

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ecologia**

**Fragmentação de Matas de Galeria e Diversidade
Genética de *Antilophia galeata* (Aves; Pipridae)
no Planalto Central**

Anamaria Achtschin Ferreira

Brasília, Maio de 2001

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA

FRAGMENTAÇÃO DE MATAS DE GALERIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *ANTILOPHIA*
GALEATA (AVES; PIPRIDAE) NO PLANALTO CENTRAL

ANAMARIA ACHTSCHIN FERREIRA

Tese apresentada ao Departamento de
Ecologia como requisito parcial para
obtenção do Grau de Doutor em
Ecologia.

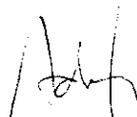
BRASÍLIA, MAIO DE 2001

Estudo feito junto ao Departamento de Ecologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação do Prof. Dr. Roberto Brandão Cavalcanti e com bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

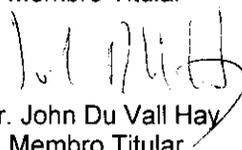
Aprovado por:



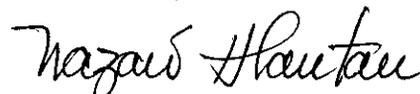
Prof. Dr. Roberto Brandão Cavalcanti
Orientador



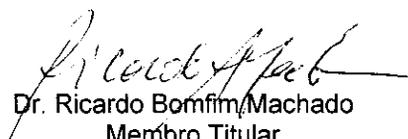
Prof. Dr. Alexandre Bamberg de Araújo
Membro Titular



Prof. Dr. John Du Vall Hay
Membro Titular



Prof. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães
Membro Titular



Dr. Ricardo Bomfim/Machado
Membro Titular

Prof. Dr. Raimundo P. Barros Henriques
Membro Suplente

Dra. Maria Luiza de Araújo Gastal
Membro Suplente

Agradecimentos

Ao Roberto Brandão Cavalcanti, por, além de orientar, ter tido confiança e otimismo.

Ao Carlos Eduardo Anunciação, que, no papel de co-orientador, viabilizou, como um verdadeiro McGiver, a conclusão desta tese e como marido, deu o apoio logístico necessário.

Aos professores John Du Vall Hay, Guarino R. Colli e Regina Macedo, que, participando da banca para o exame de qualificação, deram sugestões fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

Às professoras Célia Maria de Almeida Soares e Rosália Santos Amorim Jenuíno, do Laboratório de Biologia Molecular da UFG, e ao professor Luíz Artur Mendes Bataus, do Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética, por disponibilizarem os respectivos laboratórios para a conclusão da etapa experimental.

À professora Silvana Petrofeza, pela colaboração laboratorial.

À Mieko e Vivian pela total colaboração nas coletas dos dados em campo.

Ao Paulo de Tarso Zuquim Antas pelas importantes informações sobre a espécie estudada, *Antilophia galeata*.

Ao Dr. Elmo Monteiro Silva Júnior, Chefe do Parque Nacional, por autorizar as coletas no Parque Nacional de Brasília, ao Dr. Afonso Celso Candeira Valois, da Embrapa, por autorizá-las na área do Riacho Fundo pertencente à EMBRAPA e ao Dr. Antônio Xavier de Campos, por autorizá-las na FAL. Agradeço ainda à direção do Jardim Botânico e da Fundação Zoobotânica, por autorizarem as coletas no interior das áreas que administram.

Ao Prof. Ivanilton José de Oliveira, do Departamento de Geografia da UFG, por tão prontamente disponibilizar as imagens de satélite referentes ao estado de Goiás.

Ao Alfredo Palao Peña por ter autorizado as coletas na EFLEX de Silvânia e pela ajuda em campo e Magda Rodrigues Castro pela colaboração em campo e a ambos pela amizade.

Ao Neisson Abadio Silva pela colaboração nas etapas laboratoriais.

Ao Ricardo Bonfim Machado, por ter cedido o IDRISI 32, possibilitando as análises espaciais.

Aos amigos Valéria Ribeiro Maitan e José Daniel, pelo apoio de irmãos.

À fotógrafa e amiga Sueli Eunice Paluan Bento pelas fotos e pela amizade.

Ao IBAMA, por autorizar as coletas tanto no DF, quanto no estado de Goiás.

Ao CEMAVE, pela autorização para anilhar e bem como por ceder as anilhas utilizadas no decorrer das capturas.

Ao CNPq, por ter concedido a bolsa de estudos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ecologia, pelo esforço em apoiar os alunos, administrando a escassez.

Índice

Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Introdução geral.....	1
Abordagem metodológica.....	4
Capítulo 1 - Análises espaciais e a fragmentação das matas de galeria.....	5
Introdução.....	5
Metodologia.....	9
Descrição das áreas amostradas.....	9
Riqueza de espécies.....	11
Análise da paisagem – fonte de dados.....	11
Identificação dos fragmentos amostrados.....	13
Classificação dos habitats do cerrado.....	14
Medidas de distância e resistência ao deslocamento.....	15
Resultados.....	17
Riqueza de espécies.....	17
Identificação dos habitats do cerrado.....	18
Efeito da fragmentação das matas de galeria sobre <i>Antilophia galeata</i>	23
Medidas de distância e resistência ao deslocamento.....	25
Discussão.....	28
Conclusões.....	35
Bibliografia.....	36
Anexo.....	43
Capítulo 2 - Diversidade genética de <i>Antilophia galeata</i> em matas de galeria do Planalto Central.....	48
Introdução.....	48
Metodologia.....	54
Seleção da espécie a ser estudada.....	54

Capturas.....	56
Coleta de sangue.....	57
Padronização da técnica do DNA <i>fingerprinting</i>	57
Análise dos dados.....	59
Variabilidade genética.....	59
Análise de Componentes Principais.....	61
Resultados.....	61
Padronização da técnica do DNA <i>fingerprinting</i>	61
Variabilidade genética.....	66
PCA.....	68
Discussão.....	68
Conclusões.....	74
Bibliografia.....	76
Anexo.....	83
Protocolos.....	83
Extração de DNA.....	84
Quantificação do DNA.....	84
Digestão das amostras.....	85
Listagem dos reagentes utilizados.....	93
Capítulo 3 - Análise Populacional de <i>Antilophia galeata</i>	96
Introdução.....	96
Metodologia.....	99
Construção da biblioteca genômica.....	99
Caracterização da sequência dos clones positivos de <i>A. galeata</i>	100
Diluição do primers.....	100
Extração do DNA.....	100
Padronização das reações de PCR.....	100
Visualização das amplificações em gel de poliacrilamida.....	101
Análise do polimorfismo.....	102
Resultados.....	103
Construção da biblioteca Genômica.....	103

Ligação, Plaqueamento e Screening da Livraria Genômica.....	105
Seqüenciamento e síntese dos primers.....	110
Condições das reações de PCR.....	112
Extrações de DNA e Amplificações.....	113
Análise de polimorfismo.....	115
Discussão.....	124
Conclusões.....	128
Conclusões gerais.....	129
Bibliografia.....	130
Anexo.....	134
Construção da biblioteca genômica.....	134
Teste da técnica de clonagem.....	135
Digestão com <i>Hind</i> III.....	135
Desfosforilação.....	136
Digestão do DNA Aves/ <i>Hind</i> III, Phos - com <i>Eco</i> RI.....	136
Digestão do Vetor p-Bluscript com <i>Hind</i> / <i>Eco</i> RI.....	137
Ligação, Plaqueamento e Screening da Livraria Genômica.....	137
Ligação.....	138
Transformação.....	138
Repique dos clones transformantes e lise das colônias.....	139
Screening das livrarias genômicas.....	139
Extração do DNA.....	140
Extração com guanidina.....	140
Extração com clorofane.....	141
Extração com quelex.....	142
Lista dos primers sintetizados.....	143
Diluição dos primers.....	145

