animais de vida livre ainda é insipiente para planos de manejo. Este fato não é favorecido pela falta de rigor científico, mas sim pela falta de consideração das questões genéticas no

manejo das áreas naturais. Uma das questões mais necessárias na biologia da conservação diz respeito as abordagens da genética frente a problemática das populações selvagens vivendo em ambientes altamente fragmentados (FRANKHAM, 2010).

Compreendendo-se de diversidade genética a partir de técnicas moleculares, muito se sabe sobre esta variação em espécies, ameaçadas ou não. Porém sabe-se que a evolução das espécies está mais relacionada às questões da genética quantitativa do que simplesmente a diversidade genética elucidada pelas análises moleculares. No geral estas variáveis são pouco correlacionadas. Existe uma necessidade de compreensão de como fatores genéticos quantitativos (ex. fecundidade, peso corporal) vem variando. Outra necessidade de conhecimento diz respeito aos sistemas de acasalamento. Entender as características intrínsecas das espécies se faz necessário para um bom manejo genético (FRANKHAM, 2010; FRANKHAM, 2010a).

As populações naturais podem ser afetadas negativamente por diversos fatores. Um deles é o fator genético. Outros fatores como as variáveis ambientais, catástrofes e impactos humanos também afetam as populações naturais. Embora não se tenha a noção precisa, sabemos que os fatores genéticos tem uma substancial importância no processo extinção de espécies (FRANKHAM, 2010a).

Hoje não existe um consenso na ciência sobre a real interferência da genética nos processos de extinção. Algumas pesquisas trazem a perspectiva de que os efeitos da perda de diversidade genética podem não trazer consequências diretas para a extinção das espécies, enquanto outras pesquisas dizem justamente o contrário (FRANKHAM, 2005).

As evidências mais diretas relacionadas a endogamia são evidenciadas em aspectos reprodutivos e de sobrevivência como acasalamento, fecundidade, cuidado parental, sobrevivência de juvenis, idade de maturação sexual, etc. (FRANKHAM, 2002). Em um estudo realizado com 12 espécies de mamíferos, o resultado nos mostra os efeitos da endogamia, onde 11 espécies indicaram uma maior mortalidade de juvenis em populações com maiores graus de endogamia (RALLS e BALLOU, 1982). Outros experimentos mostraram resultados semelhantes evidenciando uma queda na sobrevivência de juvenis com maiores graus de endogamia em 41 das 44 populações estudadas (RALLS e BALLOU, 1983) e uma taxa de 33% de mortalidade a mais para indivíduos juvenis também com maiores graus de endogamia (RALLS et al., 1988). Deste modo, a endogamia reduzindo reprodução e sobrevivência, a expectativa é

umentar os riscos de extinção em situações em que outros fatores são controlados ou inexistentes (FRANKHAM, 2002).

O número, a origem e a diversidade genética das populações formam um eixo central para acessar os impactos na diversidade genética e a persistência das populações (MAUDE et al., 2002)

Na última década, as abordagens genéticas para responder questões ecológicas tornaram-se mais eficientes, poderosas e flexíveis. Marcadores genéticos como aloenzimas, microssatélites, mitocondriais e sequências de DNA nuclear podem ser utilizados para estimar muitos parâmetros de interesse para os ecólogos, como taxas de migração, o tamanho da população, gargalos, parentesco, etc. (SELKOE e TOONEN, 2006)

Informações sobre a genética das espécies, como seus níveis de diversidade, estrutura populacional, a presença de gargalos populacionais e as taxas de endogamia, entre outros, são de valor fundamental para a preservação da biodiversidade. A partir deste entendimento se tem reconhecido o papel da variabilidade genética dentro e entre populações na construção dos planos de conservação e proteção (ALLENDORF e LUIKART 2007; FRANKHAM et al. 2005).

Além disso, já se sabe os efeitos da perda da variabilidade genética nas populações. Se pensarmos em aspectos populacionais a longo prazo, esta redução da diversidade genética faz com que a sobrevivência da espécie seja reduzida através da diminuição do potencial adaptativo aos novos ambientes. Deste modo a manutenção das populações locais e suas características genéticas é fundamental na biologia da conservação (FRANKHAM et al. 2005; GIBBS 2001).

#### **1.4 A técnica dos microssatélites**

Os microssatélites são repetições em tandem de sequências de DNA distribuídas largamente no genoma dos eucariotos, apresentando no máximo 6 pares de bases e com comportamento mutacional característico (BACHTROG et al., 2000; GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999; KELKAR et al., 2010; KRUGLYAK et al., 2000). Além desta denominação, os microssatélites podem assumir as seguintes denominações: *simple sequence repeats* (SSR), *variable number tandem repeats* (VNTR) e *short tandem repeats* (STR) (SELKOE e TOONEN, 2006).

A maioria destas sequências ocorre em regiões não codificadoras. Desta maneira não possuem muita significância em consequências da seleção. Seu elevado grau de variabilidade está associado as elevadas taxas de mutação, que alteram seu

comprimento (HARR et al., 1998; KRUGLYAK et al., 2000). Essas taxas de mutação diferem entre os *loci* (HARR et al., 1998). Estes marcadores apresentam uma alta taxa de mutação ( $10^{-2} - 10^{-6}$ ), comparados com taxas de mutações em áreas codificadoras (YOU-CHUN, 2002).

A principal característica dos microssatélites, que os tornam importantes ferramentas genéticas, é o alto grau de polimorfismo. Esta característica se reflete na variação alélica (TAUTZ, 1989). Diferentes indivíduos podem apresentar uma variação no número de repetições em determinado *locus* (GUICHOUX et al., 2011).

A região com DNA inserido na parte circundante de um *locus* de microssatélite é denominada região flanqueadora. Estas regiões são muito conservadas dentro de uma mesma espécie e possuem certa semelhança mesmo entre espécies distintas. Pequenas porções de DNA denominadas *primers* podem ser desenhados para se ligarem a estas regiões flanqueadoras. Os *primers* são importantes pois podem através das reações em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction) direcionar a amplificação de determinado *locus* de microssatélite. A diferenciação dos diferentes alelos de um *locus* se dá através das diferenças de tamanho geradas por processos mutacionais (SELKOE e TOONEN, 2006).

A importância e a taxa de utilização dos microssatélites vem aumentando cada vez mais com o passar dos anos. Sua excepcional variabilidade de sequências possibilita diversas utilizações. Temos como exemplo o mapeamento genético, análises forenses, biologia da conservação e ecologia evolutiva (GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999).

Na última década, as abordagens genéticas para responder questões ecológicas tornaram-se mais eficientes, poderosas e flexíveis. Marcadores genéticos como aloenzimas, microssatélites, mitocondriais e sequências de DNA nuclear podem ser utilizados para estimar muitos parâmetros de interesse para os ecologistas, como taxas de migração, o tamanho da população, gargalos genéticos populacionais, graus de parentesco, etc. A utilização de microssatélites para estudos ecológicos se tornou popular, uma vez que esta técnica nos permite realizar estimativas contemporâneas desde taxas de migração até dados quanto ao grau de relação entre os indivíduos. Muitas questões ecológicas podem ser respondidas através da utilização deste marcador molecular. Questões relacionadas a genética de populações também podem ser resolvidas (GUICHOUX et al., 2011; SELKOE e TOONEN, 2006).

Outra importante característica relacionada aos microssatélites se refere ao seu tamanho. Pelo fato dos *loci* de microssatélites terem um tamanho relativamente

pequeno dentro de todo o genoma, os microssatélites podem ser utilizados mesmo em um DNA degradado ou sem parte de sua sequência original (TABERLET et al. 1999)

Marcadores microssatélites acompanhados de métodos estatísticos são uma importante ferramenta para conservação e manejo de populações selvagens. Eles podem indicar a diversidade genética presente nas populações em estudo, identificar a presença de gargalos populacionais, assim como a população de origem de determinado indivíduo (MAUDE et al., 2002).

Um problema associado aos microssatélites é a presença de alelos nulos. Alelos nulos podem surgir a partir de variações (polimorfismos) nas sequências nucleotídicas da região flanqueadora, impedindo o anelamento do *primer* na amostra de DNA (CALLEN et al., 1993). Outras possíveis causas da presença de alelos nulos estão relacionadas com a amplificação preferencial de alelos curtos, seja pela má qualidade e quantidade de DNA (GAGNEUX et al., 1997), assim como “derrapagem” ou *slippage* durante a amplificação (SHINDE et al., 2003). A presença de alelos nulos com a metodologia de microssatélites tem sido constante em estudos de genética de populações, cerca de 90% dos artigos que utilizam a metodologia de microssatélites mostram a presença de alelos nulos (DAKIN e AVISE 2004). Alelos nulos podem afetar a estimativa de diferenciação populacional através da redução da diversidade genética em populações (PAETKAU e STROBECK 1995). A deficiência de heterozigotos pode ser explicada também por subestruturação populacional e amostragem não aleatória (DRINAN et al., 2011).

### **1.5 Consequências genéticas da fragmentação de habitats**

O processo de fragmentação é um dos principais riscos para a biodiversidade e se configura também como um dos principais desafios para a biologia da conservação (FAHRIG, 2003; HENLE et al., 2004).

A fragmentação de habitats pode ser definida como um processo. Uma grande extensão de habitat natural é transformada em vários pequenos fragmentos de área total menor e isolados uns dos outros por uma matriz de habitats não naturais (WILCOVE et al., 1986). Esta definição de fragmentação de habitat acima implica em quatro efeitos deste processo: (a) redução na quantidade de habitat, (b) aumento do número de manchas de habitat, (c) diminuição tamanhos de manchas de habitat, e (d) o aumento do isolamento de manchas (FAHRIG, 2003).

A totalidade deste processo faz com que a fragmentação tenha efeitos negativos relacionados principalmente a perda de hábitat, alteração espacial e qualidade dos fragmentos (EZARD e TRAVIS, 2006; FAHRIG, 2003).

Infelizmente a realidade de proteção de áreas naturais abrange apenas uma pequena parte de toda biodiversidade. Mesmo áreas florestais fora das unidades de conservação se tornam de grande importância uma vez que representam centros de biodiversidade. Estas áreas naturais estão inseridas dentro de uma paisagem tomada pela agricultura, principalmente nos trópicos. Tais áreas devem estar entre as prioridades de conservação (ANAND et al., 2010; PERFECTO e VANDERMEER 2008)

Os efeitos da fragmentação são vários. Podemos citar a quebra de rotas de migração entre populações, redução do número de predadores (principalmente os predadores de topo) e aumento do número de presas, mudanças no micro-habitat, favorecimento da colonização por espécies invasoras, redução de recursos, etc. Muitos destes efeitos não estão diretamente relacionados a genética. Porém, além destes já citados, existem consequências diretas relacionadas a genética. Podemos citar (a) depressão endogâmica, que é maior em pequenas e isoladas populações do que em grandes e contínuas populações; (b) perda de mutações benéficas raras nas populações locais; (c) enfraquecimento da seleção natural e redução da capacidade evolutiva caso não exista mais migração entre os fragmentos, reduzindo a capacidade adaptativa frente as mudanças ambientais; (d) pequenas populações fragmentadas estão mais susceptíveis à deriva genética e conseqüentemente tem maior risco de extinção (BURKEY e REED, 2006; LOWE et al., 2005; REED and FRANKHAM, 2003).

