

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LETIANE NASCIMENTO DA PONTE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *PITANGUS
SULPHURATUS* (TYRANNIDAE, PASSERIFORMES)**

**São Gabriel
2014**

LETIANE NASCIMENTO DA PONTE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *PITANGUS
SULPHURATUS* (TYRANNIDAE, PASSERIFORMES)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas - Bacharelado da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial
para obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Ricardo José Gunski

Coorientador: Msc. Tiago Marafiga
Degrandi

**São Gabriel
2014**

LETIANE NASCIMENTO DA PONTE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *PITANGUS
SULPHURATUS* (TYRANNIDAE, PASSERIFORMES)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas – Bacharelado da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial
para obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 21 de março de 2014

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo José Gunski
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres
UNIPAMPA

Prof. Dr. Carlos Benhur Kasper
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã que com tanto carinho e amor jamais deixaram de acreditar na concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por jamais ter me abandonado durante esta caminhada e durante todos os momentos em que precisei.

À minha família, especialmente meus pais Lauri e Vera e minha irmã Maiara por acreditarem no meu sucesso e suportarem os momentos de saudade me apoiando para que seguisse em busca do meu sonho.

Ao meu namorado Sidnei pela força dada em todos os momentos, por ter me amparado diante das dificuldades e por estar sempre comigo me ajudando no que é preciso.

Aos Professores Dr. Ricardo José Gunski e Dr^a. Analía Del Valle Garnero por me acolherem tão bem ao grupo, por toda a ajuda e ensinamentos passados nestes três anos e pela contribuição que deram à minha formação.

À PROPESQ – Unipampa pela bolsa concedida durante o ano de 2013 que muito auxiliou para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Grupo de Pesquisa Diversidade Genética Animal, em especial Rafael e Tiago, pela ajuda em campo e em laboratório, e também pela grande amizade demonstrada nestes anos de convívio.

Ao meu tio Julio Kirst por ter despertado em mim ainda mais a fascinação pela Biologia e servir de inspiração e estímulo na busca pelo aprendizado desta ciência.

Aos amigos que de uma forma ou de outra estiveram presentes na minha vida durante estes quatro anos de curso, me incentivando a seguir em frente e a acreditar que tudo daria certo: Lucieli, Patrícia, Natália, Daian, muito obrigada.

“Ela teimou e enfrentou o mundo...”

Oswaldo Montenegro

RESUMO

O Bioma Pampa é uma ecorregião exclusiva da América do Sul e no Brasil ocupa somente o Rio Grande do Sul, representando 18% do seu território, devido à sua grande exploração para agricultura e pecuária vem sofrendo com atividades antrópicas resultando na fragmentação dos habitats. A Classe Aves é uma das mais diversificadas do planeta, aproximadamente 9.600 espécies e sem dúvida é o grupo que mais sofre com as modificações causadas pelo homem, apesar disso os estudos para mensurar este efeito na estrutura genética de populações são inexistentes ou escassos em algumas famílias desta classe. A família Tyrannidae é a maior da classe Aves, é constituída por aproximadamente 210 espécies, sendo o bem-te-vi, *Pitangus sulphuratus* a mais popular delas, conhecido pelo seu canto característico e sua abundância. Em vista disso este trabalho tem como objetivo analisar e comparar índices de diversidade genética de duas populações de *P. sulphuratus*, uma da cidade de Dom Pedrito e outra de São Gabriel, ambas localizadas no Pampa gaúcho. Para tal, foram amostrados 24 exemplares pertencentes à espécie *P. sulphuratus*, divididos em duas populações de acordo com o ponto de coleta: São Gabriel – SG (n=10) e Dom Pedrito - DP (n=14). De cada exemplar foi realizada a extração de DNA e as análises de diversidade genética e distâncias genéticas, realizadas com dados obtidos de cinco loci microssatélites. Foram observados um total de 75 alelos para os cinco loci. O número de alelos por locus variou de 13 para o locus Sap104 a 17 para Sap96 e NF1112 e a média de alelos por locus foi de 15. Os loci microssatélites avaliados, apresentaram número de alelos observados (N_a) superiores aos números esperados (N_e), tal resultado indica que *P. sulphuratus* exibe alta variabilidade genética, e que estes loci constituem uma excelente ferramenta para estudos populacionais. As análises de distância genética indicaram clara sobreposição entre as amostras das duas supostas populações. Este fato indica que devem tratar-se de uma única e grande população nestas localidades do bioma Pampa e que apesar da fragmentação dos habitats, não há barreiras ao fluxo gênico nesta espécie.

Palavras-Chave: aves, *P. sulphuratus*, microssatélites, bioma pampa, diversidade genética

ABSTRACT

The Pampa Biome is a ecoregion unique of South America and Brazil occupies only Rio Grande do Sul, representing 18 % of its territory, due to its large farm for agriculture and livestock has been suffering with anthropogenic activities resulting in habitat fragmentation. The Aves Class is one of the most diverse on the planet, approximately 9.600 species and no doubt is the group that suffers most from the changes caused by man, yet studies to measure this effect in the genetic structure of populations are scarce or nonexistent in some families of this class. The Tyrannidae family is the largest in the Aves class, consists of approximately 210 species, with the the most popular known of them "bem-te-vi, *Pitangus sulphuratus*, for his distinctive singing and their abundance. The aims of the study was to analyze and compare indices of genetic diversity in two populations of *P. sulphuratus* from Don Pedrito and São Gabriel city, both located in the gaúcho Pampa. For this purpose belonging to 24 specimens from San Gabriel- SG (n = 10) and Dom Pedrito (n= 14) the *P. sulphuratus* species, that were divided into two populations according to the sampled point. The each specimen was performed the DNA extraction and analysis of genetic diversity and genetic distances, made with data obtained from five microsatellite loci. Were observed all of 75 alleles in the five loci, the number of alleles per locus ranged from $N_a = 13$ for the locus Sap104 to 17 for the Sap96 and NF1112, with average of alleles per locus $N_a = 15$. The microsatellite loci evaluated, showed a number of alleles observed (N_a) greater than the expected number (N_e), this result indicates that *P. sulphuratus* displays high genetic variability, and that these loci are an excellent tool for population studies. The genetic distance analyses indicated a clear overlap between the samples of two alleged populations. This fact suggest that they should treat yourself to a single population in these localities from Pampa biome and that despite the fragmentation of habitats, there are no barriers to gene flow in this species .