Lista de Figuras

Figura 01 –	Composição de falsas cores feita a partir das bandas 3, 4 e 5 das imagens Ladsat TM abrangendo a área foco das coletas no Distrito Federal.....	12
Figura 02 –	Composição de falsa cores feita a partir das bandas 3, 4 e 5 das imagens Ladsat TM abrangendo a área foco das coletas no estado de Goiás.....	13
Figura 03 –	Imagem gerada através da classificação supervisionada da imagem que abrange o Distrito Federal usando-se o método <i>Minimum Distance to Mean</i> sendo, vermelho = áreas queimadas; verde = matas de galeria; marrom = campo; cinza = áreas urbanizadas; pardo = áreas degradadas; azul = água; verde-acinzentado = cerrado estrito.....	19
Figura 04 –	Delimitação do entorno das matas de galeria amostradas no DF considerando-se uma distância de 450 m.....	20
Figura 05 –	Deslocamento potencial de <i>Antilophia galeata</i> entre os fragmentos amostrados.....	27
Figura 06 –	Distribuição de <i>Antilophia galeata</i> (linha vermelha, segundo Ridgely e Tudor 1989) em relação à distribuição do cerrado brasileiro (hachurado em preto, segundo Ribeiro e Walter 1998).....	56
Figura 07 –	Teste de enzimas de restrição usando <i>Alu I</i> , <i>Hae III</i> , <i>Hinf I</i> , <i>Hind III</i> e <i>RSA</i> . Indivíduo 1: Slot 1 – PM; 2 - <i>Alu I</i> ; 3 – <i>Hae III</i> ; 4 – <i>Hinf I</i> ; 5 – <i>Hind III</i> ; 6 – <i>RSA</i> ; Indivíduo 2: Slot 6 - <i>Alu I</i> ; 7 – <i>Hae III</i> ; 8 – <i>Hinf I</i> ; 9 – <i>Hind III</i> ; 10 – <i>RSA</i> ; demais slots – <i>Turdus</i> sp.....	61
Figura 08 –	DNA <i>fingerprinting</i> de <i>A. galeata</i> (AG), <i>T. rufus</i> (TC) e <i>T. rufiventris</i> (TR) hibridizados com a sonda AG9. 1 a 5 e 6 a 10 AG digerido com enzimas <i>Alu I</i> , <i>Hae III</i> , <i>Hinf I</i> , <i>Hind III</i> e <i>Rsa</i> ; 11 a 12 e 13 a 14 TC digerido com <i>Hae III</i> e <i>Hinf I</i> ; 15 a 16 e 17 a 18 TR digerido com <i>Hae III</i> e <i>Hinf I</i>	63
Figura 09 –	Padrão de bandas obtido pela técnica do DNA <i>fingerprinting</i> para a população da mata de galeria do Riacho Fundo.....	64
Figura 10 –	Padrão de bandas obtido pela técnica do DNA <i>fingerprinting</i> para a população das matas de galeria de Silvânia e Riacho Fundo.....	65
Figura 11 –	Representação gráfica dos resultados da PCA feita usando a matriz de presença/ausência de bandas geradas pelo DNA <i>fingerprinting</i> para as matas de galeria das áreas Silvânia (A-J), Sobradinho (K-T) e Riacho Fundo (U-a). Pontos A, B, C, L, N sobrepõem-se no ponto 0,0. Eixos 1 e 2.....	69

Figura 12 –	DNA total extraídos de AG (1 a 8); TC (8 a 12) e TR (12 a 17).....	104
Figura 13 –	Perfil de digestão do DNA total de AG (1) e digerido com I - <i>Hae</i> III.; II - <i>Hinf</i> I; III - <i>Sal</i> 3A1.....	104
Figura 14 –	DNAs digeridos (<i>Antilophia galeata</i> (AG), <i>Turdus rufiventris</i> (TR) e <i>Tachyphonus rufus</i> (TC)) com enzimas de restrição para a construção da biblioteca genômica.....	105
Figura 15 –	Ligação dos fragmentos de DNA em vetor p-Bluscript para construção da biblioteca genômica <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI.....	106
Figura 16 –	Caracterização parcial do peso molecular de clones obtidos; A - Perfil de restrição dos clones selecionados da livraria genômica de <i>A. galeata</i> (1 a 7; <i>T. rufus</i> (8 a 10) e <i>T. rufiventris</i> (11 a 14). 1µg de DNA foi digerido duplamente com 8U das enzimas <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III para liberação do inserto.....	108
Figura 17 –	Fragmentos de DNA selecionados e eletroeluídos para a construção da biblioteca genômica: 1 AG (<i>Antilophia galeata</i>), 2 TC (<i>Tachyphonus rufus</i>) e 3 TR (<i>Turdus rufiventris</i>).....	109
Figura 18 –	Exemplos das ampliações de alguns loci visualizadas em gel de poliacrilamida.....	116
Figura 19 –	Resultado da análise de componentes principais considerando-se a matriz de presença/ausência de loci amplificado (♦ = rio Vermelho; ◡ = córrego Capetinga; • = Olho d'Água; • = córrego Bananal; — = córrego Mato Seco; ◆ = ribeirão Sobradinho; ▲ = Riacho Fundo).....	121
Figura 20 –	Resultado da análise de componentes principais considerando-se a matriz de número de indivíduos que amplificou o loci x (♦ = rio Vermelho; ◡ = córrego Capetinga; • = Olho d'Água; • = córrego Bananal; — = córrego Mato Seco; ◆ = ribeirão Sobradinho; ▲ = Riacho Fundo).....	122

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Valores de dificuldade de deslocamento (fricção) atribuídos aos vários ambientes encontrados no DF.....	15
Tabela 02 – Número de capturas, área dos fragmentos, esforço amostral, riqueza total de espécies, de espécies dependentes de matas de galeria do DF e nos 6 primeiros dias de amostragem.....	17
Tabela 03 – Lista das espécies e número de indivíduos capturados nas várias matas de galeria amostradas no Distrito Federal. CC = Córrego Capetinga; CRF = Córrego Riacho Fundo; MG = Córrego Mata Gado; OD = Olho d'Água; CB = Córrego Bananal; RS = Ribeirão Sobradinho; JB = Jardim Botânico; RV = Rio Vermelho. Nomes populares e ordem filogenética segundo Sick 1985.....	43
Tabela 04 – Proporção dos vários ambientes existentes no DF levantados através de dados de sensoriamento remoto da imagem do satélite LANDSAT TM classificada (imagem de 95).....	18
Tabela 05 – Valores percentuais dos vários tipos de ambientes no entorno dos fragmentos amostrados.....	21
Tabela 06 – Apresentação resumida dos valores percentuais dos ambientes naturais e alterados no entorno dos vários fragmentos amostrados.....	22
Tabela 07 – Dados sobre área e abundância relativa de <i>Antilophia galeata</i> em vários fragmentos de matas de galeria do Distrito Federal. Dados da dissertação de mestrado "Dinâmica de Comunidades de Aves em Matas de Galeria do DF", coletados em 94/95.....	24
Tabela 08 – Número de fragmentos existentes nas classes de tamanho correspondentes às matas de galeria inventariadas em 94/95.....	25
Tabela 09 – Distância (km) entre as áreas amostradas, tomadas duas a duas.....	25
Tabela 10 – Distâncias (km) percorridas no deslocamento potencial de <i>Antilophia galeata</i> entre fragmentos de matas de galeria do DF.....	34
Tabela 11 – Matriz de presença/ausência de bandas obtidas por DNA <i>fingerprinting</i> a partir de amostras de DNA extraídas de sangue coletado em <i>Antilophia galeata</i> nas matas de galeria de Rio Vermelho, Sobradinho e Riacho Fundo. A = rio Vermelho; B = Sobradinho e C = Riacho Fundo.....	86
Tabela 12 – Resultado da quantificação do DNA existente nas amostras nas quais foram feitas as extrações de DNA. São apresentados também o volume final, a concentração do DNA, volume requerido para uso na técnica do DNA <i>fingerprinting</i>	88