A diminuição do tamanho efetivo populacional e da conectividade entre as populações gerados pelo processo de fragmentação, também atuam negativamente de maneira a reduzir a diversidade genética neutra e adaptativa das populações (JOHANSSON et al., 2007). Outra problemática a ser citada é a diferenciação induzida entre indivíduos de fragmentos distintos e não conectados. Neste sentido, é importante restaurar o fluxo gênico entre as áreas analisadas a fim de evitar as consequências demográficas e genéticas negativas de pequeno tamanho da população, bem como assegurar a viabilidade a longo prazo destes grupos (HAAG et al., 2010).

Como consequência da perda e degradação de habitats está associada uma grave perda de variação genética. A gravidade do gargalo genético é determinada pela gravidade da perda de hábitat, isto é, a gravidade e duração da redução do tamanho da população (BARRETT e KOHN, 1991)

Diversos estudos vem mostrando as consequências negativas da fragmentação de habitats sobre as características genéticas das populações. Um estudo realizado com populações de *Pantera onca*, mostrou que a fragmentação traz reduções significativas na diversidade genética nas populações e favorece a diferenciação genética entre os indivíduos de diferentes fragmentos devido à redução do fluxo gênico (HAAG et al., 2010). Outro estudo realizado com *Rana ornata* também identificou respostas genética negativas a fragmentação, relacionadas principalmente a perda de diversidade genética, deriva e ao fluxo gênico (DIXO et al., 2009). A espécie vegetal *Mauritia flexuosa* estudada por Federman et al. (2014) indicou que existe diferenciação genética entre diferentes populações fragmentadas e altos níveis de acasalamento entre plantas de um mesmo fragmento. Esta barreira ao fluxo gênico foi atribuída a fragmentação. Um último exemplo dos efeitos genéticos negativos relacionados a fragmentação florestal pode ser explanado pelo estudo com a espécie *Falgun sylvatica*, onde fragmentação trouxe aumento da diferenciação genética entre as populações, principalmente as mais distantes (LEONARDI et al., 2012).

Ao estudar os impactos da fragmentação e da urbanização sobre uma população de *Perdix perdix*, Bech et al. (2014) perceberam que estes processos antrópicos podem estar acelerando o processo de diferenciação da espécie e que o avanço do processo fragmentativo pode levar a uma diferenciação completa das populações pela persistência das barreiras que não permitem o fluxo gênico.

As hipóteses sobre o impacto negativo da fragmentação sobre a diversidade genética são a base para o paradigma genético conservação (OUBORG et al. 2006). Para um real estudo sobre como a fragmentação está influenciando as características genéticas, as técnicas genéticas devem ser adequadas. Marcadores microssatélites são um bom parâmetro para indicar tais influências. Estes marcadores por terem uma alta taxa de mutação e conseqüentemente de variação são bons indicativos para visualizar mudanças na estrutura genética intra e interpopulacional (AGUILAR et al., 2008)

Espécies raras naturalmente, ou seja, com pequenas populações locais e pequena distribuição geográfica tendem a ter uma diversidade genética menor do que espécies comuns (KARRON, 1987). Neste sentido, a fragmentação pode atuar mais negativamente em espécies comuns (que possuem maior diversidade genética) do que em espécies raras, que já possuem a característica intrínseca de baixa variabilidade (AGUILAR et al., 2008).

O estudo realizado com *Acer saccharum* mostrou que populações fragmentadas mantinham a mesma variação genética apresentada em populações naturais e

contínuas. Este fato pode ser explicado pelo tempo de fragmentação. Se o processo de fragmentação é recente, os efeitos da deriva genética e da endogamia ainda não alteraram a variabilidade genética e nem diferenciaram as populações através de mutações isoladas (YOUNG et al., 1993).

O tamanho populacional e intensidade de fragmentação são outros fatores que também afetam a estrutura genética de uma espécie. Mesmo em ambientes fragmentados, se o tamanho populacional é grande, ele pode manter o fluxo gênico e amenizar os efeitos da deriva genética. Porém se o grau de fragmentação é alto, a manutenção do fluxo gênico se torna mais difícil, mesmo em grandes populações (LEONARDI et al., 2012).

Além dos fatos apresentados acima que caracterizam os efeitos negativos da fragmentação em contraposição a possibilidade de manutenção da variabilidade genética frente a fragmentação, um estudo realizado por Francisco et al. (2007) mostra um outro elemento: mesmo dentro de um contínuo florestal, as populações podem apresentar estruturação genética. O distanciamento genético das populações pode ser melhor explicado por características comportamentais e distância do que por efeitos diretos da fragmentação. Esta característica comportamental também foi representada no estudo de Spear et. al (2005) onde uma forte estruturação populacional pode ser percebida em menos de 1km de distância dos sítios de amostragens. Este processo pode ser explicado pela baixa locomoção e pela utilização de sítios específicos para acasalamento em anfíbios.

É importante ressaltar que características do habitat e fatores demográficos exercem influências significativas sobre a diversidade genética nas populações naturais e em períodos evolutivos curtos. Estas características estão muitas vezes sobre controle de gestores ambientais públicos e biólogos da conservação. Assim, do ponto de vista da manutenção da diversidade genética das populações locais, um enfoque prático na manutenção de padrões de abundância e distribuição dos indivíduos na paisagem e redução da frequência de perturbação humana para as populações locais podem ser tão importantes quanto simplesmente manter grandes quantidades de habitat distribuídos dentro de paisagens. Se torna claro que tanto a preservação do habitat quanto a gestão de populações locais são necessárias para conservar a variação genética em populações selvagens (GIBBS, 2001).

## **2. Objetivo geral**

A revisão apresentada acima coloca a realidade ambiental da Mata Atlântica, uma realidade de extrema fragmentação, que gera preocupações quanto aos efeitos da redução e isolamento de habitats naturais frente aos processos ecológicos e evolutivos das espécies que estão inseridas neste bioma. Uma das formas de se conhecer os efeitos da fragmentação é oriundo de técnicas de genética de populações que podem dar bons parâmetros de como está a qualidade genética de diversas espécies.

Sendo assim buscamos verificar se a fragmentação florestal afeta negativamente a variabilidade genética e a estruturação populacional de *Chiroxiphia caudata*

### **2.1 Objetivos específicos**

Estimar a variabilidade genética de *Chiroxiphia caudata* em 5 áreas de Mata Atlântica através da utilização de marcadores moleculares microsatélites;

Medir a variação genética intra e interpopulacional dos grupos amostrados;

Indicar a distribuição espacial da variabilidade alélica;

Verificar se somente a distância é o fator principal na estruturação genética de *C. caudata*.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1 Áreas de estudo**

Para a realização deste estudo foram escolhidas 5 áreas de amostragem. Todas incluídas dentro dos domínios da Mata Atlântica. A escolha das áreas foi feita de forma a representar ambientes mais fragmentados (3 localidades), localizados próximos a grandes centros urbanos e duas localidades menos alteradas inseridas no contínuo florestal da Mata Atlântica na Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba. As áreas escolhidas foram:

-Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB) – São Miguel Arcanjo – SP (24°04'S, 47°57'W)

-Reserva do Morro Grande (RMG) – Cotia – SP (23°43'S, 46°57'W)

-Fragmentos de Caucaia do Alto (FCA) – Cotia – SP (23°43'S, 47°01'W)

-Estação Ecológica da Boracéia (EEB) – Salesópolis – SP (23°37'S, 45°52'W)

-Parque Estadual da Serra da Cantareira (PESC) – São Paulo/Mairiporã – SP (23°24'S, 46°35'W)

As áreas do PECB e EEB situam-se dentro do contínuo florestal de Mata Atlântica da Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba. As áreas da RMG, PESC e FCA situam-se em regiões mais fragmentadas e próximas a grandes centros urbanos.

Desta forma conseguimos estabelecer um padrão genético de áreas fragmentadas e áreas controle inseridas no contínuo florestal. A localização destas áreas está indicada na figura 2.

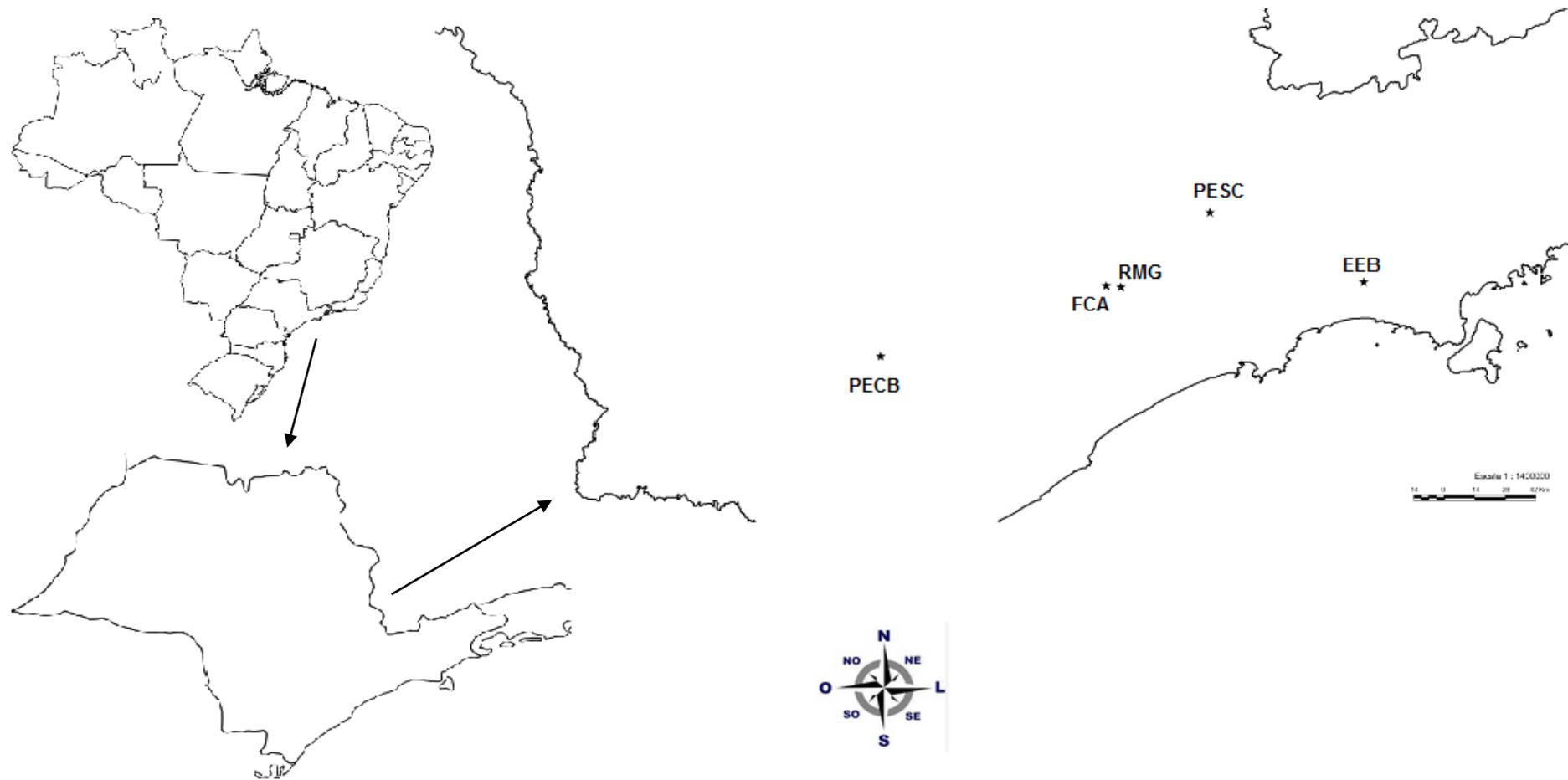


Figura 2. A imagem acima indica as 5 áreas amostradas. Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB); Fragmentos de Caucaia do Alto (FCA); Reserva de Morro Grande (RMG); Parque Estadual da Serra Cantareira (PESC); Estação Biológica Boracéia (EEB).