Keywords: Aves, *P. sulphuratus*, microsatélites, pampa biome, genetic diversity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de um exemplar da espécie <i>Pitangus sulphuratus</i> (bem-te-vi)	16
Figura 2 – Mapa mostrando a menor distância entre as cidades de São Gabriel e Dom Pedrito, 77 Km (vermelho) e a distância percorrida pelo grupo de pesquisa até o local de realização das coletas, 188 Km (azul)	21
Figura 3 – Rede de neblina utilizada para a captura dos exemplares	22
Figura 4 – Gel de agarose fotografado em transiluminador, podendo-se observar o DNA marcador 100pb, algumas amostras amplificadas a partir do locus NF2930 e o controle negativo	24
Figura 5 – Gel de Poliacrilamida 10% corado, mostrando o DNA marcador 100pb e algumas amostras amplificadas a partir do locus NF2930	24
Figura 6 – Janela do <i>software</i> TotalLab onde a foto do gel de poliacrilamida está sendo utilizada para quantificação dos pares de bases	25
Figura 7 – Resultado da quantificação de uma banda demonstrando um pico no valor 179,928, que foi arredondado para 180pb em relação ao DNA marcador no intervalo de 100pb a 300pb	27
Figura 8 – Distância genética entre espécimes de <i>P. sulphuratus</i> de duas populações, baseada em dados de cinco locus microssatélites	31
Figura 9 – Gráfico do <i>software</i> Estructure mostrando a miscigenação das amostras de <i>Pitangus sulphuratus</i> de duas localidades SG-1 e DP-2	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Loci microssatélites utilizados para caracterização molecular de <i>P. sulphuratus</i> , sequências de nucleotídeos e temperaturas de anelamento na PCR.....	23
Tabela 2 – Variação dos pares de bases para cada locus segundo BEHELER et al. (2006) e CORRÊA et al. (2009) comparados com os observados neste trabalho ...	27
Tabela 3 – Média de índices de diversidade genética em <i>P. sulphuratus</i> baseada em cinco loci microssatélites para amostras de São Gabriel e Dom Pedrito	28
Tabela 4 – Índices de diversidade genética de cinco loci microssatélites em duas populações de <i>P. sulphuratus</i>	29
Tabela 5 – Lista de alelos privados para cada população (SG e DP) por para cinco loci microssatélite para cada população	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Classe Aves	14
2.2 Família Tyrannidae.....	14
2.2.1 <i>Pitangus sulphuratus</i>.....	15
2.3 Biologia Molecular e Microssatélites.....	17
2.4 Bioma Pampa.....	18
3 METODOLOGIA	21
3.1 Amostragem e Captura	21
3.2 Extrações de DNA	22
3.3 Seleção dos loci Microssatélites	22
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	23
3.5 Avaliação das Amplificações	23
3.6 Quantificação do Peso Molecular dos Loci Microssatélites.....	25
3.7 Análises Genéticas	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A Classe Aves é uma das mais diversificadas do planeta, contendo aproximadamente 10 mil espécies das mais diversas morfologias, comportamentos e habitats. Apesar dessa notável riqueza de espécies existem poucos estudos sobre as aves.

Essa falta de estudos a respeito das aves pode estar relacionada às dificuldades de amostragem, já que a captura de espécimes deste grupo é bastante complicada, ou ainda devido às restrições para conseguir licenças de captura. Dependendo do tipo de estudo a ser feito e do tipo de coleta a ser realizada, as espécies passíveis de captura são restritas, bem como o número de indivíduos de cada espécie permitida.

As aves são um grupo muito sensível às mudanças que estão ocorrendo no planeta. As diversas transformações que degradam os ambientes fazem com que as aves sejam um dos grupos mais atingidos tornando as populações fragmentadas e isolando-as em subpopulações. Tal fato resulta na perda do fluxo gênico e consequentemente na redução da diversidade genética.

A diversidade genética, que acontece quando as frequências alélicas entre subpopulações se tornam diferentes, é um fator crucial que aumenta o *fitness* (valor adaptativo) da população. Ela pode ser resultado de uma seleção em favor de diferentes genótipos ou de processos aleatórios na passagem dos alelos de uma geração para outra.

O isolamento de pequenas populações pode fazer com que haja uma grande taxa de endocruzamentos, ou seja, cruzamentos entre indivíduos aparentados, estes podem reduzir a heterozigosidade e aumentar a frequência de genótipos homozigotos, que é considerada nociva, pois reduz o valor adaptativo da espécie.

Em vista disso são importantes estudos que visem conhecer melhor os genótipos das populações de espécies, a fim de constatar a existência de fluxo gênico ou se está acontecendo alto índice de endogamia devido a isolamento de populações pequenas pela existência de barreiras a este fluxo.

Uma das ferramentas mais utilizadas para estudos de diversidade genética são os marcadores microssatélites, que são sequências repetidas em *tandem* na molécula de DNA que variam de dois a seis nucleotídeos repetidos. Estas sequências possuem elevados níveis de variação alélica e taxas de mutação

elevadas. Estes marcadores moleculares tem sido amplamente utilizados para caracterizar a variabilidade genética de e entre populações devido a seu alto conteúdo polimórfico. No entanto para as Aves ainda existem muito poucas descrições de locus microssatélites, fazendo-se necessárias novas pesquisas nesse âmbito.

A família Tyrannidae é uma das mais diversificadas dentro da Classe aves, as espécies pertencentes a ela ocupam uma enorme gama de ambientes dentro das Américas. São pertencentes à ordem Passeriformes e à subordem Tiranni e entre eles está a espécie em estudo, *Pitangus sulphuratus* (Linnaeus, 1766), conhecido popularmente como bem-te-vi. Esta é uma das espécies mais comuns dentro dos Tiranídeos, sendo encontrada nos mais diversos ambientes, sendo um deles o Bioma Pampa.

O bioma pampa ocorre exclusivamente na América do Sul, sendo que no Brasil está presente somente no estado do Rio Grande do Sul. Na região da fronteira oeste do RS o Bioma Pampa vem sofrendo constantes mudanças devido ao uso do solo na silvicultura e também na agropecuária, onde o sobrepastejo acaba prejudicando a conformação vegetal original da região. Isso provoca um desequilíbrio dos habitats naturais das espécies presentes nesta região, podendo causar então isolamento nas populações. Sabe-se que a riqueza de espécies no Pampa é enorme, porém os estudos nesse bioma ainda são raros.

Em vista disso este trabalho tem como objetivo analisar e comparar índices de diversidade genética de duas populações de *P. sulphuratus*, uma da cidade de Dom Pedrito e outra de São Gabriel, ambas localizadas no Pampa gaúcho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classe Aves

Atualmente são reconhecidas taxonomicamente no mundo cerca de 9600 espécies de aves (NIE et al., 2009). Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, o Brasil possui uma rica avifauna, contendo 1901 espécies, das quais mais de 10% são endêmicas no país, e de 661 espécies destas se encontram no Rio Grande do Sul (BENKE, 2010; BELTON, 2003). O Brasil é um país com uma imensa riqueza de espécies de aves, por ter habitats variados que são propiciados graças às grandes extensões de florestas e seu clima tropical e subtropical (WALDRIGUES, 1981).

A classe aves é uma das mais atingidas quando se trata de degradação ambiental. Os impactos gerados pelo homem podem levar à fragmentação de seus habitats, a qual pode isolar populações cada vez menores de aves, propiciando que espécies sejam perdidas (HARTL & CLARK, 2010).

Em pequenas populações há grande possibilidade de haver consanguinidade, o que reduz a heterozigosidade e provoca deriva genética, que pode resultar na perda de diversidade alélica (STORFER, 1999). É comprovado que cerca de 37% dos genótipos homozigotos são letais (HARTL & CLARK, 2010), portanto a sequencia de endocruzamentos numa população podendo causar grandes níveis de homozigose pode ser extremamente prejudicial à ela. Por isso estudos de população e caracterização genética são importantes para que se possa tomar conhecimento do estado de conservação que uma espécie apresenta, saber se existe fluxo gênico através de migração ou se a população encontra-se totalmente isolada, podendo-se assim tomar atitudes para impedir que esta seja perdida.

Atualmente existem muito poucos estudos relacionados à biologia molecular de aves e um fator que torna os estudos problemáticos e escassos é a dificuldade amostral, tanto no sentido da coleta em si, quanto das licenças para que estas sejam realizadas, que passam por análises rigorosas dos estudos e projetos para liberação das autorizações de captura e coleta dos espécimes.

2.2 Família Tyrannidae

A família Tyrannidae é a maior da classe Aves, é distribuída restritamente às Américas e seus membros são adaptados a diversos ambientes e nichos

continentais, apresentando grandes diferenças de morfologias e comportamentos. Nossa fauna é constituída por aproximadamente 210 espécies de tiranídeos (FITZPATRICK, 1980).