Tabela 13 – Resultado das análises a partir da matriz de presença/ausência gerada pelo DNA <i>fingerprinting</i> para as matas de galeria de Silvânia, Sobradinho e Riacho Fundo. P_i = Poder de individualização; P_a = probabilidade que dois indivíduos tomados ao acaso possuam mesmo perfil de bandas; P_r = Probabilidade que dois indivíduos relacionados exibam o mesmo perfil de bandas; BS = coeficiente de compartilhamento de bandas.....	66
Tabela 14 – Resultado com o APD calculado para as populações de Silvânia, Sobradinho e Riacho Fundo tomadas isoladamente e duas a duas.....	67
Tabela 15 – Dados de variância % e % cumulativa nos 4 primeiros eixos gerados pela PCA feita a partir dos dados de presença/ausência de bandas geradas pelo DNA <i>fingerprinting</i> em 3 áreas de amostragem.....	68
Tabela 16 – Sumário das estratégias de clonagem de VNTRs em diferentes genomas, utilizando o blot ou repique de clones para o nylon. ⁽¹⁾ transformação/ μ g vetor/ sistema de ligação - média; ⁽²⁾ média comparada aos clones analisados.....	107
Tabela 17 – Primers amplificados nas amostras de DNA nas várias populações de <i>Antilophia galeata</i>	146
Tabela 18 – Número de amostras nas quais os primers amplificaram com sucesso constatado em gel de agarose.....	114
Tabela 19 – Número de indivíduos em cada população com pelo menos um locus amplificado.....	115
Tabela 20 – Número de indivíduos que apresentaram amplificação em pelo menos um locus demonstrável em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio.....	115
Tabela 21 – Heterozigosidade observada (H) e heterozigosidade esperada (H_e) em cada população e o número médio de alelos por indivíduo em cada população.....	117
Tabela 22 – Frequência alélica HrU6, AGA2 e Dpu16 em indivíduos de <i>Antilophia galeata</i>	118
Tabela 23 – Matriz apresentando, em cada população número de indivíduos que apresentaram ampliações no alelo X.....	119
Tabela 24 – Matriz de distâncias euclidiana usadas para a análise de cluster.....	119
Tabela 25 – Variância absoluta e acumulada nos quatro primeiros eixos gerados pela análise de componentes principais.....	119
Tabela 26 – Número de pontos que se sobrepuseram na análise de componentes principais e suas coordenadas cartesianas.....	120
Tabela 27 – Variância absoluta e acumulada nos quatro primeiros eixos gerados pela análise de componentes principais.....	122

Resumo

O Cerrado, embora represente uma das maiores zonas vegetacionais deste continente, é uma das regiões ecológicas menos conhecidas da América do Sul. Existem quatro tipos estruturais neste bioma variando quanto ao estrato arbóreo, tamanho, densidade e tipo de árvores. Um destes, a mata de galeria, representa aproximadamente 5% dentre as fisionomias do Cerrado e possui grande importância ecológica por aumentar sobremaneira a diversidade regional e por representar, segundo alguns autores, uma conexão atual entre a mata Amazônica e a mata Atlântica.

A ocupação do Cerrado iniciou-se no século XVIII, intensificando-se na década de 30 em função da ligação ferroviária entre São Paulo e Anápolis e em função da construção de Brasília, no final da década de 50. A partir destes processos de ocupação, estima-se que entre 37 a 50% do cerrado tenha sido modificado, levando à redução da proporção de ambientes naturais bem como da fragmentação dos remanescentes.

O objetivo deste trabalho foi investigar o impacto da fragmentação de ambientes sobre a estrutura genética de populações de aves, utilizando métodos moleculares para caracterizar a diversidade genética, bem como sugerir possíveis estratégias de conservação de espécies. O estudo focalizou o tangará-chifrudo *Antilophia galeata* (Aves; Pipridae). Esta espécie foi selecionada por ser típica das matas de galeria e por ser abundante o suficiente para permitir capturas de pelo menos 20 indivíduos em cada uma das sete populações amostradas.

Para este estudo foram feitas, primeiramente, análises espaciais como tamanho dos fragmentos onde as populações foram amostradas, análise do tipo de ambiente no entorno destes locais, visando estimar o isolamento dos fragmentos, a distância entre os vários fragmentos analisados, a distância potencialmente percorrida por possíveis migrantes de *A. galeata* e cálculos sobre a fragmentação do cerrado. Através da análise destes dados, foi possível perceber que a alteração ambiental provoca um aumento na distância potencial percorrida por indivíduos migrantes e que a proporção dos ambientes naturais do entorno das matas de galeria amostradas está relacionada à riqueza de espécies nestes locais.

Utilizando a técnica de minisatélites, foi calculada a diversidade genética de três populações desta espécie e estes dados foram correlacionados às variáveis ambientais calculadas anteriormente. Comparando-se as três populações, pode ser constatado que a diversidade genética apresenta valores próximos para todas elas. Comparando se o APD (Average Percent Difference) interno e entre população, foi possível observar que a população de Riacho Fundo possui menor valor para esta variável. Foram também encontradas diferenças entre as distâncias genéticas entre os pares de populações.

Utilizando microsátélites foi calculada a heterozigosidade das várias populações amostradas e estes dados foram também correlacionados a variáveis ambientais. Foram encontradas diferenças entre as heterozigosidade esperada e observada para as populações amostradas mas os valores da heterozigosidade observada foi similar em todas as populações. Embora as análises multivariadas tenham indicado similaridade entre as populações, as correlações envolvendo distância euclidiana entre amplificações dos vários loci e distância física entre os fragmentos apresentaram valores positivos e significativos estatisticamente. Estes resultados podem ser um indicativo de que a distância física, associada às alterações ambientais, potencialmente podem afetar as populações de *Antilophia galeata* no DF, embora estes efeitos não se façam sentir, até o momento, na análise populacional.

Abstract

The Cerrado savanna biome of Central Brazil is one of the largest vegetation types of South America, and yet remains poorly known in biological terms. It is classified into four structural types according to the arboreal stratum, size, density and type of trees. One of these types, the gallery forest, covering approximately 5% of the physiognomies of the cerrado, increases species diversity of the Cerrado and establishes a forest connection between Amazonia and the Atlantic Forest biomes.

Occupation of the Cerrado began in the 18th century, intensifying since the 1930s after the railway connection between São Paulo and Anápolis and with the construction of Brasília in the 1950s. Current estimates place modification of the cerrado at 67%, resulting in reduction of the proportion of natural environments and fragmentation of the remainders.

To study the influence of fragmentation on natural populations and to suggest possible strategies of species conservation, I studied the influence of the fragmentation on the genetic diversity of *Antilophia galeata* (Aves; Pipridae). This species was selected because it is typical of the gallery forests and is abundant enough to allow capture of at least 20 individuals in each one of the seven populations surveyed.

I did spatial analyses of the size of the fragments where the populations were surveyed, analysis of the environment of surrounding fragments, degree of isolation of fragments, distance among fragments, distance potentially traveled by *A. galeata* dispersers, and estimated landscape fragmentation index. Environmental disturbance caused increases in the potential distance traveled by migrating individuals, and species richness was related to the degree of disturbance around fragments.

Using the minisatélites, the genetic diversity of three populations of this species was calculated and these data were correlated to the environmental variables calculated previously. Being compared the three populations, it can be verified that the genetic diversity presents close values for all of them. Being compared APD (Average Percent Difference) inter and enter population, was possible to observe that Riacho Fund population possesses smaller value for this variable. They were also found differences among the genetic distances for each pair of populations.

Using microsattelites the heterozigosity of the several populations was calculated and these data were also correlated to environmental variable . Was found differences among the expected heterozigosity and observed for the populations analyzed. Although the multivariated analyses have indicated similarity among the populations, the correlations involving euclidiane distance between amplifications of the several loci and physical distance among the fragments presented positive values and statistical significance. These results can be an indicative that the physical distance, associated to the environmental alterations, can affect the populations of *Antilophia galeata* in DF, although these effects don't make to observe, until the moment, in the population analysis.

Introdução geral

O Cerrado é uma das regiões ecológicas mais pobremente conhecidas da América do Sul (Silva 1995a). Representa uma das maiores zonas vegetacionais deste continente, estendendo-se do sul do Brasil até a bacia do rio Amazonas (Ferri 1977). É um tipo de vegetação com características xeromórficas (Oliveira-Filho *et al.* 1989), centrada no grande platô do Brasil Central (embora haja manchas isoladas ao norte da bacia do rio Amazonas) (Ribeiro e Walter 1998), estendendo-se de 5° a 20° de latitude sul e de 45° a 60° de longitude oeste. Abrange os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e o Distrito Federal (Alho & Martins 1995; Silva 1995b; Ribeiro e Walter *op. cit.*). Toda essa extensão cobre aproximadamente 20% de todo o país (Alvim 1954; Eiten 1972; Oliveira-Filho *et al.* 1989; Felfili e Silva-Jr. 1993), o que representa aproximadamente 1,5 milhão de km² (Alvim e Araújo 1952; Ferri, *op. cit.*; Goodland 1971) a 2 milhões de km² (Ab'Saber 1971, 1983; Oliveira-Filho e Ratter 1995), perdendo em extensão apenas para a floresta amazônica com 3,5 milhões de km² (Ab'Saber 1977; Furley e Ratter 1988; Ratter e Dargie 1992; Felfili e Silva Jr 1993; Ribeiro e Water 1998).