### 3.2 Obtenção das amostras

Amostras dos indivíduos do Parque Estadual da Serra da Cantareira e da Estação Ecológica da Boracéia foram gentilmente cedidas pelo Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), através da intermediação do Prof. Dr. Luis Fábio da Silveira (curador das coleções ornitológicas). Tais amostras foram cedidas na forma de tecido muscular.

Amostras dos indivíduos da Reserva do Morro Grande e fragmentos de Caucaia do Alto foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA), através da intermediação da Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki (coordenadora do laboratório). Tais amostras foram cedidas na forma de sangue e DNA já extraído.

Indivíduos do Parque Estadual de Carlos Botelho foram coletados durante a execução do projeto de doutorado do Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco. As amostras estavam estocadas no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LBMC), sob coordenação do Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior e da Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas. Tais amostras foram cedidas na forma de sangue.

### 3.3 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de sangue e tecido muscular foram realizadas a partir da execução do protocolo padrão de extração, Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico adaptado de Sambrook et al. (1989). A descrição do processo de extração está detalhada no Apêndice 1.

### 3.4 Amplificação dos *loci* de microssatélites

As reações biológicas para amplificação dos *loci* de microssatélites são uma adaptação da reação de amplificação padrão descrita por Francisco et al. (2004) e Schuelke (2000).

Os nove *primers* utilizados são específicos para *Chiroxiphia caudata* e estão descritos no artigo de Francisco et al. (2004). São eles: CHIR 1-6, CHIR 1-18, CHIR 3-22, CHIR 3-27, CHIR 4-21, CHIR 4-33, CHIRS 4-34, CHIR 3-15 E CHIR 2-9.

O artigo de Schuelke (2000) propõe que seja adicionada um fragmento a uma das sequências dos *primers* específicos. Este fragmento é chamado de “cauda” M13 e será importante pois permite que na reação de amplificação o primer universal M13 marcado com fluoróforo seja complementar a cauda anexada aos diferentes *primers* específicos para a espécie em estudo. A “cauda” M13 tem a seguinte sequência: TGT AAA ACG ACG GCC AGT.

A sequência deste fragmento deve ser alocada na porção 5' do *primer*. Nos *primers* CHIR1-16, CHIR3-15, CHIR4-33 e CHIR4-34 ela foi colocada nas sequências *Forward*, e nos *primers* CHIR1-18, CHIR2-9, CHIR3-22, CHIR3-27 e CHIR4-21 na sequência *Reverse*. A escolha dos melhores locais para o acoplamento da “cauda” M13 foi feita a partir da visualização da formação de *hairpin* e as mudanças nas temperaturas de anelamento com a união dos *primers* originais e a “cauda” M13.

A figura 3 abaixo representa o processo de reação em cadeia dos *primers* originais somados com a “cauda” M13

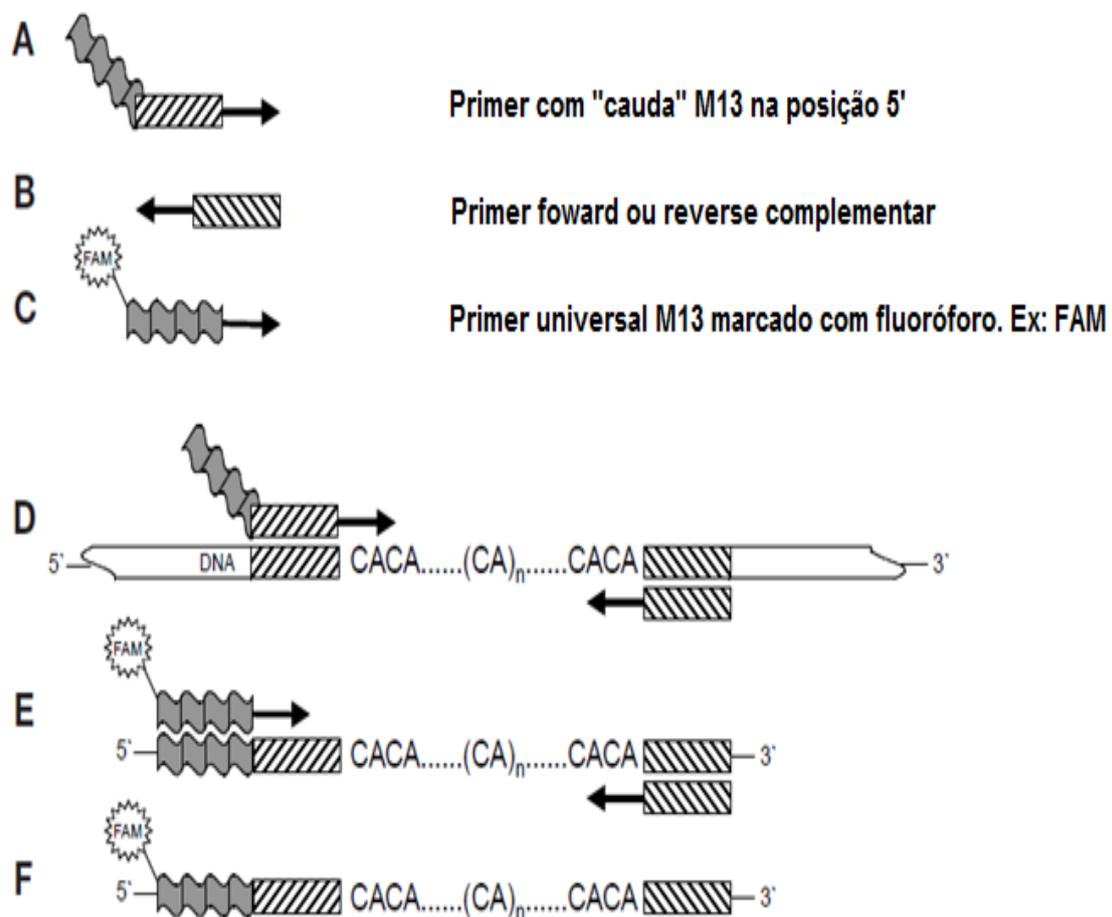


Figura 3. As letras A,B e C representam os *primers* utilizados na reação de amplificação. (A) *Primer* específico com a “cauda” M13 acoplada. (B) *Primer* específico *forward* ou *reverse* complementar. (C) *Primer* universal M13 marcado com fluoróforo. Nesta imagem utilizamos o fluoróforo FAM como exemplo. As letras D, E e F indicam a reação de amplificação do fragmento desejado. Este fragmento ao final do processo de amplificação estará marcado com o fluoróforo utilizado e poderá ser visualizado em um sistema de detecção a *laser*.

Na tabela 1 abaixo estão as principais informações a respeito dos *primers*.

Tabela1: Sequências dos *loci* específicos para *C. caudata*. Na primeira coluna temos os 9 *loci* utilizados. Na segunda coluna temos as sequências *Forward* e *Reverse*, já adicionadas com a cauda M13. A última coluna representa as temperaturas de anelamento específicas para cada *locus* em graus Celsius.

Locus	Sequência 5' - 3'	Ta
CHIR1-16	TGTA AACGACGGCCAGTAGAGCCACCTAGTTAACTGC	50
	TTAGATCACCTGGTGTATGTTC	
CHIR1-18	TTACCTAGAAGCAGAGGTAG	45
	TGTA AACGACGGCCAGTACTCTGATGAAATGGTATGC	
CHIR2-9	CACTCTTACTACTCAACATATTC	51
	TGTA AACGACGGCCAGTACTGCTAAGAGAGAATACCAG	
CHIR3-15	TGTA AACGACGGCCAGTAGTAAGATAGTAGTGGGAATCG	49,3
	TACTGCTACATGCTACAGACC	
CHIR3-22	TGAAGTCCAGAGACAACAG	52,4
	TGTA AACGACGGCCAGTGA ACTAATGCAACTTCTGAG	
CHIR3-27	TGCATGAATGGTGAAAGATGTC	51
	TGTA AACGACGGCCAGTGCAGAATCACCCATAAGAGACTG	
CHIR4-21	TCATCTGAACAGTAGAGCTTTCTC	49,3
	TGTA AACGACGGCCAGTCTTATCAACATTCTTCTCCCATAG	
CHIR4-33	TGTA AACGACGGCCAGTAAAGCTGTGAACACGTA ACTGC	49,3
	AATCTCCACTTTGTGGGACAG	
CHIR4-34	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCATCACACACTCCCTTGAG	49,3
	TGTTCTTTCTTCCAGCTTCTGAC	

As concentrações, os reagentes e o ciclo de reação estão indicados detalhadamente no apêndice 2.

Após as reações de PCR, os produtos finais foram observados em gel de agarose 1% para a confirmação da amplificação da banda de interesse.

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita na empresa MACROGEN pelo serviço de genotipagem, através dos sequenciador 3730XL (AB,USA). Para a determinação dos tamanhos dos alelos utilizamos o programa Geneious versão 3.4.6

### **3.5 Diversidade genética**

Para todos os *loci* foi verificada a presença de alelos nulos, erros tipográficos e a taxa de erros de genotipagem pelo programa MICROCHECKER (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

O conteúdo de informação polimórfica (Polymorphism Information Content - PIC), indica que valores maiores que 0,5 fazem com que os *loci* sejam considerados altamente informativos; entre 0,25 e 0,5 sejam considerados razoavelmente informativos; abaixo de 0,25 sejam considerados pouco informativos. O cálculo do PIC foi feito através do programa CERVUS 3.0.6 descrito pela primeira vez por Marshal et al. (1998).

Análises de gargalo populacional recente foram realizadas no programa BOTTLENECK (PIRY et al. 1999).

A verificação do desequilíbrio de ligação foi feita pelo programa GENEPOP 4.2.2 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Com este cálculo é possível estimar se os genótipos de um *locus* são independentes dos genótipos de outro *locus* em termos de freqüência de ocorrência.