A família Tyrannidae pertence à ordem Passeriformes e à subordem Tyranni ou suboscines. Os suboscines são as aves cujo canto é herdado, e não aprendido como o dos oscines, que emitem sons aprendidos com os pais. Estes passeriformes possuem estrutura siringeal diferenciada e menos complexa do que a das aves que possuem canto mais elaborado como os das famílias Turdidae (sabiás) e Emberizidae (canários, tico-ticos), por exemplo (HACKETT et al., 2008).

Esta família é composta por 4 subfamílias, sendo elas Hirundineinae (somente a espécie *Hirundinea ferruginea* (Gmelin, 1788)), Elaeniinae (piolinhos, guaravacas, papa-moscas, alegrinhos, etc), Tyranninae (bem-te-vis, suriris, etc) e Fluvicolinae (maria-pretas, noivinhas, lavadeiras, etc).

2.2.1 *Pitangus sulphuratus*

A espécie *Pitangus sulphuratus* (Figura 1) é uma das mais comuns da família Tyrannidae sendo conhecida popularmente como bem-te-vi, devido ao seu canto característico, e são encontrados frequentemente em áreas abertas e úmidas. Porém, por ser amplamente distribuída, o que é característico das espécies pertencentes a esta família, eles também podem ser encontrados em bordas e clareiras de florestas, capoeiras, plantações, eucaliptais, cerrados, caatingas, pastos sujos, mangues, parques e ruas arborizadas (SOUZA, 2004; SIGRIST, 2013; BELTON, 2003).

Figura 1- Foto de um exemplar da espécie *Pitangus sulphuratus* (bem-te-vi).



Fonte: <http://www.infoescola.com/aves/bem-te-vi/>

Algumas de suas características morfológicas marcantes são: a presença de um bico longo e forte, o alto da cabeça preto com uma coroa amarela, os lados da cabeça pretos, uma grande sobrelanceira branca, a garganta branca, o lado dorsal marrom-oliváceo e o lado ventral do corpo com coloração amarela. É importante lembrar também que esta espécie não possui dimorfismo sexual (SOUZA, 2004; SIGRIST, 2013; GRANTSAU, 2010).

A espécie *P. sulphuratus* é considerada onívora, ou seja, tem uma dieta muito variada, podendo alimentar-se de insetos, pequenos invertebrados, ovos, uma ampla variedade de frutos, sementes, entre outras (BELTON, 2003). Quanto ao comportamento, os bem-te-vis são barulhentos, bastante agressivos e costumam predação ninhos de outras aves. Cantam durante o dia todo emitindo seu som mais característico, o “bem-te-vi”, que é emitido com intensidades diversas, ou ainda outros chamados que se parecem variações do mais clássico, como “bem-ti-uirr”, “ti-vi”, “uiip uurr”, etc. (SIGRIST, 2013; BELTON, 2003).

Do ponto de vista citogenético, *P. sulphuratus* foi descrito por Gunski et al. (2000), segundo o qual a espécie apresenta um complemento cromossômico de

$2n=78$. As aves apresentam um cariótipo composto por poucos pares de macrocromossomos e muitos pares de microcromossomos e também exibem a característica peculiar de possuir um par sexual masculino homogamético denominado ZZ e um par sexual feminino heterogamético denominado ZW. Para *P. sulphuratus*, o complemento cromossômico é formado por 9 pares de macrocromossomos e 30 pares de microcromossomos, sendo o cromossomo Z submetacêntrico e o W acrocêntrico pequeno. O 1º par do complemento foi descrito como submetacêntrico, o 9º como metacêntrico e os demais pares como acrocêntricos.

2.3 Biologia Molecular e Microssatélites

O uso de moléculas em biologia da conservação iniciou-se com a descoberta de uma grande quantidade de variações em proteínas, geralmente enzimas, que poderiam ser facilmente identificadas e discriminadas em análise de géis submetidos à eletroforese. Estas proteínas variáveis têm sido utilizadas em numerosos estudos com espécies da fauna e da flora (FARIA et al., 2006).

A preocupação com a conservação de espécies ameaçadas mostrou que os dados genéticos são peças importantes em programas de conservação da biodiversidade e na manutenção da diversidade genética (FARIA et al., 2006). Através de técnicas de biologia molecular é possível estimar a variação genética, o que permite a identificação de populações geneticamente empobrecidas.

Os microssatélites são sequências repetitivas de DNA formadas por 1 a 6 pares de nucleotídeos repetidos em *tandem* e são encontrados tanto em genomas eucariotos quanto procariotos. Estas sequências estão presentes em centenas de milhares a milhões de cópias repetidas e podem ser encontradas em qualquer lugar do genoma, seja em regiões codificantes como nas não-codificantes (PIERCE, 2011; TÓTH et al., 2000). São repetições curtas com elevados níveis de variação alélica e taxas de mutação elevadas. Essas taxas de mutação podem ser influenciadas por uma série de características, como repetição, comprimento e composição (PIERCE, 2011; RANDI et al., 2003).

Os microssatélites costumam ser detectados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através do uso de primers que flanqueiam as repetições de microssatélites, fazendo com que o fragmento de DNA que contém as sequências repetidas seja amplificado, o tamanho desse fragmento vai depender da

quantidade de bases repetidas em tandem. Depois de ser realizada a PCR, os fragmentos amplificados nela são separados utilizando a técnica de eletroforese em gel, que produz padrões de bandas que representam diferentes alelos e podem ser usados na quantificação da variabilidade genética, avaliação de relações genéticas entre grupos de organismos e quantificação de divergências genéticas de populações (PIERCE, 2011; RANDI et al., 2003).

Os marcadores microssatélites têm se mostrado ferramentas importantes para avaliar a diversidade genética de aves devido ao seu elevado nível de polimorfismo e herança mendeliana codominante (RANDI et al., 2003). Eles são uma excelente ferramenta em estudos de mapeamento genético, populacionais e de conservação e manejo de recursos naturais (MARTINS, 2007).

A principal característica que faz de um microssatélite uma importante ferramenta para estudos genéticos é o extenso grau de polimorfismo que reflete o número de repetições em *tandem* perfeitamente dispostas (ANMARKRUD et al., 2008). A grande maioria dos microssatélites apresenta uma elevada taxa de mutação variando entre 10^{-2} e 10^{-6} , sendo que o mecanismo de mutação que altera mais comumente os microssatélites é o deslizamento de replicação, um processo que pode gerar ganho de uma ou mais unidades de repetição (ANMARKRUD et al., 2008; LEVINSON & GUTMAN, 1986; ANDERSON et al., 2000).

Apesar de sua importância, a falta de marcadores suficientes e microssatélites polimórficos limitam pesquisas sobre diversidade genética para fins de conservação de muitas espécies. Assim, a seleção de microssatélites e marcadores polimórficos para algumas famílias de aves é além de importante, necessária para a análise do genoma, da organização, da evolução e do desenvolvimento destas.

2.4 Bioma Pampa

O Bioma Pampa é uma ecorregião exclusiva da América do Sul e no Brasil ocupa somente o Rio Grande do Sul, representando 62,6% do seu território. Ele foi reconhecido pelo Ministério do Meio Ambiente de fato como Bioma em 2004, quando sua degradação infelizmente já estava em níveis elevados. O Pampa abrange planícies de três países, dois terços do estado brasileiro Rio Grande do Sul, as províncias argentinas de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fé, Entre Rios e Corrientes e a República Oriental do Uruguai. Segundo o IBGE no RS este bioma compreende

os campos da metade sul e das Missões e cobre uma área de aproximadamente 176.496 km² (BELTON, 2003; IBGE, 2004; SUERTEGARAY & PIRES DA SILVA, 2004).