O Cerrado não é uma formação uniforme (Coutinho 1990), apresentando fisionomias que englobam formações florestais, savânicas e campestres (Ribeiro e Walter 1998), variando quanto ao estrato arbóreo (tamanho, densidade e tipo de árvores), arbustivo e graminoso. Segundo estes autores, formações campestres designa áreas com predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, faltando árvores na paisagem; cerrado senso restrito – savana: refere-se a áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato graminoso, sem a formação de dossel contínuo; formações florestais: representa áreas com predominância de espécies arbóreas, onde há formação de dossel, contínuo ou descontínuo. Dentre as formações florestais, temos as matas de galeria, que ocorre ao longo das linhas de drenagem, localizando-se geralmente nos fundos dos vales ou nas cabeceiras de drenagem (Ribeiro e Walter, *op. cit.*) e formando uma rede densa dentro da região do cerrado (Silva 1996). Uma vez que as nascentes que compõem alguns dos maiores rios da América do Sul estão localizadas nos platôs da região do cerrado, as matas de galeria fazem, através de sistemas hidrográficos, conexões com quase todos as regiões ecológicas vizinhas (Silva *op.*

it.). Aparentemente não apresenta caducifolia durante a estação seca. A altura média do estrato arbóreo está entre 20 e 30 metros, apresentando uma superposição das copas de modo a fornecer cobertura arbórea de 80 a 100% (Ribeiro *et al.* 1983, Ribeiro e Walter 1998). Estima-se que, primitivamente, as matas de galeria representavam cerca de 5% do ambiente do Cerrado (Dias 1989). Vários autores têm sugerido que matas de galeria do Brasil Central representam intrusões de matas Amazônica e/ou Atlântica ao longo de cursos d'água (Vitt e Cadwell 1991) dentro do domínio do Cerrado, representando uma conexão atual entre estes dois biomas (Oliveira-Filho e Ratter 1995).

A ocupação do Cerrado iniciou-se no século XVIII com a abertura e assentamento de povoados para a exploração de ouro e pedras preciosas e criadores de gado em escala extensiva usando pastagens naturais (Cavalcanti 1999). Com a exaustão das minas, a região passou a ser explorada para a criação extensiva de gado. A ocupação mais intensiva se deu apenas nos anos 30, através da ligação ferroviária entre São Paulo e Anápolis, passando pelo Triângulo Mineiro (Alho e Martins 1995).

Dois fatores promoveram a expansão agrícola mais recente no Cerrado: a construção de Brasília, no final da década de 50 e a adoção de estratégias e políticas de desenvolvimento e investimentos em infra-estrutura entre 1968 e 1980. A construção de Brasília e de um sistema rodoviário ligando-a ao núcleo dinâmico do país, permitiram a abertura e ocupação do cerrado, resultando, a partir da década de 70, na expansão da agricultura comercial (Alho e Martins *op. cit.*). Como resultado, 35% do cerrado tem sido convertido para agricultura, silvicultura ou pastagens (Cavalcanti 1999). Segundo Klink *et al.* (1994), baseado em estimativas feitas em 1991, 600000km² do cerrado tem sido convertido a uma taxa de 20000 km²/ano. Segundo Ratter e Dargie (1992) e Silva (1995c), estima-se que 37 e 50% do cerrado tenha sido modificado. Porém, este número é, provavelmente, superior a 50% e somente 0,7% da área total da região é protegida por parques nacionais ou estações ecológicas (Silva *op cit.*). Segundo os dados de Klink *et al.* (*op.cit.*), a taxa de conversão do cerrado excede, inclusive, a da Amazônia, que tem sofrido desmatamento a uma taxa entre 230000-415000km².

A variação genética entre e dentro de populações de animais e plantas silvestres, tem sido um assunto que tem despertado mais interesse na esfera evolutiva, ecológica e conservacionista e há várias razões para isto. A primeira é que populações pequenas e/ou isoladas provavelmente sofrem perda de alelos, deriva gênica, exibindo depressão pelo endocruzamento e, conseqüentemente, aumentando a probabilidade de extinção devido à estocasticidade genética. Segundo, a quantificação da diferenciação genética permite estimar o fluxo gênico entre subpopulações e, conseqüentemente, podem ser identificadas barreiras à migração, as quais não são detectadas através de outros métodos. Terceiro, medidas da genética populacional podem identificar "clades" que são suficientemente distintas garantindo a conservação quando as diferenças morfológicas ou comportamentais são pequenas ou variáveis (Rowe *et al.* 1998).

Na Biologia da Conservação, tem-se discutido como melhor preservar a variabilidade genética das espécies, assumindo que um aumento dessa variabilidade, aumenta a probabilidade de uma população sobreviver no decorrer do tempo ecológico e evolucionário. Estudos de simulação genética têm sugerido que, para reduzir apreciavelmente o endocruzamento e evitar que ocorra a erosão da diversidade genética em um curto intervalo de tempo, é necessária uma população mínima de 50 indivíduos. Pequenas populações perdem a diversidade genética através da deriva genética e endocruzamento. Ambos os processos levam ao aumento da homozigosidade, que, por sua vez, leva ao aumento da mortalidade entre jovens e reduz a fertilidade dos adultos (Ralls *et al.* 1983). Segundo dados secundários, para evitar a erosão da diversidade genética por longos períodos e manter uma alta heritabilidade, é necessária uma população mínima de 500 indivíduos (Simberloff 1988; Harris *et al.* 1987 in: Avise e Nelson 1989). Associada à carência de dados sobre o comportamento social de populações selvagens remanescentes, a ausência de dados sobre o status genético dessas populações tem dificultado e comprometido a viabilidade de programas de conservação, manejo e estudo de estrutura social.

O objetivo deste trabalho é contribuir para as bases científicas da conservação da avifauna do cerrado, examinando correlações entre a estrutura da paisagem e de populações, variação genética e riqueza da avifauna.

No nível populacional, investiguei se há variação genética significativa em populações de *Antilophia galeata*, que ocupam ambientes vulneráveis à fragmentação, bem como testei a ocorrência de possíveis efeitos genéticos resultantes de interferência antrópica recente.

Para comunidades, investiguei a relação entre a riqueza de espécies e as características da paisagem.

Os estudos de campo foram realizados com avifauna de mata de galeria para testar as seguintes hipóteses:

- A) a riqueza de espécies de matas de galeria é principalmente determinada pela área total e pelo grau de conservação do entorno da mata;
- B) a distância genética entre populações de *Antilophia galeata* é uma função da distância espacial.

Abordagem metodológica

Para testar a hipótese 1, fiz uma análise espacial da paisagem baseada em geoprocessamento, que forneceu dados sobre os principais tipos de ambientes, ambientes existentes no entorno das matas de galeria amostradas, área destas matas e distâncias entre elas. Foi realizado também o inventário de campo da riqueza de espécies em sete matas, e analisadas as correlações entre as variáveis área das matas, percentual de ambiente natural no entorno e riqueza de espécies.

Para a hipótese 2, utilizei os dados de análise espacial anteriormente citados e dados da caracterização do perfil genético de indivíduos de populações de *Antilophia galeata* obtidos a partir de técnicas de DNA *fingerprinting* com microsatélites e minisatélites. Os dados de variação dentro e entre populações foram correlacionados com as distâncias geográficas e geometria da paisagem. Nos Capítulos 2 e 3 apresento estes testes da hipótese 2, usando métodos independentes de análise genética.

Capítulo 1 - Análises Espaciais e a fragmentação das matas de galeria

Introdução

Modelos clássicos do efeito fundador sobre a variabilidade genética têm focalizado a redução da variância que segue a um acontecimento desta natureza (Goodnight 1988). Eventos de colonização geralmente acarretam severa redução no tamanho populacional e em muitos casos um isolamento permanente da população parental. Dentre as consequências genéticas do efeito fundador, pode-se incluir uma rápida alteração e perda da variação genética (Merila *et al.* 1996).