Para o cálculo dos valores do número de alelos ( $N_a$ ), Número efetivo de alelos ( $N_e$ ), heterozigidade esperada ( $H_e$ ) e heterozigidade observada ( $H_o$ ) utilizamos o programa GeneAlex (PEAKALL e SMOUSE, 2006).

A variação no tamanho dos fragmentos amplificados foi verificada a partir da determinação dos tamanhos mínimos e máximos de cada alelo para cada *locus*, com o objetivo de reduzir custos de genotipagem.

O teste de verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado para cada *locus* por população e global, com hipótese alternativa de déficit de heterozigotos. O programa utilizado para tais cálculos descrito por Raymond e Rousset (1995) é denominado GENEPOP. Para os testes foram utilizados 10.000 desmemorizações, 10.000 lotes e 100.000 interações por lote.

Valores de riqueza alélica ( $R_a$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e suas respectivas significâncias quanto ao déficit ( $p_L$ ) e excesso ( $p_S$ ) de heterozigotos foram calculados

pelo programa FSTAT (GOUDET, 1995). As significâncias tem seus valores corrigidos a partir de parâmetros do próprio programa.

Usamos a correção sequencial de Bonferroni para corrigir comparações múltiplas ao avaliar a significância estatística (RICE 1989).

### **3.6 Estruturação populacional**

O cálculo dos valores de  $F_{st}$  e as respectivas significâncias foi realizado no programa FSTAT (GOUDET, 1995) não assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) foi estimada no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005).

Para a análise de correspondência fatorial (ACF) de diferenciação entre as populações amostradas utilizamos o programa GENETIX (BELKHIR et al. 2001).

Testamos a existência de isolamento por distância, correlacionando valores de  $F_{ST}$  e distância geográfica, através do teste de Mantel implementado no programa FSTAT (GOUDET, 1995).

Utilizamos o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al. 2000) para o agrupamento dos indivíduos em prováveis populações, com a determinação do número mais provável de populações ( $k$ ). Para esta análise, foram adotados os modelos *admixture* e de alelos correlacionados. Foram realizadas 6 corridas independentes de 500.000 gerações de MCMC e 100.000 gerações de *burn-in*. Os valores de  $k$  variaram de 1 a 5. O valor mais apropriado para  $K$  foi estimado de acordo com o método descrito por Evano et al. (2005) e implementado no programa STRUCTURE HARVESTER (EARL e VONHOLDT, 2012)

Para o cálculo da diferenciação genética de Jost (Dest) (JOST, 2008), utilizamos o programa SMOGD (CRAWFORD, 2010). Este parâmetro de diferenciação varia de 0 a 1. Quanto mais próximo a zero menos diferenciadas são as populações, quanto mais próxima a 1 mais diferenciadas são as populações.

## **4. Resultados**

### **4.1 Diversidade genética**

Todos os *loci* envolvidos nas análises, ao calcular o conteúdo de informação polimórfica, apresentaram valores superiores a 0,5. Ou seja, todos são altamente informativos. Encontramos um total de 163 alelos dentro dos 9 *loci* analisados. Houve uma variação de 12 a 30 alelos por *locus*, com uma média de 18,1 alelos por *locus*. O comprimento dos alelos também foi analisado. A partir do conhecimento da variação no tamanho dos

alelos, pode-se reduzir custos de genotipagem agrupando em um mesmo tubo de amostragem uma mesma fluorescência em *locus* com tamanhos distintos. A tabela 2 abaixo ilustra a variação de todos estes elementos.

Tabela 2. Para cada *locus* utilizado nas análises (primeira coluna) estão indicados na segunda coluna os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC), na terceira coluna a quantidade de alelos e na quarta coluna a variação no comprimento.

Locus	PIC	Número de Alelos	Variação no tamanho dos alelos (pares de base)
CHIR4-21	0,791	12	190-218
CHIR3-15	0,911	19	150-194
CHIR2-9	0,902	23	126-186
CHIR3-27	0,795	15	232-268
CHIR4-33	0,9	16	134-174
CHIR4-34	0,858	13	218-244
CHIR1-18	0,924	22	156-204
CHIR1-16	0,946	30	142-222
CHIR3-22	0,766	13	176-206

Ao verificarmos o desequilíbrio de ligação, pudemos observar que não existem valores significativos. Indicando que não há desequilíbrio de ligação entre os *loci* analisados.

Não foi observado gargalo populacional recente para nenhuma das populações.

Todas as populações analisadas apresentaram em termos globais para todos os *loci* valores de Fis positivos significativos e desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg quanto ao déficit de heterozigotos, significativamente diferentes de zero (após correção sequencial de Bonferroni), indicando a presença de muitos homozigotos na população. A análise de alelos nulos indicou que apenas o *locus* 3-27 contém alelos nulos em todas as populações, indicando que o déficit de heterozigotos poderia ser resultado da presença destes alelos. Este *locus* foi retirado para reanálise dos parâmetros de diversidade genética. E os resultados quanto ao déficit de heterozigotos nas populações se mantiveram iguais. Mantivemos assim, os valores originais com o *locus* 3-27.

As tabelas de 3 a 7 mostram as variáveis de diversidade genética para cada população.

Tabela 3. Localidade: PECB. Informações sobre diversidade genética. N: tamanho amostral; Na: número de alelos; Ra: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; Pd: desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni; Fis: coeficiente de endocruzamento; Pf: valores de p para o coeficiente de endogamia. (\*) valores significativos.

PECB	N	Na	Ne	Ho	He	Pd	Fis	Pf	Ra
CHIR4-21	19	6	2,473	0,421	0,596	0,074	0,318	0,031	4,537
CHIR3-15	19	13	9,627	0,842	0,896	0,159	0,087	0,207	7,348
CHIR2-9	20	13	7,143	0,75	0,86	0,061	0,153	0,066	9,988
CHIR3-27	20	10	6,061	0,65	0,835	0,0016 *	0,246	0,015	6,979
CHIR4-33	20	12	8,602	0,75	0,884	0,01	0,176	0,026	9,741
CHIR4-34	18	9	5,635	0,667	0,823	0,051	0,217	0,046	8,087
CHIR1-18	20	16	11,94	0,95	0,916	0,716	-0,011	0,643	10,616
CHIR1-16	20	18	11,77	0,85	0,915	0,195	0,097	0,11	11,346
CHIR3-22	20	13	6,957	0,8	0,856	0,314	0,091	0,208	8,192
Média		12,222	7,8	0,742	0,842	0,001 *	0,145	0,001*	8,537

Tabela 4. Localidade: PESC. Informações sobre diversidade genética. N: tamanho amostral; Na: número de alelos; Ra: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; Pd: desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni; Fis: coeficiente de endocruzamento; Pf: valores de p para o coeficiente de endogamia. (\*) valores significativos.

PESC	N	Na	Ne	Ho	He	Pd	Fis	Pf	Ra
CHIR4-21	10	7	5,405	1	0,815	1	-0,176	0,2	7
CHIR3-15	10	7	3,774	0,6	0,735	0,122	0,234	0,117	7
CHIR2-9	10	8	6,25	0,6	0,84	0,052	0,333	0,03	8
CHIR3-27	10	8	6,452	0,1	0,845	0 *	0,893	0,001 *	8
CHIR4-33	10	6	4	0,8	0,75	0,529	-0,014	0,666	6

CHIR4-34	10	6	4,651	0,1	0,785	0 *	0,885	0,001 *	6
CHIR1-18	10	12	8,333	0,9	0,88	0,185	0,03	0,596	12
CHIR1-16	10	12	9,091	0,8	0,89	0,04 *	0,153	0,116	12
CHIR3-22	10	6	3,846	0,7	0,74	0,292	0,106	0,395	6
Média		8	5,756	0,622	0,809	0 *	0,28	0,001 *	8

Tabela 5. Localidade: EEB. Informações sobre diversidade genética. N: tamanho amostral; Na: número de alelos; Ra: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; Pd: desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni; Fis: coeficiente de endocruzamento; Pf: valores de p para o coeficiente de endogamia. (\*) valores significativos.

EEB	N	Na	Ne	Ho	He	Pd	Fis	Pf	Ra
CHIR4-21	18	6	4,469	0,611	0,776	0,013	0,24	0,051	5,588
CHIR3-15	18	10	6,48	0,889	0,846	0,505	-0,023	0,72	8,848
CHIR2-9	18	15	8,757	0,778	0,886	0,226	0,15	0,064	11,241
CHIR3-27	18	12	6,894	0,667	0,855	0,069	0,247	0,012	9,125
CHIR4-33	18	11	8,416	0,944	0,881	0,626	-0,043	0,824	9,238
CHIR4-34	18	7	4,127	0,556	0,758	0,019	0,293	0,017	5,651
CHIR1-18	18	15	7,535	0,722	0,867	0,198	0,195	0,022	10,854
CHIR1-16	18	15	11,172	0,722	0,91	0 *	0,234	0,005	11,585
CHIR3-22	17	6	3,247	0,529	0,692	0,073	0,263	0,081	5,007
Média		10,778	6,789	0,713	0,83	0,001 *	0,169	0,001*	8,57

Tabela 6. Localidade: RMG. Informações sobre diversidade genética. N: tamanho amostral; Na: número de alelos; Ra: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; Pd: desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni; Fis: coeficiente de endocruzamento; Pf: valores de p para o coeficiente de endogamia. (\*) valores significativos.

RMG	N	Na	Ne	Ho	He	Pd	Fis	Pf	Ra
CHIR4-21	15	10	5,114	0,733	0,804	0,302	0,123	0,22	8,399

CHIR3-15	15	14	10,465	0,867	0,904	0,129	0,076	0,274	11,592
CHIR2-9	15	12	6,429	0,733	0,844	0,116	0,165	0,096	9,458
CHIR3-27	15	6	3,913	0,2	0,744	0 *	0,747	0,001 *	5,459
CHIR4-33	15	9	5,921	0,8	0,831	0,403	0,072	0,367	7,986
CHIR4-34	15	9	7,143	0,267	0,86	0 *	0,708	0,001 *	8,311
CHIR1-18	15	10	7,258	0,867	0,862	0,053	0,029	0,494	8,798
CHIR1-16	15	16	12,162	0,733	0,918	0,004 *	0,234	0,003	12,985
CHIR3-22	14	7	4,84	0,714	0,793	0,118	0,136	0,221	6,353
Média		10,333	7,027	0,657	0,84	0 *	0,251	0,001*	8,816

Tabela 7. Localidade: FCA. Informações sobre diversidade genética. N: tamanho amostral; Na: número de alelos; Ra: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; He: heterozigidade esperada; Ho: heterozigidade observada; Pd: desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni; Fis: coeficiente de endocruzamento; Pf: valores de p para o coeficiente de endogamia. (\*) valores significativos.