O clima no Bioma Pampa é temperado, as temperaturas médias variam entre 22°C e 24°C, o inverno apresenta fortes frentes frias e temperaturas abaixo de 0°C são comuns, os verões podem apresentar temperaturas máximas de 40°C. Quanto à pluviosidade, esta varia entre 1.250 milímetros na parte sul, a 1.500 milímetros na parte norte (SUERTEGARAY & PIRES DA SILVA, 2004; CORDEIRO & SOARES, 1977).

A região do Pampa, também conhecida como campanha, inclui uma porção do estado ao sul e oeste da Serra do Sudeste, e a oeste da Depressão Central. Possui altitudes variando entre 60 e 300m, sendo que níveis mais baixos predominam. A inclinação da região tem como direção o rio Uruguai, e possui na sua conformação geográfica uma série de morros ondulados. Nos vales de rios mais largos próximos ao rio Uruguai, no extremo oeste os terrenos são planos e banhados são encontrados perto do rio Uruguai e na parte superior do rio Ibicuí, principalmente na região próxima à cidade de Dom Pedrito. A cobertura de árvores é escassa, sendo que a maioria das áreas é coberta por campos naturais. A região tem seu uso voltado para agropecuária, criação de bovinos e ovinos, e também para a agricultura, sendo que as culturas mais importantes são o arroz, o trigo e a soja (BELTON, 2003).

Devido à sua grande exploração para pecuária de ovinos e bovinos, para a agricultura voltada principalmente ao cultivo de arroz, e para a silvicultura com destaque para o eucalipto e o pinus, o cenário do pampa vem sofrendo fortes transformações. Grandes áreas são convertidas em lavouras, pastagens ou florestas artificiais, prejudicando assim o habitat das populações onde isso ocorre. A pecuária constitui uma forma de uso do pampa que pode ser compatível com a maioria das aves, porém, somente se não houver o chamado sobrepastejo, o que infelizmente ocorre na maioria das vezes. Em se tratando do cultivo do *Pinus* e do eucalipto, grandes plantações dos mesmos podem criar desertos biológicos alterando as características do solo, o que pode impedir que futuramente a vegetação nativa retorne (OLMOS, 2005).

Todos esses impactos gerados pelo mau uso dos ambientes naturais, acabam fazendo com que ocorra a fragmentação dos habitats. As aves tem sido

muito prejudicadas por essa fragmentação, que pode limitar sua área de vida e trazer efeitos a longo prazo, já que espécies que possuem uma área de vida ampla poderão ter recursos limitados se esta for reduzida. Outro impacto da fragmentação de habitats é que ela pode acabar isolando populações cada vez menores, limitando assim o fluxo gênico entre elas e diminuindo a diversidade genética (OLMOS, 2005; DONATELLI, 2007; BIERREGAARD, 1992).

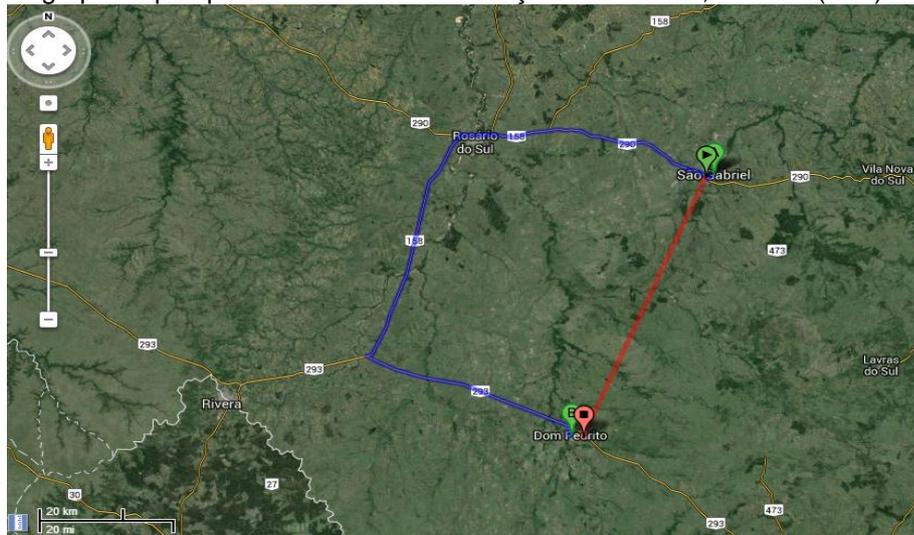
3 METODOLOGIA

3.1 Captura e Amostragem

Para realização deste trabalho foram capturados 24 exemplares pertencentes à espécie *P. sulphuratus* (Figura 1), pertencentes a duas populações de acordo com o ponto de coleta: São Gabriel – SG (n=10) e Dom Pedrito - DP (n=14).

As coletas foram realizadas de 2012 a 2014, nos municípios de Dom Pedrito/RS, 30° 58' 58" S 54° 40' 22" O, (fazenda da unidade experimental da Universidade Federal do Pampa *campus* Dom Pedrito) e São Gabriel/ RS, 30° 20' 09" S 54° 19' 12" O, (Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel), que distam entre si, aproximadamente 77 Km (Figura 2).

Figura 2 - Mapa mostrando a menor distância entre as cidades de São Gabriel e Dom Pedrito, 77 Km (vermelho) e a distância percorrida pelo grupo de pesquisa até o local de realização das coletas, 188 Km (azul).



Fonte: Google Maps, 2013

A captura dos espécimes foi realizada mediante o uso de redes de neblina (Figura 3), sob condições da licença do SISBIO nº 33860-3, código 18127894, datada de 08/06/2012 e Comissão de Ética no uso de animais - CEUA/UNIPAMPA.

Figura 3 - Rede de neblina utilizada para a captura dos exemplares.



Fonte: Rafael Kretschmer, 2013

Os espécimes capturados foram levados ao laboratório para tomada de amostra de sangue utilizando seringas com EDTA e armazenadas em microtubos de 1,5mL contendo 100 μ l de EDTA 15% que foram resfriadas em gelo até o momento da extração do DNA.

3.2 Extrações de DNA

Para extração do DNA foram utilizadas as amostras de sangue e o Mini Kit de Extração de DNA (PureLink Genomic DNA Mini Kit– Invitrogen®), conforme instruções do fabricante.

3.3 Seleção dos loci Microssatélites

Para as análises, foram buscadas na literatura descrições de loci microssatélites utilizados em espécies da família Tyrannidae e de outras famílias, para que se pudesse constatar se primers de famílias diferentes também seriam eficientes no estudo. Nestas referências foram selecionados primers para cinco loci microssatélites, três da espécie *Sayornis phoebe* (Latham, 1790) (Tyrannidae), Sap 104, Sap 50, e Sap 96, e dois da espécie *Neothraupis fasciata* (Lichtenstein, 1823) (Emberizidae), NF 1112 e NF 2930 (Tabela 1), considerados os mais polimórficos de acordo com o autores BEHELER et al. (2006) e CORRÊA et al. (2009).

Tabela 1 - Loci microssatélites utilizados para caracterização molecular de *P. sulphuratus*, sequências de nucleotídeos e temperaturas de anelamento na PCR.