A diminuição no valor adaptativo médio de um caráter de populações em endocruzamento é conhecida como depressão por endocruzamento. Efeitos prejudiciais do endocruzamento são conhecidos há muitos séculos. Darwin foi o primeiro a salientar que adaptações de muitas plantas para garantir a fecundação cruzada pode ser entendida em termos da vantagem seletiva de se evitar a depressão por endocruzamento (Charlesworth e Charlesworth 1987; Brewer *et al.* 1990). Em muitas espécies em *outbreeding*, o endocruzamento, como por acasalamento entre irmãos-irmãs, resulta em rápida extinção de alta percentagem de linhagens. Fragmentação, que divide habitats anteriormente extensos, com populações contíguas resultando em isoladas, pode interromper o fluxo gênico e resultar em perda da diversidade genética (Blackwell *et al.* 1995). Presumivelmente, o endocruzamento aumenta o risco de extinção porque provoca a diminuição de componentes do *fitness* reprodutivo em espécies animais e vegetais naturalmente em *outbreeding* (Burgman *et al.* 1988; Frankham 1995).

A preservação da diversidade genética está no topo das prioridades em conservação biológica (Merola 1994). Entre fatores que levam uma população à extinção, podemos citar variação ambiental, efeitos estocásticos na demografia e problemas genéticos como endocruzamento, perda de variação adaptativa e ocorrência de mutações deletérias (Lynch e Gabriel 1990). Entender os riscos de extinção afetando populações é importante tanto em ecologia teórica quanto aplicada (Lande 1993). Extinção local estocástica e recolonização de espécies em ilhas ou em manchas de biótopos são componentes tanto da teoria da biogeografia de ilhas quanto da teoria metapopulacional (Hanski e Gilpin 1991;

y et al. 1996). A influência da área da ilha e isolamento no processo de ocupação forma, m, a base da teoria do equilíbrio das espécies. A migração reduz o risco de extinção e se que tem um papel significativo na redução das extinções locais nas populações leiras. Assim, espera-se que fragmentos isolados tenham taxas de extinção mais altas e recebam poucos colonizadores (Bellamy et al. 1996).

Existe interesse substancial na dinâmica das metapopulações: populações locais cuídas entre manchas de hábitat favorável (Spendelow et al. 1995). Levins (1969) desenvolveu o primeiro modelo formal e cunhou o termo metapopulação. Esta expressão entrou na literatura ecológica em 1970, referindo-se a uma população de populações (Hanski e Ovaskainen 1991) e podendo ser definida como um conjunto de populações no qual demes locais, conectadas pela dispersão (Smith et al. 1996), estão sujeitas a perdas frequentes ocasionam extinção e freqüente reposição, que levam à recolonização (Levins 1970; Hanski e Gilpin 1991; Smith et al. 1996). Um pressuposto importante é que todas as populações locais têm um risco significativo de extinção que faz com que a metapopulação esteja em um equilíbrio estocástico entre a extinção e recolonização local (Moilanen e Hanski 1998). Quando as taxas de colonização são suficientes para compensar as extinções, espera-se que a metapopulação persista por um período de tempo maior que qualquer uma das demes locais que a constitui (McCauley et al. 1995). As migrações são dependentes da distância e, assim, a configuração da matriz afeta a dinâmica metapopulacional (Hanski et al. 1999). Desta forma, a probabilidade de extinção local depende do tamanho da população via o tamanho da mancha, migração e, conseqüentemente, a colonização de manchas vazias é dependente da distância e a estrutura da matriz é explicitamente considerada (Moilanen e Hanski *ot. cit.*). Migração exerce um papel chave na coesão de sistemas metapopulacionais, tanto sob a perspectiva demográfica quanto genética (Olivieri et al. 1995). O termo migração às vezes é usado como sinônimo de fluxo gênico (Slatkin 1985), que é uma poderosa força homogeneizadora que age prevenindo divergência genética entre populações que podem perder tanto em conseqüência da deriva genética quanto por seleção (Pogson et al. 1995).

A ciência de tamanho mínimo de populações prosperou devido à necessidade de reconhecer-se por que exatamente as populações pequenas estão ameaçadas (Simberloff et al. 1998). A compreensão dos fatores que influenciam a persistência de pequenas populações é

dos principais desafios da conservação biológica (Stacey e Taper 1992). Shaffer (1981) introduziu o conceito de população mínima viável, um conceito estreitamente relacionado à análise de viabilidade populacional, um processo que avalia a probabilidade de extinção de uma população em escalas temporais (Boyce 1992; Gilpin 1996) e o definiu arbitrariamente, como a menor população isolada que tenha 95% de chance de sobrevivência por 100 anos ou 50% de chance de sobreviver por mais de 1000 anos, a despeito da demografia, estocasticidade demográfica e catástrofes ambientais (Burgman *et al.* 1988; Boyce *op. cit.*). Especialmente inquietante é a deteriorização na variabilidade genética de muitas espécies que normalmente têm baixa densidade e requerimentos espaciais altos (Harris e Allendorf 1989). As discussões sobre tamanho mínimo de população animal viável para persistir espacial e temporalmente têm baseado-se sobre modelos genéticos, demográficos e ecológicos (Walter 1990). Franklin (1980) e Soulé (1980) propuseram que $N_e=500$ (N_e = tamanho efetivo da população) é suficiente para a manutenção da variabilidade genética a longo prazo e este número foi prontamente adotado como base de manejo de populações selvagens e em conservação (Lande 1995).

Fragmentação de hábitat é um termo que tem sido usado com vários sentidos diferentes. Por definição, fragmentação de hábitat é um evento que cria um maior número de manchas de hábitat menores que o tamanho original. O termo é, ainda, comumente usado para descrever práticas humanas que destroem hábitats (Small e Hunter 1988; Bender *et al.* 1998). Quando uma área sofre distúrbios em consequência das atividades humanas, novos hábitats são criados. Concomitantemente com a criação de novos hábitats, alguns dos ambientes naturais são perdidos e os remanescentes tornam-se fragmentados (Schieck *et al.* 1995), processo que vem ocorrendo em todo o mundo (Wahlberg *et al.* 1996). Perda de hábitat e fragmentação estão entre as maiores ameaças para a conservação da diversidade biológica. Fragmentação de hábitat leva ao isolamento de populações pequenas que possuem altas taxas de extinção, reduzindo a diversidade biológica (Lacy 1987; Stacey e Taper 1992; Manski, *et al.* 1996; Hinsley *et al.* 1996; Rosenberg *et al.* 1997; Namba *et al.* 1999). As atividades humanas têm sido a maior causa de extinção de espécies em ilhas nos últimos 10000 anos (Frankham 1997 *apud* Olson 1989) através de super-exploração, perda de hábitat e introdução de novas espécies (Frankham 1997).

As atividades humanas, como derrubada de florestas e expansão das fronteiras agrícolas, estão destruindo os habitats naturais das comunidades terrestres a uma taxa alarmante (Green e Griffiths 1994; Wiens 1994; Moilanen e Hanski 1998). Como resultado da destruição, habitats nativos estão ficando mais fragmentados. Locais onde existiam ambientes naturais contínuos estão agora subdivididos em ilhas circundadas de ambientes adequados que têm sido modificados por humanos (Gaines *et al.* 1997; Bender *et al.* 1998), colocando todas as espécies em graus variados. Estes fatores vêm sendo preocupação crescente em biologia da conservação (Haila *et al.* 1993; Burkey 1995). Há dois efeitos principais da fragmentação do habitat: destruição de ambientes adequados em larga escala e isolamento dos fragmentos restantes (Bowers *et al.* 1996). Tem havido considerável interesse em modelar a dinâmica espacial das populações em ambientes fragmentados, obtendo uma maior compreensão sobre como o padrão espacial influencia os processos ecológicos. Recentemente tem havido um maior interesse em aplicar estes modelos em estratégias de conservação, principalmente para se determinar as consequências da fragmentação de habitat em populações residentes (Bender *et al.* 1998). Uma população local pequena e isolada é uma forte candidata à extinção mas a população tem chances de sobrevivência em uma rede de habitats conectados por dispersão (Caughley 1994; Moilanen e Hanski 1998), persistindo como uma metapopulação (Wade e McCauley 1988; Wahlberg *et al.* 1996).