FCA	N	Na	Ne	Ho	He	Pd	Fis	Pf	Ra
CHIR4-21	15	6	4,327	0,733	0,769	0,329	0,081	0,36	5,627
CHIR3-15	15	11	8,333	0,8	0,88	0,076	0,125	0,142	9,777
CHIR2-9	14	11	7,84	0,786	0,872	0,05	0,136	0,121	9,616
CHIR3-27	15	5	2,459	0,267	0,593	0 *	0,574	0,001 *	4,762
CHIR4-33	15	14	10,714	0,933	0,907	0,468	0,005	0,64	11,644
CHIR4-34	14	8	5,091	0,429	0,804	0,005 *	0,495	0,003	7,051
CHIR1-18	15	16	11,538	0,867	0,913	0,275	0,085	0,1989	12,777
CHIR1-16	15	16	12,162	0,733	0,918	0,002 *	0,234	0,004	12,985
CHIR3-22	14	6	2,841	0,571	0,648	0,32	0,154	0,266	5,337
Média		10,333	7,256	0,68	0,812	0 *	0,196	0,001*	8,84

Em todas as populações foram encontrados alelos privados. São 15 alelos privados para a população do PECB, 4 para a população do PESC, 12 para a população da EEB,

7 para a RMG e 6 para FCA. Estes dados revelam que todas as áreas possuem características genéticas específicas e únicas para cada população.

A tabela 8 abaixo indica as variáveis de diversidade genética para todos os *loci* em cada população: número de alelos, número efetivo de alelos e riqueza alélica

Tabela 8. Os valores para cada população estão indicados abaixo. (Na) representa o número de alelos, (Ne) número efetivo de alelos médio e (Ra) riqueza alélica média.

Populações	Na	Ne	Ra
PECB	110	7,8	8,537
PESC	72	5,756	8
EEB	97	6,789	8,57
RMG	93	7,027	8,816
FCA	93	7,256	8,84

#### 4.2 Estruturação populacional

Os valores de  $F_{st}$  par a par foram significativos para a maioria dos pares de populações. Não foram encontrados valores significativos de diferenciação apenas entre as áreas de RMG e FCA. Na tabela 9 estão indicados os valores de  $F_{ST}$  e suas respectivas significâncias. Ao realizarmos os cálculos de diferenciação sem a presença do *locus* 3-27 (presença de alelos nulos), os resultados se mantiveram semelhantes, tanto em questão numérica quanto aos pares que possuem diferenciação significativa.

Tabela 9. A comparação par-a-par entre as populações e seus valores de  $F_{ST}$  estão indicados nesta tabela. (\*) representa valores significativos de diferenciação.

	PECB	PESC	EEB	RMG	FCA
PECB	0	0,02 *	0,02 *	0,045 *	0,041 *
PESC		0	0,028 *	0,029 *	0,04 *
EEB			0	0,029 *	0,037 *
RMG				0	0,017
FCA					0

O teste de isolamento por distância, quando comparados  $F_{ST}$  e distância geográfica, indicou que não há uma correlação positiva entre as variáveis e que a variação proporcionada pela distância na diferenciação das populações ( $F_{ST}$ ) é de somente 1,34% ( $r^2$ : 0,0134). Ou seja não notamos um isolamento por distância nestas populações.

A análise de variância molecular indicou que 96,2% da variação está contida dentro das populações e somente 3,8% entre as populações.

A análise de correspondência fatorial (ACF) indicou o agrupamento em distintos grupos populacionais. Porém graficamente estes grupos mostraram diversos indivíduos pertencentes a determinadas populações que foram plotados próximos a agrupamentos de outras populações, indicando a presença de pontos de convergência. Principalmente entre as populações do PECB (azul), EEB (amarelo) e PESC (vermelho) e entre as populações da RMG (verde) e FCA (cinza), como indicado na figura 4.

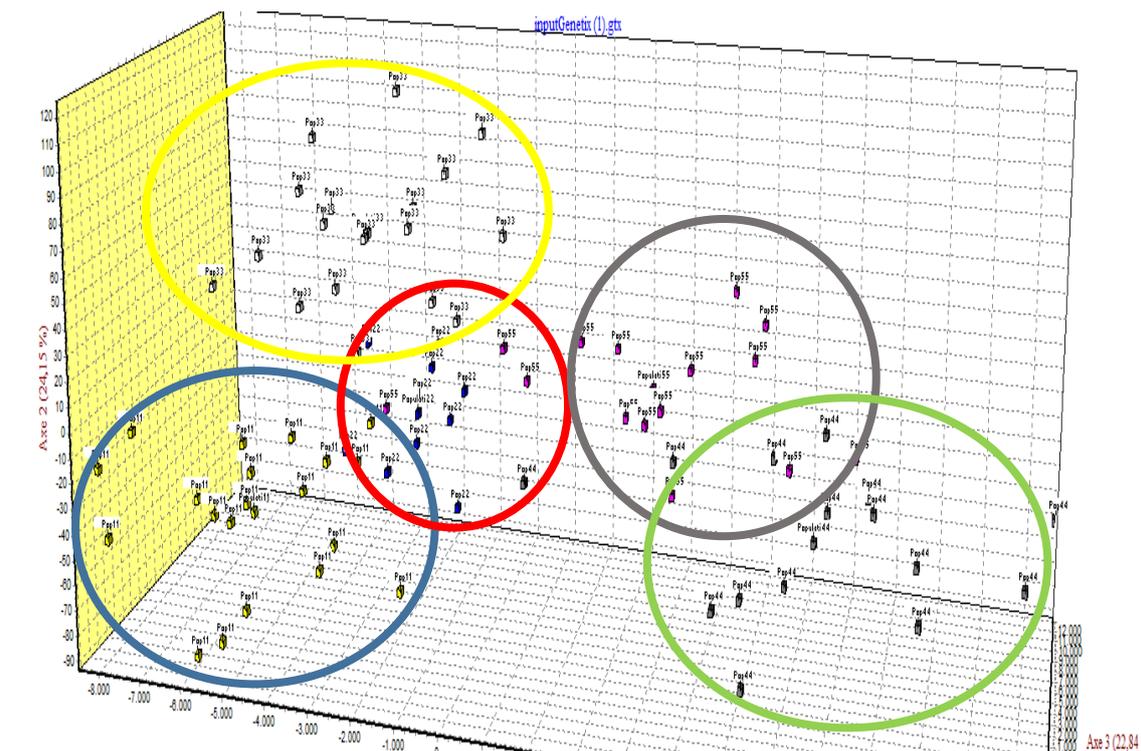


Figura 4. Gráfico gerado a partir da análise de correspondência fatorial.

A tabela 10 abaixo mostra os resultados de  $D_{est}$  nas comparações feitas par a par. Os valores variam de aproximadamente 0,067 a 0,212. Novamente podemos notar que as comparações entre PECB, EEB e PESC (0,067-0,092) mostram valores menores de diferenciação entre si do que quando comparamos estas áreas com RMG e FCA (0,145-0,212). Comparando apenas as áreas RMG e FCA o valor de diferenciação é de 0,107.

Tabela 10. Estimativa de diferenciação genética de Jost (Dest) para todos os pares de populações amostradas

Populações	PECB	PESC	EEB	RMG	FCA
PECB	0	0,092	0,076	0,194	0,114
PESC		0	0,067	0,182	0,212
EEB			0	0,145	0,157
RMG				0	0,107
FCA					0

A estimativa do número de populações, pelo método de Evano et al. (2005) indica a presença de quatro conjuntos gênicos,  $k=4$  (as cores no gráfico representam os conjuntos gênicos em que um indivíduo pode ser agrupado; cada barra representa qual a probabilidade de um indivíduo pertencer a um determinado conjunto gênico). Novamente as áreas de RMG e FCA apresentam características únicas. As outras áreas não mostraram características específicas. Isso mostra uma separação entre RMG e FCA com populações do PECB, PESC e EEB, mas nenhuma estruturação real de população dentro de qualquer população. A figura 5 abaixo ilustra esta situação.

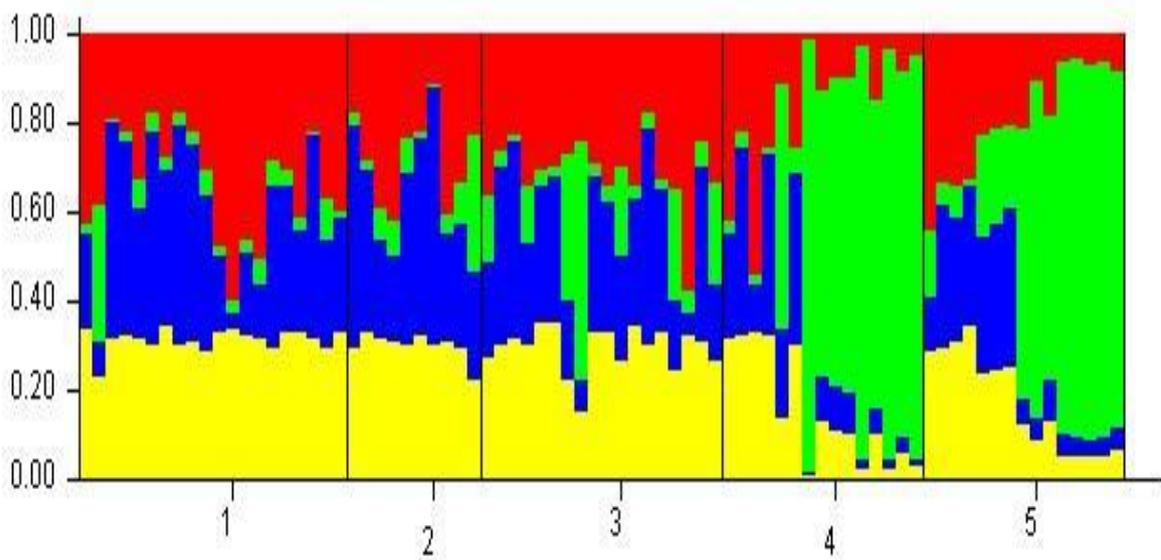


Figura 5. Gráfico gerado a partir da análise bayesiana de agrupamento populacional. O número 1 indica PECB; 2 PESC; 3 EEB; 4 RMG e 5 FCA.

## 5. Discussão

Nossos resultados indicam uma média de alelos por *locus* de 18,1, um valor superior ao encontrado por Francisco et al. (2007) trabalhando com populações de *C. caudata* em áreas inseridas somente dentro um contínuo florestal. Este fato pode indicar que um processo de fragmentação recente ao subdividir as populações faz com que ocorra um aumento no número de alelos da espécie. A longo prazo estas populações isoladas e fragmentadas podem se extinguir e reduzir a variabilidade genética da espécie (FRANKHAM et al. 2002). É possível visualizar que o Estado de São Paulo a partir de 1962 teve sua cobertura florestal original diminuída 29,26% para 13,43% na década dos anos 90 (NALON et al. 2008), ou seja as populações vem sendo cada vez mais subdivididas aumentando seu risco de extinção.

O fato de não confirmarmos a presença de um gargalo populacional recente faz com que a compreensão dos aspectos genéticos abaixo discutidos, não tenha como central a baixa diversidade ou taxas de endogamia relacionados a processos históricos de redução populacional.