Locus Microssatélite	Sequência de nucleotídeos	T°C	Referência
SAP50-F	TCCCAAGGGTCTGGTCTTC	60°	BEHELER et al, 2006
SAP50-R	GGTCCATCTCACACGCC		
SAP104-F	TGGCATTCTGAAGCTTAAAT	60°	BEHELER et al, 2006
SAP104-R	ATTGTTCTAGAGCTGAAGTG		
NF1112-F	ATGTTTCTGGCACTGAACGG	54°	CORRÊA et al, 2009
NF1112-R	GGGGATTACGATGGTGTTA		
SAP96-F	GGATGAGCAAACCCATCG	62°	BEHELER et al, 2006
SAP96-R	TGCCCAGGCAGCATGTGA		
NF2930-F	GGTCAAATGATCAGCAAAT	54°	CORRÊA et al, 2009
NF2930-R	AGCATGTAATCAACTTGCTAAA		

F= Forward; R= reverse; T°C= condição da temperatura de anelamento do primer.

Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

3.4 Reação em cadeia da polimerase - PCR

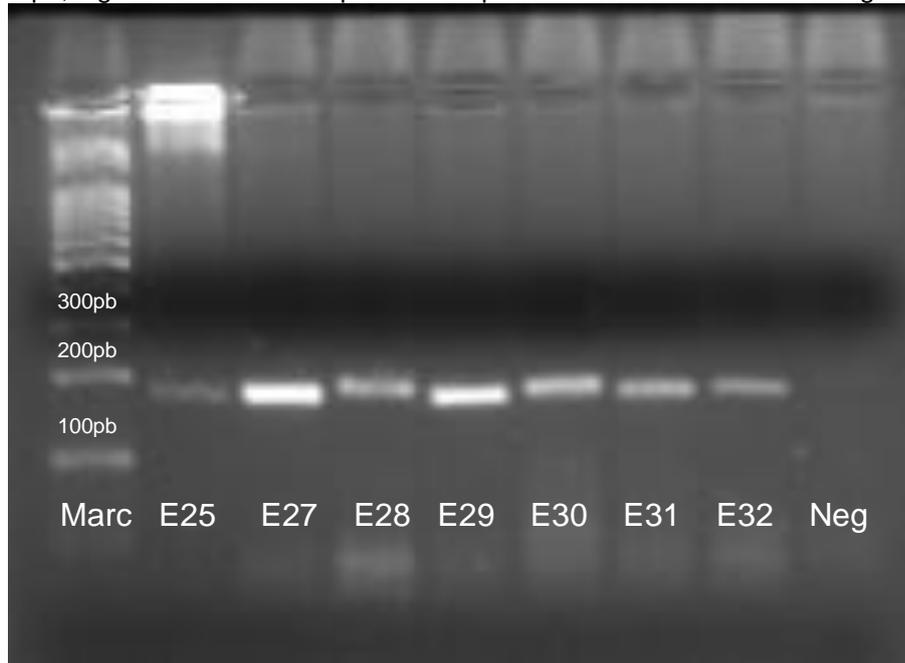
Os primers foram utilizados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizada 1U de Taq Polimerase Invitrogen, 2 µl de tampão 10X da mesma marca, 1,5 mM de MgCl₂, 1 µl de dNTP (10mM de cada nucleotídeo), 10pmol de cada primer, 25 ng de DNA e 18,3 µl de água ultrapura para constituir um produto final de 25 µl de amostra por reação.

As condições de amplificação foram: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), temperatura específica para o anelamento de cada primer (Tabela 1) por 1 minuto e (alongamento) a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

3.5 Avaliação das amplificações

Os resultados de cada amplificação foram conferidos inicialmente com a realização da técnica de eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed e visualizados fotografados em Transiluminador L-PixEx Locus Biotecnologia sob luz UV (Figura 4). Quando positivas para amplificação, as amostras foram reservadas para posterior análise em eletroforese utilizando gel de poliacrilamida 10% e DNA marcador de 100pb como padrão.

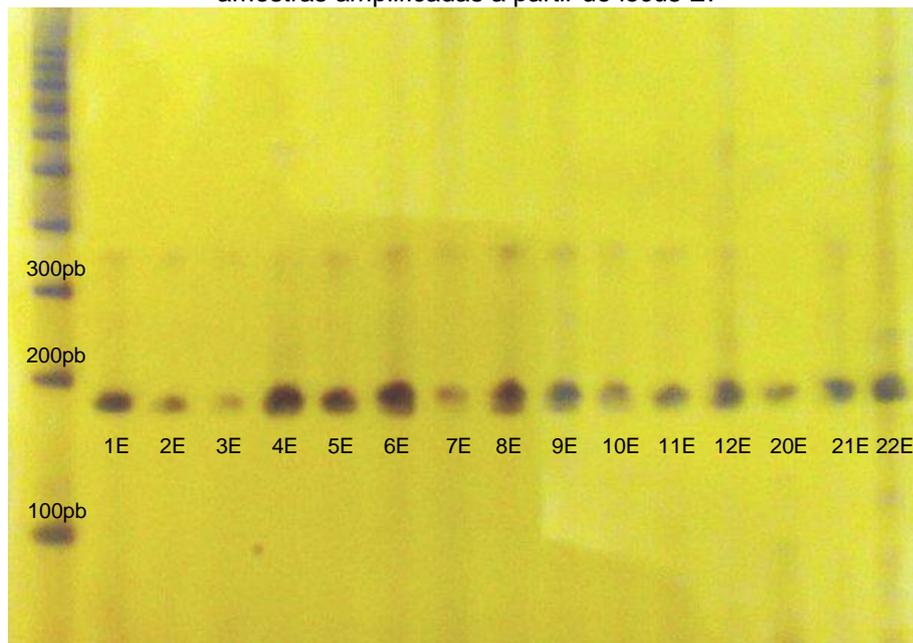
Figura 4 - Gel de agarose fotografado em transiluminador, podendo-se observar o DNA marcador 100pb, algumas amostras amplificadas a partir do locus E e o controle negativo.



Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

Para observação das bandas no gel, foi realizada a técnica de impregnação com solução de nitrato de prata (AgNO_3) (0,001g/mL) e revelação de NaOH. Logo após os géis foram fotografados para posterior quantificação das bandas observadas em cada amostra (Figura 5).

Figura 5 – Gel de Poliacrilamida 10% corado, mostrando o DNA marcador 100pb e algumas amostras amplificadas a partir do locus E.



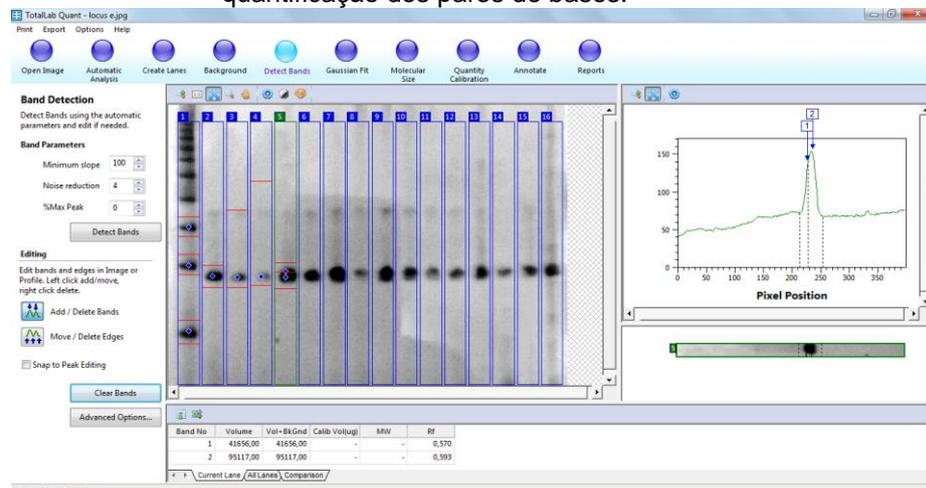
Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

3.6 Quantificação do peso molecular dos loci microssatélites

As fotos dos géis foram analisadas utilizando o *software* TotalLab Quant versão 13.1 (© TotalLab Ltd.), para quantificar o peso molecular dos alelos para cada locus em relação ao DNA marcador 100pb (Figura 6).