Neste capítulo, testamos a hipótese de que a riqueza de espécies de matas de galeria é determinada, principalmente, pela área total e pelo grau de conservação do entorno da mata (comparação de ambientes naturais x antrópicos).

Metodologia

Descrição das áreas amostradas

Todas as áreas selecionadas para a amostragem são matas de galeria, sendo duas delas contidas dentro dos limites do DF e uma delas no estado de Goiás.

Córrego do Capetinga: está situada nas coordenadas $15^{\circ}57'32''S$ e $47^{\circ}56'33''W$. É uma área de aproximadamente 150 ha, pertencente à UnB, localizada na Fazenda Água Limpa (FAL). A reserva possui uma área de aproximadamente 2660 ha de reserva de cerrado (Cavalcanti e Fontes 1988) e tem como áreas vizinhas a Estação Ecológica do IBGE e o Jardim Botânico de Brasília. Todas estas áreas em conjunto formam um contínuo de Cerrado com mais de 3000 hectares. Por estarem localizadas dentro de uma APA (Área de Proteção Ambiental), esta mata razoavelmente bem preservada, embora existam invasões de capim em algumas trilhas e, eventualmente, sofra a ação de queimadas (observação pessoal).

Mata de galeria do Jardim Botânico: situa-se nas coordenadas $15^{\circ}53'06''S$ e $47^{\circ}48'43''W$ e possui 225 ha. Está dentro do complexo FAL/IBGE/JP tendo, também, seu entorno bastante bem preservado como demais matas de galeria situadas dentro de unidades de conservação.

Córrego Mato Seco: está situada nas coordenadas $15^{\circ}55'06''S$ e $47^{\circ}56'35''W$. Possui aproximadamente 91 ha e está, por um lado, delimitada pelo Setor de Mansões Park Way e, por outro, por uma área residencial/chácaras conhecida como Vargem Bonita. Muitas destas chácaras são destinadas a plantações de hortaliças. Este local, que já vinha sofrendo degradações devido à urbanização crescente, tem sido mais intensamente urbanizado nos últimos anos com algumas invasões do seu interior em que alguns moradores têm usado também a mata como área de lazer (observação pessoal).

Córrego Sobradinho: está localizada na cidade satélite que leva o mesmo nome, nas coordenadas $15^{\circ}39'06''S$ e $47^{\circ}48'17''W$. Embora seja a maior área amostrada (1333 ha), é também a mais degradada. O córrego apresenta forte odor característico de locais onde existem esgotos, além do odor da Estação de Tratamento da CAESB nas proximidades. Existe no interior da mata resíduos de lixo e trilhas. Devido à proximidade com setores residenciais

de Sobradinho, está fortemente impactada e com áreas urbanizadas no seu entorno, dentre outras pressões já citadas.

Córrego Bananal: está localizada nas coordenadas 15°57'50"S e 47°57'08"W. Possui aproximadamente 742 ha. É uma mata bem preservada, com poucas trilhas de humanos e muitas trilhas de animais. Possui ainda mamíferos de médio porte como o porco do mato. Embora seja uma mata bem preservada foi observada a presença de invasões de capim no seu interior. Por estar inserida no Parque Nacional de Brasília, possui todo o seu entorno atualmente bem preservado.

Córrego d'Água: está localizada nas coordenadas 15°55'57"S e 47°58'76"W. É uma pequena mata em galeria com aproximadamente 100 ha de extensão onde existem pequenos córregos e nascentes. Pertence à Fundação ZooBotânica. Seu entorno ainda é razoavelmente preservado por estar em uma área um pouco mais distante do Plano Piloto e ainda não está intensamente urbanizada.

Córrego Vermelho: esta mata pertence à EFLEX (Estação Florestal e Experimental) de Silvânia, município localizado a aproximadamente 60 km de Goiânia. A EFLEX, por sua vez, pertence ao IBAMA. A mata está situada a 15°38'55"S e 48°31'58"W e possui área de 293 ha. Apesar de estar a apenas 7 km, aproximadamente, de Silvânia, por estar dentro de uma área de reserva, protegida pelo IBAMA, está razoavelmente bem preservada. Neste local são desenvolvidas atividades de educação ambiental. No seu entorno existem fazendas, favorecendo, até certo ponto, seu estado de preservação.

Córrego Fundo: Está localizado nas coordenadas 15°54'26"S e 47°59'56"W, é uma área que pertence à EMBRAPA e possui 494 ha de mata. É um local que até o período das coletas estava razoavelmente bem preservado, embora existam algumas trilhas e sinais de visitação. Apesar da forte urbanização nas proximidades, fato este que pode comprometer a qualidade da mata, como ocorrido no Córrego Mato Seco que tem sido acompanhado desde 1994, quando foram feitas coletas para dissertação de mestrado.

Riqueza de espécies

Em cada uma das matas de galeria citadas no item "Descrição das áreas mostradas", foi aberta uma trilha com aproximadamente 150m, no interior da mata. Foi instalada uma bateria de 10 redes de captura ornitológica (12 m) com malha 36mm. A cada dia de coleta as redes foram abertas às 6:00 e assim mantidas por seis horas consecutivas. Após o terceiro dia de coleta, uma nova trilha foi aberta a uma distância mínima de 200 m do local inicial visando otimizar as coletas uma vez que ocorre uma queda significativa na taxa de capturas até o terceiro dia. Cada indivíduo capturado foi identificado até espécie e anilhado (este procedimento visando estudos futuros). Em fichas apropriadas foram anotados os dados de cada exemplar, como local e horário de captura, presença/ausência de ectoparasitas, condições da plumagem, sexo quando existia dimorfismo, cor da íris, presença/ausência de placa incubatória, captura/recaptura e outras informações de interesse ornitológico que possam vir a ser utilizadas no futuro.

Análise de paisagem - Fonte de dados

Foram usadas as imagens de satélite Landsat TM referentes ao DF (ano 1995) e a base 221 ponto 072 de 1997 (cedida pelo Prof. Ivanilton José de Oliveira, do Departamento de Geografia da UFG), esta última por conter a área amostrada próxima ao município de Silvânia. Os arquivos com formato original do INPE foram convertidos para o formato TIFF através do software L2TIFF.EXE e, deste formato, importados para o software Idrisi para Windows, cedido pelo Dr. Ricardo Bonfim Machado, que está sendo usado para as análises espaciais. Foi montada uma composição de falsa cores RGB, pois esta composição de cores facilita a visualização dos vários ambientes em relação à imagem em tons de cinza. Uma vez que para o Rio Vermelho só estavam disponíveis as bandas 3, 4 e 5, estas mesmas bandas foram usadas também para a imagem do DF e são, geralmente, as bandas mais usadas nos processos de análises espaciais de vegetação, por conterem maior quantidade de informação em relação às demais. Esta escolha geralmente é confirmada pela Análise de Componentes Principais usada para seleção das melhores bandas e que havia sido feita com a imagem do DF. Os resultados desta composição estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente para o DF e para a região de Silvânia. Estas duas imagens representam janelas selecionadas

nas imagens originais, que abrangiam as áreas de amostragem, com a finalidade de diminuir o tamanho dos arquivos e otimizar o tempo de análise dos dados. A partir da imagem apresentada na Figura 1, foram previamente selecionados seis fragmentos de mata de galeria dentro da área do Distrito Federal (DF), em função do tamanho e grau de isolamento. Foi selecionado também um fragmento externo ao DF (Município de Silvânia – GO), usando os mesmos critérios de seleção prévia através de imagens de satélite, para comparação do padrão encontrado nas demais áreas (Figura 2).