Nossas análises indicaram que há desvios no EHW, ou seja existem valores significativos para déficit de heterozigotos, fato também verificado para a maioria das populações no trabalho de Francisco et al. (2007). Pelo fato de áreas contínuas e fragmentadas apresentarem coeficientes de endogamia positivos, esta característica pode ser atribuída a baixa dispersão da espécie, que apresenta pequena área de vida e baixa dispersão, principalmente para machos (Hansbauer et al. 2008a), fazendo com que a fragmentação não seja responsabilizada pelas taxas de endogamia da espécie. A ausência de heterozigotos foi observada no PECB e EEB, áreas controle dentro do maior contínuo de Mata Atlântica, assim como nas outras áreas mais fragmentadas.

Este exemplo nos mostra que nem sempre podemos relacionar a fragmentação com efeitos genéticos negativos nas populações. Se tivéssemos como base apenas este estudo em áreas fragmentadas poderíamos inferir erroneamente que a endogamia apresentada nas populações está associada com os efeitos da fragmentação e redução do fluxo gênico. Por isso é necessária uma real compreensão das características das espécies associadas com as condições ambientais para determinação dos fatores que geram determinada característica genética. Outra espécie estudada por Höglund e Shorey (2003), *Manacus manacus*, também apresentou esta característica. Mesmo em ambiente com ausência de fragmentação, as populações apresentam certo grau de endogamia devido a sua dispersão limitada.

A presença de muitos alelos privados nas populações fragmentadas é um fato que demonstra a importância destas áreas na conservação da espécie, uma vez que sustentam grande parte desta diversidade alélica. A perda destes alelos seria prejudicial para *C. caudata*, aumentando seu risco de extinção e diminuindo seu potencial evolutivo.

Quando comparamos o número de alelos, o número efetivo de alelos e a riqueza alélica podemos notar uma ligeira redução quantitativa destas variáveis em áreas fragmentadas. Porém ao analisarmos em um contexto geral notamos que estas áreas ainda sustentam valores qualitativamente altos destes índices de diversidade alélica, indicando novamente que a fragmentação da Mata Atlântica não é responsável pela redução da variabilidade genética. Estudo realizado por Barnet et al. (2008) com a espécie *Corapipo altera*, também demonstrou que áreas mais fragmentadas (menor tamanho e mais distantes de grandes contínuos florestais) podem suportar altos valores de riqueza alélica e alelos privados. Neste mesmo estudo em uma pequena escala, além da manutenção da diversidade genética também foi constatado que estas populações de diferentes fragmentos se comportam como uma única população, ou seja, a fragmentação não impede a conectividade e a dispersão dos indivíduos entre os fragmentos.

Por ser uma espécie menos especialista, se utilizar de diversos tipos de hábitat e se locomover entre as manchas florestais (HANSBAUER et al. 2008a; UEZU et al. 2005), a fragmentação para *C. caudata* não exerceu pressões evolutivas de redução da variabilidade genética, o que pode ser mais acentuado em espécies mais especialistas que não se utilizam de habitats mais degradados e nem se locomovem entre fragmentos.

Os dados de diversidade genética nos mostram três questões importantes. A primeira é que a fragmentação pode estar atuando de maneira a subdividir grandes populações e aumentar a diversidade alélica a curto prazo (mostrando que apesar do aumento da diversidade, este crescimento no número de alelos pode estar intrinsecamente associado a fragmentação). Uma segunda questão diz respeito aos índices de endogamia. Foram encontrados valores significativos de endogamia em todas as populações. Este fato geralmente é associado a fragmentação, porém nossa área controle (Carlos Botelho) e os resultados obtidos ao estudar somente populações inseridas em ambientes contínuos não direcionam para a fragmentação a responsabilidade pelas taxas de endogamia. Esta realidade é direcionada ao comportamento dos tangarás. A terceira questão é que áreas inseridas em um contínuo

possuem basicamente as mesmas características de diversidade genética das outras áreas, ou seja não há uma redução na diversidade genética em áreas fragmentadas. Este fato dá indícios de que a fragmentação pode não reduzir o fluxo gênico entre fragmentos próximos ou manter o número populacional alto de maneira a minimizar efeitos da deriva. A ressalva desta última questão diz respeito a escala temporal. Aumentando-se o período de acompanhamento das populações poderemos ter conclusões precisas sobre a influência da fragmentação na redução da variabilidade genética de *C. caudata*.

Ao tratarmos da estruturação populacional, mesmo áreas contínuas apresentam estruturação populacional para *C. caudata*, quando se utiliza FST como medida de diferenciação, sendo esta diferenciação diretamente proporcional à distância geográfica. Populações distantes até 110km não apresentam diferenciação, e populações mais distantes (415km) são as mais diferenciadas (Francisco et al., 2007). Já esperávamos portanto encontrar a estruturação populacional em áreas fragmentadas. O que teremos para discutir serão aspectos relacionados a áreas próximas inseridas em um contexto de fragmentação e a presença de outros fatores além da distância que expliquem a diferenciação populacional.

Analisando apenas as populações das áreas de RMG e FCA que estão situadas próximas, em uma pequena escala, não há diferenciação populacional significativa indicada pelos valores de FST. Porém o valor de FST para estas duas áreas é muito próximo ao valor significativo encontrado em outras comparações entre populações. Além disso, tanto a análise de correspondência fatorial, quanto o Dest, indicaram que estas populações já possuem evidências de início de diferenciação populacional, que pode estar associada principalmente com um menor tamanho populacional na área mais fragmentada (FCA) aumentando os efeitos da deriva nesta população. A partir da premissa que a estruturação populacional é determinada principalmente pelo balanço de deriva genética e fluxo gênico (TEMPLETON, 2006) podemos inferir que a deriva neste caso é a força evolutiva que vem aumentando a diferenciação entre as áreas devido a uma redução no tamanho populacional, visto que os indivíduos situados nestas áreas se locomovem entre os fragmentos, não sendo observadas barreiras ao fluxo de indivíduos, como já citado acima, possibilitando o fluxo gênico.

Ao tratarmos da totalidade de áreas amostradas pudemos notar novamente que existe diferenciação populacional entre a maioria das áreas, evidenciado pelos valores significativos de FST. O índice de diferenciação de Jost também mostrou que possivelmente há uma diferenciação entre as áreas. Mais evidenciada entre as áreas

de RMG e FCA com as demais áreas PECB, PESC e EEB. Este índice não se mostrou tão conclusivo sobre a diferenciação das áreas PECB, PESC e EEB. Indicou que tais áreas se diferem das áreas da região metropolitana (RMG e FCA), mas apresentam os mais baixos valores de diferenciação entre si. Assim como evidenciado pelo gráfico de análise bayesiana, estas áreas (RMG e FCA) na região metropolitana de São Paulo parecem ter características genéticas particulares, necessitando de uma maior atenção ao se pensar no manejo da espécie. A análise de correspondência fatorial que indicou diferenciação das populações com sobreposição de alguns agrupamentos, principalmente para RMG e FCA.

Com estes dados podemos entender que a paisagem onde estas populações estão envolvidas exerce uma pressão evolutiva direta. O fato das populações estarem estruturadas não é a novidade. O que se percebe é que a paisagem ao entorno das áreas pode atuar de maneira a aumentar essa diferenciação. É o caso das áreas RMG e FCA que mesmo estando mais próximas já possuem certa diferenciação entre si e apresentam as maiores diferenciações genéticas com as demais. Este fato é intrigante e o que podemos associar a este fato é que a paisagem fragmentada ao entorno destas áreas favorece a diferenciação genética de maneira mais contundente do que em um contínuo florestal.

A porcentagem de variação molecular (AMOVA) mostrou uma taxa altíssima dentro das populações o que pode ser explicado pelo alto número de alelos.

A não confirmação de isolamento por distância em habitats fragmentados nos coloca outros fatores responsáveis pela estruturação encontrada. O que poderia explicar uma maior diferenciação entre as áreas do PECB e RMG (112km) quando comparamos com uma menor diferenciação entre PECB e EEB (222km)? Possivelmente além dos fatores comportamentais já listados acima, a fragmentação pode estar atuando de maneira a reduzir o fluxo gênico e aumentar a diferenciação genética de populações mais fragmentadas. Quando comparamos esta distância e a diferenciação entre PECBxRMG (112km; FST: 0,045) com a distância sem diferenciação significativa em um contínuo (110km), podemos notar que existe um novo fator influenciando a diferenciação. Assim como áreas muito mais próximas (PESCxFCA – 57km; FST: 0,04/ PESCxEEB – 77km; FST: 0,028) apresentam valores de FST muito mais elevados do que o esperado em um contínuo florestal. Podemos inferir que este novo fator é a fragmentação.

Os dados referentes a estruturação populacional nos mostram duas importantes questões. A primeira diz respeito as áreas de RMG e FCA. Estas áreas se mostram diferenciadas das demais (fato evidenciado por todas as análises), sendo então

portadoras de características genéticas únicas, porém com indícios de que a fragmentação possa estar iniciando um processo de diferenciação entre estas duas áreas. A segunda questão é que somente a distância não pode explicar a diferenciação de *C. caudata* em áreas fragmentadas. Se por um lado esta espécie que se movimenta entre os fragmentos próximos (Hansbauer et al., 2008b) e é capaz de manter a diversidade genética, por outro lado apresenta graus de diferenciação genética não correlacionados com a distância geográfica em ambientes fragmentados, mesmo em uma menor escala, sendo afetada negativamente pelo processo de fragmentação.

Todos os resultados obtidos devem levar em consideração alguns pontos. Um deles é o tempo de fragmentação relacionado ao tempo de resposta genética frente a este cenário. Mesmo não havendo indícios de redução de variabilidade genética em áreas fragmentadas, o tempo de resposta dos efeitos genéticos pode não ter sido perceptível nesta escala temporal, ou seja, a fragmentação pode em uma escala de tempo maior, exercer pressões negativas sobre a diversidade genética. A escala de estudo é outra questão a ser melhor compreendida ao se avaliar os efeitos da fragmentação sobre as populações naturais. Pequenas escalas de estudo indicam que populações de tangarás podem não ser afetadas pela fragmentação como indicado por alguns trabalhos (Barnet et al. 2008; Uezu et al. 2005), porém quando aumentamos a escala os efeitos da fragmentação, principalmente os relacionados a estruturação populacional, se tornam mais evidentes.

### **Implicações para a conservação**

A conservação da biodiversidade não é uma tarefa fácil. Estudos científicos são muito importantes pois trazem para a realidade ecológica como os ecossistemas vem sendo ameaçados e propõe o que devemos priorizar. Atualmente o modelo de tomada de decisão política não se baseia em análises científicas da conservação. Uma possibilidade é compreender como toda a complexidade biológica se enquadra dentro de processos políticos, sociais e econômicos, visando a integração de todas estas vertentes (EIZIRIK, 1996).

Levando em consideração que as áreas da região metropolitana de São Paulo – SP são os locais onde as taxas de desmatamento são as mais altas para a Mata Atlântica (Teixeira *et al.*, 2009) temos que assumir um cuidado especial com as populações da RMG e FCA. Estas populações apesar do contexto de fragmentação, se mostraram mais próximas geneticamente e diferenciadas das demais. Tais áreas com características genéticas únicas e inseridas dentro do maior centro de devastação devem ser preservadas. A perda de indivíduos destas populações, vítimas da redução

e degradação de hábitat, pode levar à perda de características genéticas que não serão mais encontradas em outras populações e levarão a uma redução da variabilidade genética da espécie em geral.