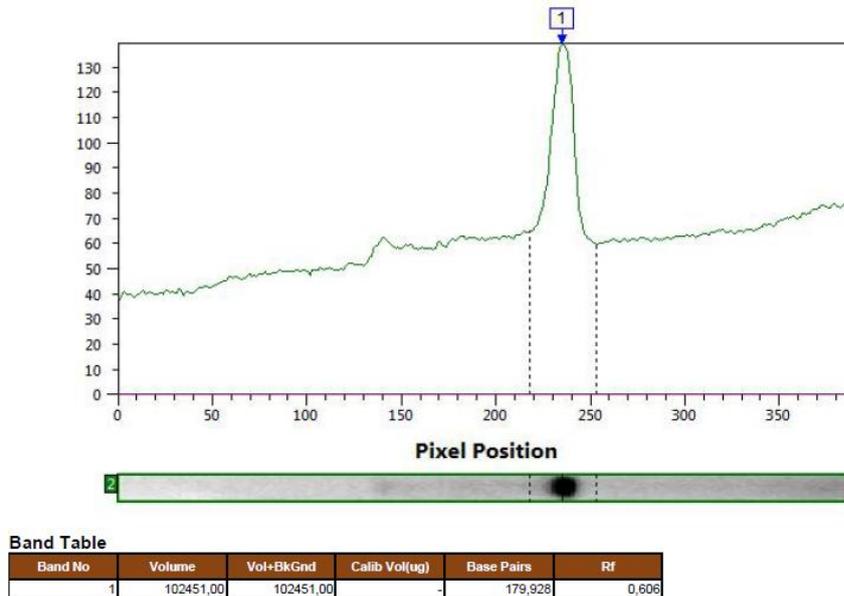
Neste *software*, basicamente é realizada a marcação individual das bandas observadas no gel de poliacrilamida e a quantificação é realizada computacionalmente tendo como padrão de referência o DNA marcador de 100 pb (Figura 7).

Figura 6 – Janela do *software* TotalLab onde a foto do gel de poliacrilamida está sendo utilizada para quantificação dos pares de bases.



Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

Figura 7 - Resultado da quantificação de uma banda demonstrando um pico no valor 179,928, que foi arredondado para 180pb em relação ao DNA marcador no intervalo de 100pb a 300pb.



Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

3.7 Análises genéticas

Os resultados do peso molecular de cada banda observada no gel foram extraídos para uma matriz do *software* Microsoft Office Excel (© Microsoft Corporation) com formatação para uso no *software* de análises genéticas Genalex versão 6.41 (Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539). Os parâmetros de número de alelos observados por locus (N_a), número de alelos esperado (N_e), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), frequência e diversidade alélica, e identificação de alelos privados foram estimados para cada população.

Além disso, foram realizadas análises dos grupos genéticos no *software* Structure para identificar a miscigenação entre as populações. Para tal foram utilizadas as informações a priori de que as amostras provinham de duas populações e que não ocorria fluxo gênico entre estas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos resultados da diversidade genética molecular em 24 exemplares de *P. sulphuratus*, para os cinco loci microssatélites previamente selecionados (Sap104, Sap50, Sap96, NF1112 NF2930). Os sucessos obtidos nas ampliações destes loci indicam que foram estes conservados entre as espécies da família Tyrannidae, *P. sulfuratus* e *Sayornis phoebe*, utilizada no estudo de BEHELER et al. (2006).

Nestes cinco loci, foi detectado um total de 75 alelos. O número de alelos por locus variou de 13 (Sap104) a 17 (Sap96 e NF1112) e a média de alelos por locus foi de 15. Os números de pares de bases também foram bastante variados nos 5 loci, como pode ser observado na Tabela 2. No caso de Sap50 o tamanho do fragmento foi maior do que o descrito no estudo citado, enquanto para os demais 4 loci os tamanhos dos fragmentos obtidos foram todos menores do que os descritos anteriormente.

Tabela 2 – Variação dos pares de bases para cada locus segundo BEHELER et al. (2006) e CORRÊA et al. (2009) comparados com os observados neste trabalho.

Locus	Tamanhos segundo BEHELER et al. (2006) e CORRÊA et al. (2009)	Tamanhos Observados
Sap 104	106–138	102-130
Sap 50	186–218	196-270
Sap 96	172–204	104-185
NF1112	302–358	150-226
NF2930	218–254	166-197

Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

Todos os loci microssatélites avaliados, apresentaram número de alelos observados (N_a) superiores aos números esperados (N_e), tal resultado indica que *P. sulphuratus* exibe alta variabilidade genética, e que estes loci constituem uma excelente ferramenta para estudos populacionais de *P. sulphuratus*. Destes, os loci Sap 50 e Sap 96 apresentaram o maiores número de alelos ($N_a= 11,5$), seguidos dos loci NF1112 ($N_a= 10,5$) e NF2930 ($N_a=10$), o menor valor foi observado para Sap 104 ($N_a=8$).

BEHELER et al. (2006), ao estudar 42 exemplares de *Sayornis phoebe*, encontrou valores de 15 alelos para o locus SAP50 e 12 para SAP104, números superiores aos observados neste trabalho, 11,5 e 8,0, respectivamente. Enquanto o

valor para o locus SAP96 (Na=10), mostrou-se menor do que é aqui apresentado (N=11,5). Quanto ao que foi descrito por CORRÊA et al. (2009), no estudo de 24 indivíduos de *Neothraupis fasciata* (mesmo número de indivíduos estudados aqui), o número de alelos para NF1112 (Na=17) foi maior e para NF2930 (Na=10) menor do que observamos no presente estudo. (Tabela 3)

Quanto à heterozigidade observada, Sap96 foi o locus com maior valor $H_o=0,84$, enquanto que para BEHELER et al. (2006) o valor para este locus foi $H_o=0,81$. O locus com menor heterozigidade observada foi NF1112, $H_o=0,56$, o que demonstra disparidade ao demonstrado por CORRÊA et al. (2009) que encontrou valor de $H_o=0,95$, sendo este no seu trabalho o segundo locus com maior heterozigidade observada. (Tabela 3)

A heterozigidade esperada variou de 0,83, para o locus Sap-104, a 0,88, para os loci Sap50 e Sap96. Os resultados para a H_e foram semelhantes aos encontrados por BEHELER et al. (2006) e CORRÊA et al. (2009) para a maioria dos loci, exceto para Sap96, onde houve uma variação de 0,14 entre o H_e observado por BEHELER et al. (2006) e o observado neste trabalho. As H_e relatadas nos trabalhos acima citados variaram entre 0,74 (Sap96) a 0,91 (NF2930).

Tabela 3: Média de índices de diversidade genética em *P. sulphuratus* baseada em cinco loci microssatélites para amostras de São Gabriel e Dom Pedrito.

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
Sap 104	10,50	8,00	6,31	0,70	0,83	0,16
Sap 50	10,50	11,50	8,49	0,74	0,88	0,16
Sap 96	10,00	11,50	8,27	0,85	0,88	0,03
NF1112	11,50	10,50	7,56	0,56	0,86	0,36
NF2930	11,50	10,00	7,46	0,68	0,85	0,20
Media	10,80	10,30	7,62	0,71	0,86	0,18

N=média de loci amplificados; Na= Número de alelos, Ne= número de alelos esperados, Ho= Heterozigidade observada, He= Heterozigidade esperada, F= índice de fixação.