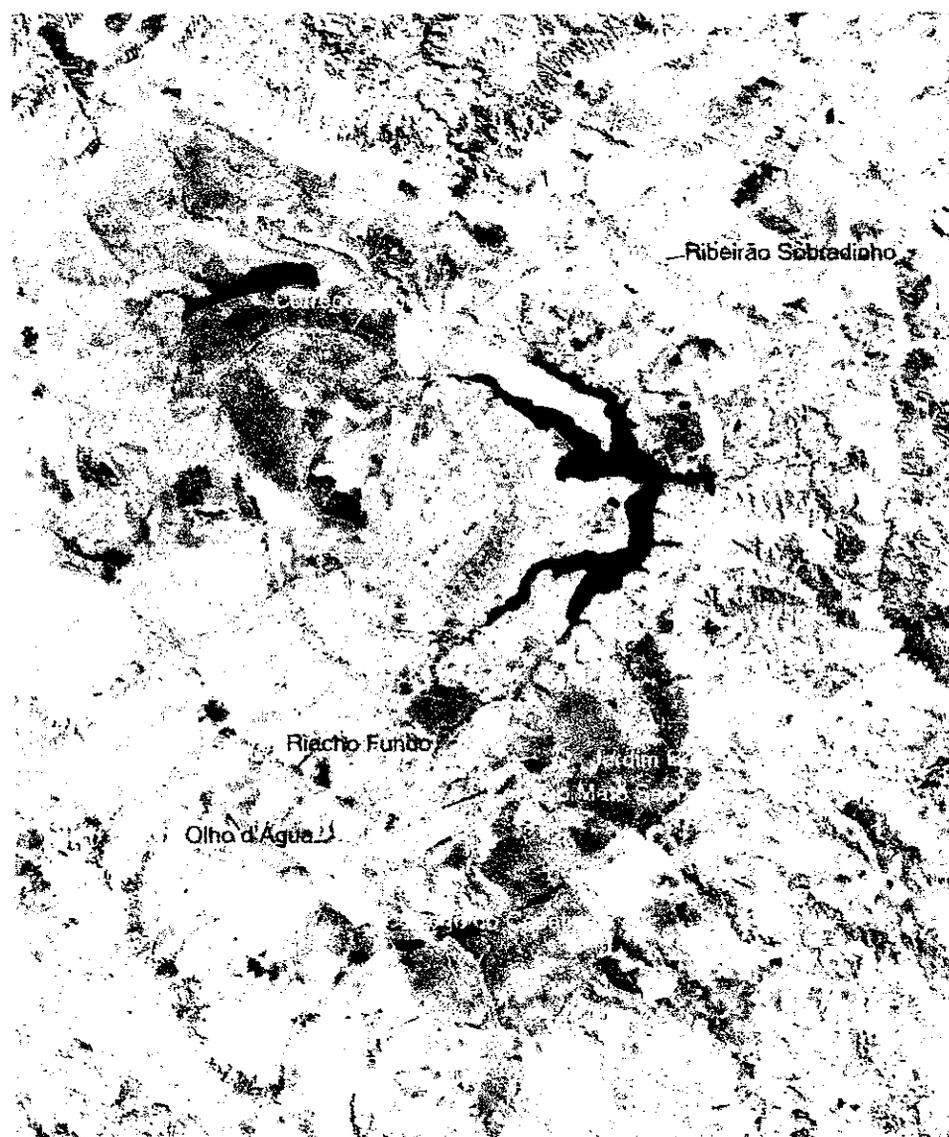


Figura 01 - Composição de falsas cores feita a partir das bandas 3, 4 e 5 das imagens Landsat TM abrangendo a área foco das coletas no Distrito Federal

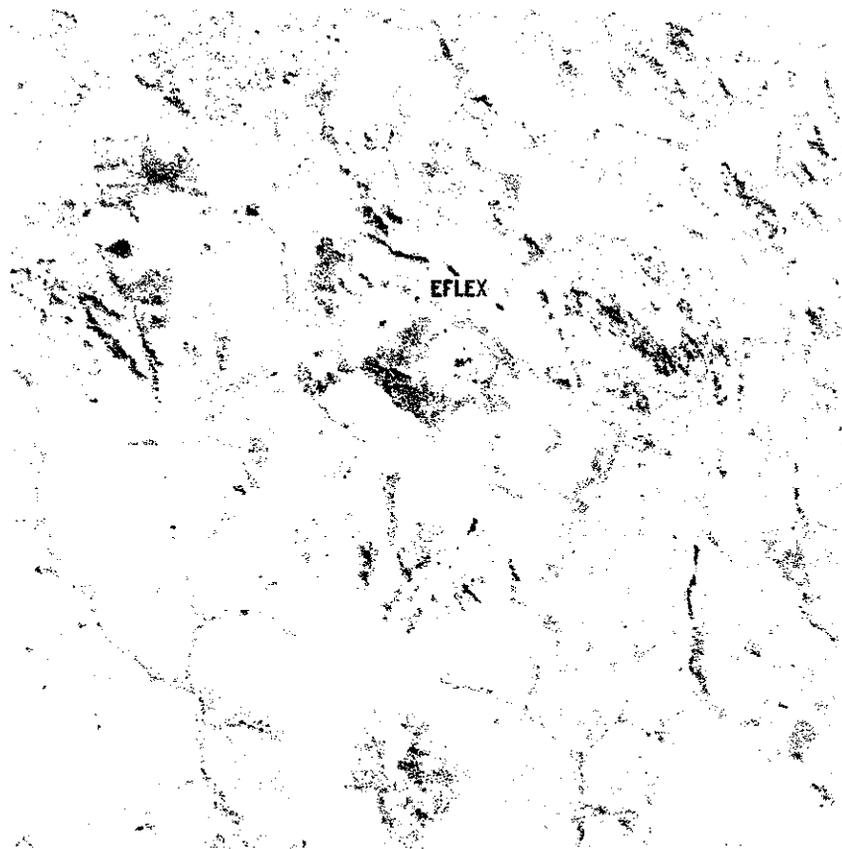


Figura 02 – Composição de falsas cores feita a partir das bandas 3, 4 e 5 das imagens Ladsat TM abrangendo a área foco das coletas no estado de Goiás.

Identificação dos fragmentos amostrados

Para os cálculos envolvendo os polígonos relativos às áreas amostradas, foi feita a digitalização interativa dos fragmentos, criando arquivos em formato vetorial. Para a conversão do formato vetorial para o formato matricial utilizado pelos sistemas de informação geográfica (SIGs)

Uma vez criados os arquivos matriciais dos fragmentos amostrados, foi feita a contagem do número de células em cada um dos polígonos que representam as matas de galeria. A conversão para área foi feita sabendo-se que cada pixel tem 30m em cada lado e que um hectare tem 10000m.

Classificação dos habitats de cerrado

Para a classificação das imagens, foram primeiramente criados sítios de treinamento, através da digitalização *on screen*. Estes sítios são polígonos delimitando áreas equivalentes a valores dos pixels sobre os quais o software efetua a classificação dos vários ambientes. Em uma segunda etapa estes polígonos são associados aos tipos de ambientes em questão (água, campo, mata de galeria, cerrado, áreas queimadas, áreas urbanizadas, áreas degradadas). Após esta associação, através da comparação dos valores máximo, mínimo e médio, foi verificado se não estava ocorrendo sobreposição de mais de um tipo de ambiente. Caso ocorresse esta sobreposição de valores, estes ambientes foram considerados como um único tipo de ambiente. Na classificação foi usado o método *Minimum Distance to Mean*.

Após a obtenção da imagem classificada, foi feita a análise do entorno, com a finalidade de determinar os tipos de ambientes que predominam nas adjacências dos fragmentos e, portanto, inferir o isolamento dos mesmos. Esta análise foi feita da seguinte maneira: primeiramente, a partir da imagem digitalizada dos polígonos que representaram os fragmentos, foi criada uma imagem que representava as várias classes de distância em relação aos fragmentos amostrados. Foi feita, sobre esta imagem, uma reclassificação para gerar uma imagem onde todos os pixels a uma distância menor que 540m ficassem com o valor 0. Esta distância de 540m foi arbitrada por ser, aproximadamente, a metade da distância entre as duas matas mais próximas (Olho d'Água e Riacho Fundo). Esta imagem foi usada como uma máscara para gerar imagens delimitando o entorno dos fragmentos. A máscara foi sobreposta à imagem classificada com os vários tipos de ambiente, gerando a imagem final para análise do entorno. Foram elaboradas as tabelas onde constam o número de pixels em cada ambiente do entorno de cada fragmento.

Foi calculado o coeficiente de correlação entre riqueza de espécies e o percentual de ambiente natural no entorno dos fragmentos amostrados, entre espécies de mata e entre área do fragmento. O resultado do cálculo do coeficiente de correlação foi testado quanto à sua significância, segundo (Costa-Neto 1977), considerando-se um valor de $\alpha = 0,1$ e 5 graus de liberdade.