Apesar deste cuidado especial com estas áreas pela sua realidade ambiental e suas características genéticas, em todas as localidades foram encontrados alelos privados, e qualquer redução de hábitat e aumento na fragmentação podem levar a redução da variabilidade genética e diminuição da adaptação dos indivíduos frente as pressões ambientais. O risco de extinção aumenta desta forma.

Ao levarmos em consideração espécies que possuem características e comportamentos semelhantes a *C. caudata*, devemos entender que as características genéticas são muito importantes nos planos de conservação e que por isso se deve analisar a escala geográfica adequada ao propor planos de conservação que integrem toda a diversidade genética presente nas espécies. Especificamente para este estudo todas as áreas são importantes.

Apesar de estudos de paisagem listados acima afirmarem que *C. caudata* é uma espécie que não é tão afetada pela fragmentação e que não possui preferências de hábitat tão especializadas, notamos neste estudo justamente o contrário. Mesmo não havendo uma redução na variabilidade genética das populações, notamos um aumento na diferenciação genética e influências desta diferenciação relacionadas com a fragmentação. Mesmo com características ecológicas menos especialistas, ao nível de genes a espécie não se mostra tão insensível as mudanças ambientais.

Ao pensar planos de conservação não podemos deixar de lado o comportamento ecológico das espécies. No caso de *C. caudata*, seu comportamento ecológico reflete uma estruturação populacional intrínseca a espécie. Não é papel dos planos de conservação, por princípio, minimizar as diferenças entre as populações. Nosso estudo não visa diminuir a diferença genética entre as populações, mas sim entender que a fragmentação altera o processo de diferenciação e por isso deve ser melhor compreendida, assim como manter toda a distinta variabilidade contida na espécie nas diferentes áreas de estudo.

Análises genéticas populacionais foram realizadas apenas em áreas no estado de São Paulo, ou seja, uma pequena abrangência da distribuição geográfica de *C. caudata*. Os dados nos mostram que esta espécie possui diferentes populações mesmo em uma pequena escala geográfica e com graus de diferenciação diferentes de acordo com o grau de fragmentação. Desta forma, o conhecimento genético populacional de toda a abrangência da espécie deve ser levantado para verificação das principais unidades de

manejo, com características genéticas particulares e importantes para o potencial evolutivo.

O que não podemos deixar de pensar é que as extinções são para sempre. A busca pelo conhecimento biológico das espécies deve ser incessante. Se não conhecermos como determinada espécie se reproduz, se alimenta, o que utiliza de recursos, como reage a fragmentação, suas características genéticas, etc. não saberemos propor planos para sua conservação que sejam de fato conservacionistas.

Devemos entender as espécies de estudo como modelos para uma melhor compreensão de como se colocar em prática a conservação. A Mata Atlântica não será conservada apenas com a conservação de *C. caudata*. Porém estudos conservacionistas nos dão informações importantes sobre como se comportam os modelos de estudo frente a situação ambiental. Sendo assim um plano de conservação eficaz também deve levar em conta o ambiente onde a espécie está inserida. Devemos compreender sua realidade ambiental, sua dinâmica e suas principais ameaças, avançando na sua conservação e conseqüentemente na conservação das espécies que ali vivem.

## **6. Conclusões**

Ao tratarmos de influências da fragmentação na diversidade e estruturação genética podemos afirmar que estas duas variáveis estão relacionadas com o processo de fragmentação.

Em um âmbito geral a fragmentação pode estar aumentando a quantidade de alelos ao subdividir as populações (fato associado a curto espaços evolutivos e viabilidade genética das populações subdivididas). Porém, ao analisar fatores como endogamia, riqueza alélica e número efetivo de alelos, podemos notar que a fragmentação não exerce influências negativas sobre estas variáveis. Áreas fragmentadas possuem valores de diversidade alélica próximos da área controle. Em uma escala de tempo maior estes efeitos podem vir a ser mais visíveis, evidenciando a pressão negativa da fragmentação sobre a diversidade genética.

A distribuição geográfica da diversidade mostra que todas as áreas são importantes para a manutenção do potencial adaptativo da espécie, uma vez que abrigam características genéticas únicas.

Mesmo áreas muito próximas como RMG e FCA podem estar sofrendo com os efeitos da fragmentação e já possuem indícios de diferenciação.

Somente a distância não explica a diferenciação populacional. Áreas mais próximas podem apresentar valores de diferenciação genética maiores do que áreas mais distantes. O que provavelmente está associado a este fato é a fragmentação pela diminuição do fluxo gênico ou redução do número populacional.

Este estudo retrata a realidade de uma espécie, com características ecológicas e evolutivas únicas. O modelo *C. caudata* nos dá importantes informações sobre uma ave menos especialista. Podemos concluir que espécies mais especializadas quanto a utilização de habitat podem sofrer maiores consequências do processo de fragmentação. O conhecimento das características genéticas é fundamental no planejamento da conservação das espécies e da Mata Atlântica.

## Referências

- AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5177–5188, 2008.
- ALLENDORF, F.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Malden, USA: Wiley-Blackwell, 2007.
- ANAND, M. et al. Biodiversity conservation in human-modified landscapes in the Western Ghats: remnant forests matter. **Biol Conserv**, v. 143, p. 2363–2374, 2010.
- ANCIÃES, M. et al. Diversidade de píprídeos (Aves: Pipridae) amazônicos: seleção sexual, ecologia e evolução. **Oecol. Bras**, v. 13, p. 165-182, 2009.
- BACHTROG, D. et al. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs - Evidence from *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1277-1285, 2000.
- BARNET, J.R. Weak genetic structuring indicates ongoing gene flow across White-ruffed Manakin (*Corapipo altera*) populations in a highly fragmented Costa Rica landscape. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 1403-1412, 2008.
- BARRETT, S.C.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (eds) **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford: Oxford University Press, 1991.
- BECH, N. et al. Genetic connectivity of the grey partridge in central northern France in a highly man dominated landscape. **Conservation Genetics**, v. 15, p. 1001-1011, 2014.
- BELKHIR, K. et al. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la géne'tique des populations. **Laboratoire Ge'nome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Universite ´ de Montpellier II, Montpellier, France**. Disponible em <<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>>, 2001.
- BRODT, M.S.C.; DELLA-FLORA, F.; CÁCERES, N. Non-linear ascension in a reproductive hierarchy of the Blue Manakin (*Chiroxiphia caudata* ). **Acta Ethol**. doi:10.1007/s10211-013-0174-0, 2013.

- BURKEY, T.V.; REED, D.H. The effects of habitat fragmentation on extinction risk: Mechanisms and synthesis. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 28(1), p. 9-37, 2006.
- CALLEN, D.F. et al. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 922–927, 1993.
- CINCOTTA, R.P. et al. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, v. 404, p. 990–992, 2000.
- CRAWFORD, N.G. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 556-557, 2010.
- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504–509, 2004.
- DIXO, M. et al. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1560–1569, 2009.
- DRINAN, D.P. et al. Genetic variation in westslope cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii lewisi*: implications for conservation. **Conservation Genetics**, v. 12, p. 1513–1523, 2011.
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4 (2), p. 359-361, 2012.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 23-29, 1996.
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611:2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1. An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- EZARD, T.H.G.; TRAVIS, J.M.J. The impact of habitat loss and fragmentation on genetic drift and fixation time. **Oikos**, v. 114, p. 367–375, 2006.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 34, p. 487–515, 2003.

FEDERMAN, S. et al. Habitat fragmentation and the genetic structure of the Amazonian palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) on the island of Trinidad. *Conservation Genetics*, v. 15, p. 355–362, 2014.

FOSTER, M.S. Cooperative behavior and social organization of the Swallow- Tailed manakin (*Chiroxiphia caudata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 9, p. 166-177, 1981.

FRANCISCO, M.R.; GALETTI, P.M.; GIBBS, L. Isolation and characterization of microsatellite loci in the blue manakin, *Chiroxiphia caudata* (Aves, Pipridae). *Molecular ecology*, v. 4, p. 758–760, 2004.

FRANCISCO, M.R.; GIBBS, L.; GALETTI, P.M. Patterns of Individual Relatedness at Blue Manakin (*Chiroxiphia Caudata*) Leks. *The Auk*, v. 126(1), p. 47-53, 2009.

FRANCISCO, M.R. et al. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 4908–4918, 2007.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, v. 126, p. 131–140, 2005.

FRANKHAM, R. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics*, v. 11, p. 661–663, 2010.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, v. 143, p. 1919–1927, 2010a.

GAGNEUX, P.; BOESCH, C.; WOODRUFF, D.S. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, v. 6, p. 861–868, 1997.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. Washington: CABS and Island Press, 2003.

GALETTI, M.; PIZO, M.A. Fruit eating by birds in a forest fragmented in southeastern Brasil. **Ararajuba**, v. 4, p 71-79, 1996.

GIBBS, J.P. Demography versus habitat fragmentation as determinants of genetic variation in wild populations. **Biol Conserv**, v. 100, p. 15–20, 2001.

GILL, F.; DONSKER, D. (2014). **IOC World Bird Names (v 4.2)**. Disponível em <<http://www.worldbirdnames.org>>. Acesso em: jun. 2014.

GOERCK, J.M. Patterns of rarity in the birds of the Atlantic Forest of Brazil. **Conservation Biology**, v. 11, p. 112–118, 1997.

GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and applications**. Oxford: University Press, 1999.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program for calculating F-statistic. **J Hered.**, v. 86, p. 485–486, 1995.

GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 591–611, 2011.

HAAG T. et al. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). **Molecular ecology**, doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04856.x, 2010.

HANSBAUER, M.M. et al. Comparative range use by three Atlantic Forest understorey bird species in relation to forest fragmentation. **Journal of Tropical Ecology**, v. 24, p. 291-299, 2008a.

HANSBAUER, M.M. et al. Movements of neotropical understory passerines affected by anthropogenic forest edges in the Brazilian Atlantic rainforest. **Biological Conservation**, v. 141, p. 782-791, 2008b.

HANSBAUER, M.M. et al. Landscape perception by forest understory birds in the Atlantic Rainforest: black-and-white versus shades of grey. **Landscape Ecology**, v. 25, p. 407-417, 2010.

HARR, B. et al. Conservation of Locus-Specific Microsatellite Variability Across Species: a Comparison of Two Drosophila Sibling Species, *D. melanogaster* and *D. simulans*. **Mol. Biol. Evol**, v. 15(2), p. 176–184, 1998.

HENLE, K. et al. Species survival in fragmented landscapes: where are we now? **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 1–8, 2004.

HÖGLUND, J.; ALATALO, R.V. **Leks**. Princeton: Princeton University Press, 1995.

HÖGLUND, J.; SHOREY, L. Local genetic structure in a whitebearded manakin population. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2457–2463, 2003.