Fote: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

As amostras analisadas foram divididas em duas populações de acordo com a localidade de origem: São Gabriel (SG) e Dom Pedrito (DP), que foram confrontadas separadamente para comparações dos índices de diversidade (Tabela 4).

Tabela 4: Índices de diversidade genética de cinco loci microssatélites em duas populações de *P. sulphuratus*.

Locus	População											
	SG						DP					
	N	Na	Ne	Ho	He	F	N	Na	Ne	Ho	He	F
Sap 104	8	6	4,57	0,63	0,78	0,20	13	10	8,05	0,77	0,88	0,12
Sap50	9	10	7,04	0,89	0,86	-0,04	12	13	9,93	0,58	0,90	0,35
Sap96	8	11	8,53	0,88	0,88	0,01	12	12	8,00	0,83	0,88	0,05
NF1112	10	8	6,45	0,50	0,85	0,41	13	13	8,67	0,62	0,88	0,30
NF2930	10	8	5,26	0,60	0,81	0,26	13	12	9,66	0,77	0,90	0,14
Média	9	8,6	6,37	0,70	0,84	0,17	12,6	12	8,86	0,71	0,89	0,19

N=número de amostras; Na= Número de alelos, Ne= número de alelos esperados, Ho= Heterozigiosidade observada, He= Heterozigiosidade esperada, F= índice de fixação.

Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyranidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

O número médio de alelos para os exemplares de DP Na=12 foi superior ao observado para SG Na=8,6, indicando que DP apresenta maior diversidade genética. Devemos levar em consideração que este resultado pode ser influenciado pelo número amostral, no entanto com o aumento do número de exemplares estas diferenças podem diminuir.

Analisando a lista de alelos privados por locus para cada local (Tabela 5), podemos constatar que a quantidade de alelos privados para SG foi menor que para DP. Os alelos que foram identificados como privados poderiam servir como marcadores populacionais, ou seja, se for observado em um indivíduo um alelo que pertença à lista de alelos privados de SG ou DP isso pode demonstrar a que população ele pertence.

Esta lista pode sofrer modificações a partir do momento que o número amostral seja aumentado, poderão surgir novos alelos para complementá-la ou até mesmo alguns poderão ser excluídos.

Tabela 5 - Lista de alelos privados para cada população (SG e DP) para cinco loci microssatélite.

População\locus	Sap 104	Sap50	Sap96	NF1112	NF2930
SG	108; 120	240; 270	116; 120; 136; 160 180	184; 200 210; 224	172; 176
Subtotal SG	2	2	5	4	2
DP	102; 116 118; 122 124; 130	204; 220 228; 254 258	104; 108 112; 118 142; 185	150;170 175; 196 198; 204 207; 220 226	166; 170 186; 190 192;197
Subtotal DP	6	5	6	9	6
Total Geral	8	7	11	13	8

Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

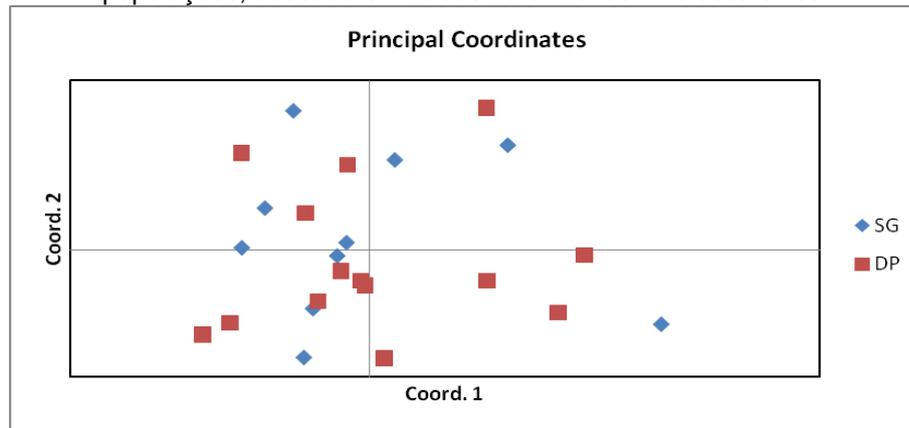
Com a análise de distribuição e distância genética em coordenadas principais no *software* Genealex e de miscigenação no Estructure (Figuras 8 e 9) dos exemplares amostrados, pode se observar que há uma clara sobreposição entre as duas supostas populações.

No gráfico gerado a partir do Genealex (Figura 8), os pontos vermelhos representando os exemplares de Dom Pedrito e os azuis representando os de São Gabriel, se espalharam e se sobrepueram por todos os quadrantes. Se de fato eles pertencessem a duas diferentes populações, os pontos de cada cor se agrupariam separados em um único quadrante, ou seja, vermelhos em um quadrante e azuis em outro. O fato deles terem se espalhado por todos os quadrantes indica também que há uma grande variabilidade genética entre esses indivíduos.

Já quanto ao gráfico gerado pelo Estructure (Figura 9), este demonstra que há miscigenação entre os espécimes coletados em Dom Pedrito e os coletados em São Gabriel, contrariando o suposto anteriormente neste trabalho. Se não existisse essa miscigenação o gráfico mostraria um padrão com predominância da cor verde em 1 e predominância da cor vermelha em 2, o que não ocorreu, já que nenhuma das cores prevaleceu em nenhum dos dois.

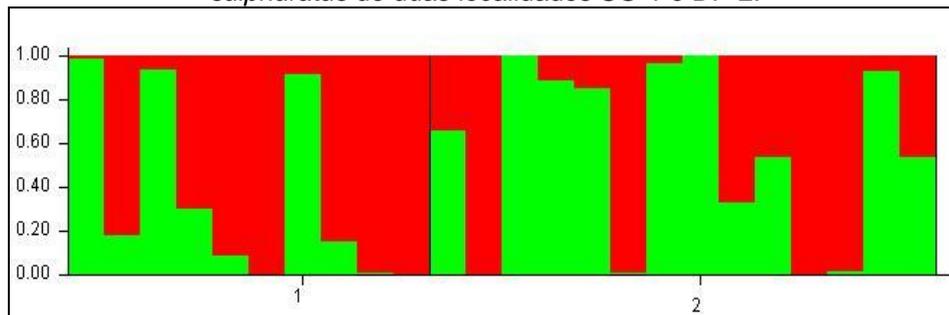
Estes dois fatos indicam que as amostras de SG e DP ao invés de pertencerem a duas populações, devem tratar-se de uma única e grande população nestas localidades do Bioma Pampa. Com isso também é possível inferir que apesar da fragmentação dos habitats, não há barreiras ao fluxo gênico nesta espécie entre estes dois locais, já que estas análises demonstraram o agrupamento entre os indivíduos de ambas localidades.

Figura 8 - Distância genética entre espécimes de *P. sulphuratus* de duas populações, baseada em dados de cinco loci microssatélites.



Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

Figura 9- Gráfico do software Estructure mostrando a miscigenação das amostras de *Pitangus sulphuratus* de duas localidades SG-1 e DP-2.



Fonte: Diversidade Genética de duas Populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae, Passeriformes). Letiane Nascimento da Ponte, 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, é apresentado pela primeira vez um estudo com marcadores moleculares do tipo microssatélites aplicados em populações de *P. sulphuratus*. Todos os primers microssatélites utilizados mostraram-se eficientes na caracterização da variabilidade genética, tanto os de *Neothraupis fasciata* (Emberizidae) quanto os de *Sayornis Phoebe* (Tyrannidae), mostrando que, apesar de serem altamente polimórficos, possuem regiões conservadas, sendo possível sua aplicação entre espécies diferentes.

Apesar do pequeno número de exemplares analisados foi possível observar que os loci Sap96 e NF1112 apresentaram maior número de alelos e o locus Sap104 o menor. O número total de alelos observados foi de 75 alelos, esse número por locus variou entre 13 a 17 e a média de alelos por locus foi de 15. Quando confrontados os dados de DP e SG, DP apresentou os maiores índices de diversidade em relação à SG.

Todos os loci microssatélites possuem número de alelos observado superior ao número de alelos esperado, indicando alta variabilidade genética em *P. sulphuratus*. Através dos resultados obtidos pode-se constatar que os 5 loci microssatélites utilizados são eficientes em estudos populacionais e que assim poderiam ser utilizados futuramente em outras aves deste e de outros biomas para avaliações genéticas de espécies e populações.

Também pode ser observado por meio deste estudo que não há uma separação clara de duas populações, entre as amostras de SG e DP, mas sim que todos os indivíduos amostrados talvez pertençam a uma única população e que não existam barreiras que impeçam o fluxo gênico entre estes dois locais de coleta. Portanto, apesar de todos os distúrbios que o Bioma Pampa vem sofrendo principalmente com a fragmentação de habitats, a espécie *P. sulphuratus* não parece estar sendo atingida por estas mudanças.

Por este ser um estudo pioneiro com utilização de loci microssatélites para estudo de diversidade genética em aves no Bioma Pampa, é importante que o mesmo continue sendo levado adiante, podendo ser realizado com outras espécies para que se tenham dados mais completos sobre o estado de conservação genética das aves neste bioma.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, Timothy J. J.; SU, Xin-Zhuan; RODDAM, Andrew; DAY, Karen P. Complex mutations in a high proportion of microsatellite loci from the protozoan parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular Ecology**, USA, v. 9, n. 10, p.1599-1608, 2000.
- ANMARKRUD, Jarl A; KLEVEN, Oddmund; BACHMANN, Lutz; LIFJELD, Jan T., 2008. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrU10*. **BMC Evolutionary Biology**, Reino Unido, v. 8:138, 2008.
- BELTON, Willian; **Aves do Rio Grande do Sul: Distribuição e Biologia**. São Leopoldo: Editora UNISINOS, 2003.
- BENKE, Glayson Ariel; DIAS, Rafael A.; BUGONI, Leandro; AGNE, Carlos Eduardo; FONTANA, Carla S.; MAURÍCIO, Giovanni N.; MACHADO, Diogenes B. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v.100, n.4, p. 519-556, 2010.
- BIERREGAARD, Richard O. J., LOVEJOY, Thomas E., KAPOs, Valerie, SANTOS, Angelo Augusto, HUTCHINGS, Roger W. The Biological Dynamics of Tropical Rainforest Fragments. **BioScience**, Uberlândia, v. 42, n. 11, p. 859- 866, 1992.
- BEHELER, A. S.; FIKE, J. A.;RHODES JR, O. E. Eight new polymorphic microsatellite loci from the eastern phoebe (*Sayornis phoebe*). **Conservation Genetics**, New York, v.8, n.5, p.1259-126, 2006.
- CRBO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Lista das Aves do Brasil**, 2014.Acessível em <http://www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2014.pdf>
- CORDEIRO Copérnico de Arruda; Soares Lúcio de Castro. A erosão nos solos da região sudoeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 82-150, 1977.
- CORRÊA, C.L.; COLLEVATTI, R. G.; CAPARROZ, R. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci for *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes) with Widely Cross Amplification in Neotropical Passerines. **Journal of Heredity**. v.101, n.3, p.385-389, 2009.
- DONATELLI, Reginaldo J.; FERREIRA, Carolina D., DALBETO, Andreli C., POSSO, Sérgio R. Análise comparativa da assembléia de aves em dois remanescentes florestais no interior do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 362–375, 2007.
- FARIA, Patrícia J.; MIYAKI, Cristina Y. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 231-140, 2006.

FITZPATRICK, John W. Foraging Behavior of Neotropical Tyrant Flycatchers. **Condor**, USA, v. 82, p. 43-57, 1980.

GRANTSAU, Rolf; **Guia Completo de Aves do Brasil**. São Carlos: Vento Verde, 2010.

GUNSKI, José Ricardo; CABANNE, Gustavo Sebastián; LEDESMA, Mário A.; GARNERO, Analia Del Valle. Análisis cariotípico de siete especies de tiránidos (*Tyrannidae*). **El Hornero. Revista de Ornitología Neotropical**, Buenos Aires, v. 15, n. 2, p. 103-109, 2000.

HACKETT, Shannon J.; KIMBALL, Rebecca T.; REDDY, Sushma; BOWIE, Rauri C. K.; BRAUN, Edward L.; BRAUN, Michael J.; CHOJNOWSKI, Jena L.; COX, Andrew; HAN, Kin-Lan; HARSHMAN, John; HUDDLESTON, Christopher; MARKS, Ben D.; MIGLIA, Kathleen J.; MOORE, William S.; SHELDON, Frederick H.; STEADMAN, David W.; WITT, Christopher C.; YURI, Tamaki Yuri. A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. **SCIENCE**, New York, v. 320, p. 1763-1768, 2008.

HARTL, Daniel L.; **Princípios de Genética de Populações**. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2008.

HARTL, Daniel.L; CLARK, Andrew G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

IBGE. 2004. Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE. Acessível em www.ibge.gov.br

LEVINSON, Gene; GUTMAN, George A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 3, p. 203-21, 1987.

MARQUES, Ana Alice Biedzicki de; FONTANA, Carla Suertegaray; VÉLEZ, Eduardo; BENKE, Glayson Ariel; SCHNEIDER, Maurício; REIS, Roberto Esser dos. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Decreto no 41.672, de 11 junho de 2002**. Porto Alegre: FZB/MCT PUCRS/PANGEA, 2002.

MARTINS, J. M. **Prospecção de locos microssatélite e análise de variabilidade genética em uma população do Mato Grosso do Sul, visando a conservação da Arara Vermelha, *Ara chloroptera* (Psittacidae, Aves)**. São Carlos: UFSCar, 2007. Disponível em: http://www.bdtd.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2227.

NIE, Wenhui; O'BRIEN, Patricia C. M.; FU, Bee L. Ng and Beiyuan; VOLOBOUEV, Vitaly; CARTER, Nigel P.; SMITH, Malcolm A. Ferguson; YANG, Fengtang 2009 - Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicephalus*, Charadriiformes) - An atypical species with low

diploid number, **Chromosome Research**, Holanda, v. 17, n. 1, p. 99–113, 2009.

OLMOS, Fábio. Aves ameaçadas, prioridades e políticas de conservação no Brasil. **Natureza e Conservação**, Curitiba, v.3, n.1, p.21-42, 2005.

PIERCE, Benjamin A. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RANDI, E.; TABARRONI, C.; RIMONDI, S.; LACCHINI, V.; SFOUGARIS, A. Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). **Molecular Ecology**, USA, v. 12, n. 8, p.2201–2214, 2003.

SIGRIST, Tomas. **Avifauna Brasileira**. São Paulo: Avis Brasilis, 2013.

SOUZA, Deodato Guilherme Santos. **Todas as Aves do Brasil**. Bahia: Editora DAAL, 2004

STORFER, Andrew. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. **Biological Conservation**, Arizona, v. 87, n. 2, p.173-180, 1999.

SUERTEGARAY, Dirce M.A., PIRES DA SILVA, Luís Alberto. Tche Pampa: Histórias da Natureza Gaúcha. In: PILLAR, V.P... [et. al]. Editores. **Campos Sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009.

TÓTH, Gábor; GÁSPÁRI, Zoltán; JURKA, Jerzy. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p. 967-981, 2000.