IUCN. **List of Threatened Species (2013) BirdLife International 2012. *Chiroxiphia caudata***. In: IUCN 2013. IUCN Red. Version 2013.2. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>> Acesso em: fev. 2014.

JOHANSSON, M.; PRIMMER, C.R.; MERILA, J. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2693–2700, 2007.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4015-4026, 2008.

KARRON, J.D. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. **Evolutionary Ecology**, v. 1, p. 47–58, 1987.

KELKAR, Y.D. et al. What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, p. 620–635, 2010.

KRUGLYAK, S. et al. 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**, v. 17, p. 1210-1219, 2000.

LAURANCE, W.F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1137, 2009.

LEONARDI, S. et al. Effect of Habitat Fragmentation on the Genetic Diversity and Structure of Peripheral Populations of Beech in Central Italy. **Journal of Heredity**, v. 103(3), p. 408–417, 2012.

LOPES, A.V. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1154–1165, 2009.

LOPES, L.E.; FERNANDES, A.M.; MARINI, M.A. Diet of some Atlantic Forest birds. *Ararajuba*, v. 13, p. 95-103, 2005.

LOWE, A.J. et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. ***Heredity***, v. 95(4), p. 255–273, 2005.

MANTOVANI, W. A degradação dos biomas brasileiros. In: RIBEIRO, W.C. (ed) **Patrimônio ambiental brasileiro**. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2003. p. 367-439.

MARSHALL, T.C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. ***Molecular Ecology***, v. 7, p. 639-655, 1998.

MAUDE, C. et al. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]. ***Molecular Ecology***, v. 11, p. 421–436, 2002.

MCKAY, B.D. et al. A molecular phylogenetic hypothesis for the manakins (Aves: Pipridae). ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v. 55, p. 733-737, 2010.

MCDONALD, D.B. Demographic consequences of sexual selection in the long-tailed manakin. ***Behavioral Ecology***, v. 4, p. 297-309, 1993.

MCDONALD, D.B. Microsatellite DNA evidence for gene flow in Neotropical lek-mating Long-tailed manakin. ***The Condor***, v. 105, p. 580-586, 2003.

MCNEELY, J.A. et al. **Conserving the World's Biological Diversity**. Washington: IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, 1990.

METZGER, J.P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. ***Biological Conservation***, v. 142, p. 1138–1140, 2009.

MITTERMEIER, R.A. et al. **Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and most Endangered Terrestrial Ecoregions**. Washington: Washington Univ. of Chicago Press, 2005.

MYERS, N. Threatened biotas: hotspots in tropical forests. ***Environmentalist*** v. 8, p. 178–208, 1988.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v.403, p. 853-845, 2000

NALON, M.A., MATTOS, I.F.A., FRANCO, G.A.D.C. **Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2008.

NAROSKY, T.; YZURIETA, D. (2006) **Aves de Argentina y Uruguay: guía para la identificación: edición de oro**. Buenos Aires: Vasquez Mazzini, 2006.

OHLSON, J.I.; FJELDSÅ, J.; ERICSON, P.G.P. Molecular phylogeny of the manakins (Aves: Passeriformes: Pipridae), with a new classification and the description of a new genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, p. 796-804, 2013.

OUBORG, N.J.; VERGEER, P.; MIX, C. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology**, v. 94, p. 1233–1248, 2006.

PAETKAU, D.; STROBECK, C. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. **Mol Ecol**, v. 4, p. 519–520, 1995.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. Biodiversity conservation in tropical agroecosystems—a new conservation paradigm. **Ann NY Acad Sci**, v. 1134, p. 173–200, 2008.

PIRY, S.; LUIKART, G.; COURNET, J.M. (1999) Bottleneck: A compute program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **The journal of heredity**, doi: 10.1093/jhered/90.4.502, 1999.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PRUM, R.O. Phylogenetic tests of alternative intersexual selection mechanisms: macroevolution of male traits in a polygynous clade (Aves: Pipridae). **American Naturalist**, v. 149, p. 668-692, 1997.

PRUM, R.O. Sexual selection and the evolution of mechanical sound production in manakins (Aves: Pipridae). **Animal Behaviour**, v. 55, p. 977-994, 1998.

RALLS, K.; BALLOU, J. Effect of inbreeding on juvenile mortality in some small mammal species. **Laboratory Animals**, v. 16, p. 159-166, 1982.

RALLS, K.; BALLOU, J. Extinction: lessons from zoos. In: Schonewald-Cox, C.M.; Chambers, S.M.; MacBryde, B.; Thomas, L. (Eds.) **Genetics and Conservation: a Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1983.

RALLS, K.; BALLOU, J.; TEMPLETON, A. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. **Conservation Biology**, v. 2, p. 185–193, 1988.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REMSEN, J.V. et al. (2013) **A Classification of the Bird Species of South America. American Ornithologists' Union**. Disponível em <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>. Acesso em: jun. 2014.

RIBEIRO, M.C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141–1153, 2009

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989  
REED, D.H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, v. 17, p. 230–237, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615–629, 2006.

SHINDE, D. et al. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. **Nucleic Acid Research**, v. 31, p. 974–980, 2003.

SHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

SILVA, J.M.C.; CASTELETI, C.H.M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds) **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. Washington: CABS and Island Press, 2003. p. 43–59.

SILVA, W.G.S. et al. Relief influence on the spatial distribution of the Atlantic Forest cover at the Ibiúna Plateau, SP. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67 p. 403–411, 2007.

SNOW, D.W. (2004) Family Pipridae (Manakins). In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; CHRISTIE, D. (eds.) **Handbook of the Birds of the World. Cotingas to Pipits and Wagtails**. Barcelona:Lynx Edicions, 2004.

SPEAR, A.F. et al. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2553–2564, 2005.

TABERLET, P.; WAITS, L.P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends Ecol. Evol.**, v. 14, p. 323–327, 1999.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucl Acids Res**, v. 17(16), p. 6463-6471, 1989.

TEIXEIRA, A.M.G. et al. Modeling landscape dynamics in an Atlantic rain forest region: implications for conservation. **Forest Ecology and Management**, v.257, p. 1219–1230, 2009.

TEMPLETON, A.R. **Population genetics and microevolutionary theory**. Hoboken (NJ):John Wiley & Sons, 2006

TEMPLETON, A.R. 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**, v. 98, p. 5426-5432, 2001

TRAYLOR, M.A.; FITZPATRICK, J.W. A survey of tyrant flycatchers. **The living birds**, v. 19, p. 7-50, 1982.

UEZU, A.; METZGER, J.P.; VIELLIARD, J.M.E. Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of the seven Atlantic forest birds species. **Biological Conservation**, v. 123, p. 507-519, 2005.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535–538, 2004.

WILCOVE, D.S.; MCLELLAN, C.H.; DOBSON, A.P. Habitat fragmentation in the temperate zone. In: Soulé, M.E. (ed) **Conservation Biology**, Sunderland, MA: Sinauer, 1986.

YOU-CHUN, L. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol Ecol**, v. 11(12), p. 2453-2465, 2002.

YOUNG, A.G.; MERRIAM, H.G.; WARWICK, S.I. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. **Heredity**, v. 71, p. 277—289, 1993.

## Apêndices

Apêndice 1. Protocolos de extração de DNA genômico total. Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (Sambrook et al., 1989 – adaptado)

1. Colocar em microtubos (1,5ml) as amostras (0,05g) e adicionar 550  $\mu$ L de tampão de lise (50mM de Tris HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl).
2. Adicionar 40  $\mu$ L de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e 15  $\mu$ L de proteinase K (20mg/mL).
3. Agitar em Vortex as amostras e em seguida incubar em termo bloco a 55°C overnight (ou por 2hs na mesma temperatura).
4. Retirar o tubo do Termo bloco e adicionar 550  $\mu$ L de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (ou somente 275  $\mu$ L de fenol e 275  $\mu$ L de clorofórmio).
5. Fechar muito bem os tubos e misturar as fases por inversão de tubos por 10 minutos.
6. Centrifugar por 30 minutos a 14000 rpm (enquanto isso nomear novos tubos de 2 mL)
7. Transferir o sobrenadante para outro tubo (muito cuidado para não encostar a ponteira na fase abaixo ao sobrenadante).
8. Repetir os passos 4 a 7.
9. O mesmo volume dado de sobrenadante adicionar de Clorofórmio.
- 10 Misturar novamente por inversão de tubos por 10 minutos.
11. Centrifugar por 10 minutos a 14000rpm (enquanto isso nomear novos tubos).
12. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
13. Adicionar 10% de Acetato de Sódio 3M (pH 7,0) e 2,5x do volume do sobrenadante de etanol absoluto gelado.
14. Misturar as fases por inversão de tubos cuidadosamente por 10 minutos.
15. Incubar as amostras em freezer a -20°C por 2 horas ou overnight.
16. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 14000 rpm.

17. Reverter cuidadosamente para retirar o etanol.
18. Adicionar 600  $\mu$ L de etanol 70%, agitar cuidadosamente o tubo e centrifugar por mais 10 minutos a 14000 rpm, depois reverter o tubo para descartar o etanol.
19. Adicionar 600  $\mu$ L de etanol 70% (ou 100%), agitar cuidadosamente o tubo e centrifugar por mais 10 minutos a 14000 rpm, depois reverter o tubo para descartar o etanol.
20. Secar o DNA em temperatura ambiente ou em estufa a 37°C.
21. Com o DNA sem resíduo algum de etanol adicionar TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA) ou água MilliQ de acordo com o tamanho do pellet.
22. Adicionar 30  $\mu$ L de água MilliQ
23. Deixar o DNA em termo bloco a 37°C por 40 minutos e depois conservar a -20°C até a utilização.

Apêndice 2. Reação de Amplificação (PCR). Adaptado Francisco et al. (2004) e Schuelke (2000)

Para um volume final de reação de 10  $\mu\text{L}$  adicionamos os seguintes reagentes:

1. 5  $\mu\text{L}$  de GoTaq (Promega)
2. 0,3  $\mu\text{L}$  de BSA (0,48 mg/ $\mu\text{l}$ )
3. 2,2  $\mu\text{L}$  de Água MilliQ
4. 0,5  $\mu\text{L}$  *primer Forward/Reverse* com cauda M13 (0,2  $\mu\text{M}$ )
5. 0,5  $\mu\text{L}$  *primer Reverse/Forward* sem cauda M13 (0,8  $\mu\text{M}$ )
6. 0,5  $\mu\text{L}$  *primer universal* M13 (0,8  $\mu\text{M}$ )
7. 1,0  $\mu\text{L}$  de DNA (50ng/  $\mu\text{L}$ )

O ciclo da reação foi descrito da seguinte maneira:

Ciclo inicial de 5 minutos a 94° C. Seguido por uma fase de 35 ciclos de 30s a 94° C, 30s a uma temperatura específica para cada *primer* e 30s a 72° C. A terceira fase é caracterizada pela amplificação dos fragmentos com a cauda M13. São 8 ciclos de 30s a 94° C, 45s a 53° C e 45s a 72° C. A última fase (extensão final) se dá através de um ciclo de 10min a 72° C.