Foi feita uma estimativa das classes de tamanho dos fragmentos de matas de galeria na área central do Distrito Federal, abrangendo 53% das colunas e 62% das linhas da

imagem original abrangendo todos os locais de coletas. A análise não foi estendida a todo o DF pois o número de fragmentos existentes ultrapassa a capacidade do software utilizado, de 2000 fragmentos ou grupos de pixels. Em uma segunda etapa, foi isolada somente a classe que diz respeito às matas de galeria, em que a classe relativa a elas receberam todas um mesmo valor e as demais classes receberam valor = 0. Posteriormente, foi atribuído um valor identificador a cada fragmento e em uma última etapa foi contado o número de células em cada um deles com posterior conversão para hectares.

A estes valores de fragmentação, foram associados ainda dados de abundância de *Antilophia galeata* obtidos na dissertação de mestrado "Dinâmica de Comunidades de Insetos em Fragmentos de Matas de Galeria" (Ferreira 1995).

Medidas de distância e resistência ao deslocamento

Para efetuar a análise do deslocamento provável de *Antilophia galeata*, foi usada metodologia que se segue. Com base na imagem já classificada com os principais tipos de ambientes encontrados no DF, foi criada uma tabela (Tabela 1) de fricção em que foram atribuídos valores de níveis de dificuldade de deslocamento nos vários ambientes que compõem a paisagem analisada. Estes valores foram atribuídos com base no fato de ser, *A. galeata*, uma espécie típica de mata de galeria que pode ser eventualmente encontrada no cerrado e pode deslocar-se, em curtas distâncias, através de áreas abertas (3 a 4 km) (Paulo de Tarso Z. Antas comunicação pessoal). Desta forma, foi criada a tabela de fricção que pode ser observada abaixo:

Tabela 01 - Valores de dificuldade de deslocamento (fricção) atribuídos aos vários ambientes encontrados no DF.

Ambiente	Dificuldade de deslocamento (fricção)
Água	1000
Ambiente urbano 1	1000
Ambiente urbano 2	1000
Área queimada	200
Ambiente degradado	200
Campo	100
Cerrado	10
Mata de galeria	1

O valor 1 é o valor padrão e significa que na mata de galeria não existe dificuldade para deslocamento desta espécie. Os valores foram escalonados segundo a dificuldade suposta, baseado no hábitat preferencial, para que *A. galeata* atravessasse ou percorra vários ambientes. O valor 1000 para 'água' foi estipulado pensando-se no Lago Paranoá, sendo considerado uma barreira intransponível, assim como demais ambientes que receberam o mesmo valor. 'Área queimada' recebeu o valor 200, pois este ambiente é perceptível na imagem de satélite em suas fases iniciais em que o solo está exposto. Nas fases posteriores, pode ser confundida com áreas degradadas, campo, e assim sucessivamente, até a sua recuperação. O ambiente urbano foi subdividido em duas classes por serem ambas discerníveis, na imagem de satélite, em função da densidade da urbanização. O ambiente degradado diz respeito a áreas alteradas, geralmente por plantações de baixo porte. Após esta escala ter sido criada, estes valores foram associados à imagem de satélite classificada e foi elaborado um mapa de custo (ou dificuldade) de deslocamento. Finalmente, foram criadas rotas que traçam a rota de menor custo de deslocamento que seria o trajeto, em potencial, que indivíduos da espécie em questão, *Antilophia galeata*, teria utilizado para se deslocar entre os pares de áreas. Após ter sido determinado este trajeto, foi contado o número de células que estão envolvidas neste percurso, sendo este valor, multiplicado por 30 metros que é a dimensão de cada pixel da imagem Landsat TM.

Foi feito o cálculo da distância entre todas as áreas amostradas. Para tanto, foi feita a medição da distância entre cada par de áreas, em centímetros, no mapa "Distrito Federal do Brasil - Mapa Imagem Multitemporal" (dos Anjos 1996). Conhecendo-se a escala 1:50000 foi possível calcular as distâncias ($X \text{ centímetros} \times 1,5 \text{ km}$). Para cálculo da distância entre a mata da Rio Vermelho e demais matas, foi usado o mesmo processo porém usando o mapa "Mapa Informativo do Estado de Goiás", na escala 1:1000000.

Resultados

Riqueza de espécies

Foi feito um esforço mínimo de 360 horas/rede. Com esta metodologia, foram obtidos 1181 registros nas oito áreas amostradas. O número de capturas por área está na Tabela 2 e, como podemos observar, as áreas Rio Vermelho (38), Córrego do Capetinga (36), Córrego Riacho Fundo (36) e Olho d'Água (34) apresentaram uma maior riqueza total de espécies em relação ao Córrego Mato Seco (25), Jardim Botânico (27), Ribeirão Sobradinho (27) e Córrego Bananal (29). Esta tabela apresenta também a riqueza de espécies nos seis primeiros dias de coleta por ser este o menor esforço amostral e permitir, portanto, comparações entre áreas.

Com este esforço amostral, foram capturadas 68 espécies diferentes nas 8 áreas amostradas. A lista de espécies apresentando o número total de espécies capturadas e o número de espécies por área está no anexo do capítulo, na Tabela 3.

Como pode ser observado nos resultados do cálculo do tamanho dos fragmentos, a maior área é a da mata de galeria do Ribeirão Sobradinho, que é praticamente o dobro da segunda área na escala de tamanho, e a menor a do Córrego Mato Seco.

Tabela 02 – Número de capturas, área dos fragmentos, esforço amostral, riqueza total de espécies, de espécies dependentes de matas de galeria do DF e nos 6 primeiros dias de amostragem.

Fragmento	Número de capturas	Área	Esforço amostral	Riqueza total de espécies	Riqueza de espécies de mata	Riqueza nos 6 primeiros dias
Ribeirão Sobradinho	105	1332,90	540	27	8	24
Córrego Bananal	103	742,56	540	29	10	29
Riacho Fundo	150	494,37	360	36	15	36
Rio Vermelho	155	293,00	540	38	19	25
Jardim Botânico	112	225,36	360	27	10	27
Córrego do Capetinga	169	149,13	540	36	16	27
Olho d'Água	195	100,71	540	34	14	25
Córrego Mato Seco	98	91,26	540	25	7	21
Total	975

Identificação dos habitats do cerrado

A imagem gerada pela classificação (Figura 3) mostrou um padrão bastante semelhante ao da imagem original, na análise visual. Porém alguns grupos de pixels podem ter sido classificados como tipos de ambientes que não correspondem aos ambientes originais, devido a possíveis sobreposições do valor atribuído a cada um deles. Assim, no Parque Nacional, por exemplo, existem locais onde o ambiente classificado é considerado como ambiente urbano. Certamente nestes locais existe, por exemplo, solo exposto cujos pixels que os representam possuem valores similares aos dos ambientes urbanos. A proporção dos vários ambientes do Distrito Federal estão listados na Tabela 4.

Tabela 04 – Proporção dos vários ambientes existentes no DF levantados através de dados de sensoriamento remoto da imagem do satélite LANDSAT TM classificada (imagem de 95).

Ambiente	Valor % no DF
Urbano	0,2789
Degradado	0,2128
Cerrado	0,1910
Campo	0,1831
Mata de galeria	0,0585
Áreas queimadas	0,0576
Água	0,0181
Total	1,0000

De acordo com os resultados da Tabela 4 e não levando em consideração a classe 'água', uma vez que estamos analisando ambientes terrestres, a classe mais abundante e a de ambientes urbanos e as menos frequentes foram as matas de galeria e áreas queimadas.



Figura 03 - Imagem gerada através da classificação supervisionada da imagem Landsat TM de 1995 que abrange o Distrito Federal usando-se o método *Minimum Distance to Mean* sendo, vermelho = áreas queimadas; verde = matas de galeria; marrom = campo; cinza = áreas urbanizadas; pardo = áreas degradadas; azul = água; verde-acinzentado = cerrado.

A imagem gerada para a análise do entorno está na Figura 4. Os resultados dos cálculos de número de células e valores absolutos estão no anexo. A Tabela 5 apresenta os valores percentuais dos vários tipos de ambiente no entorno dos fragmentos.

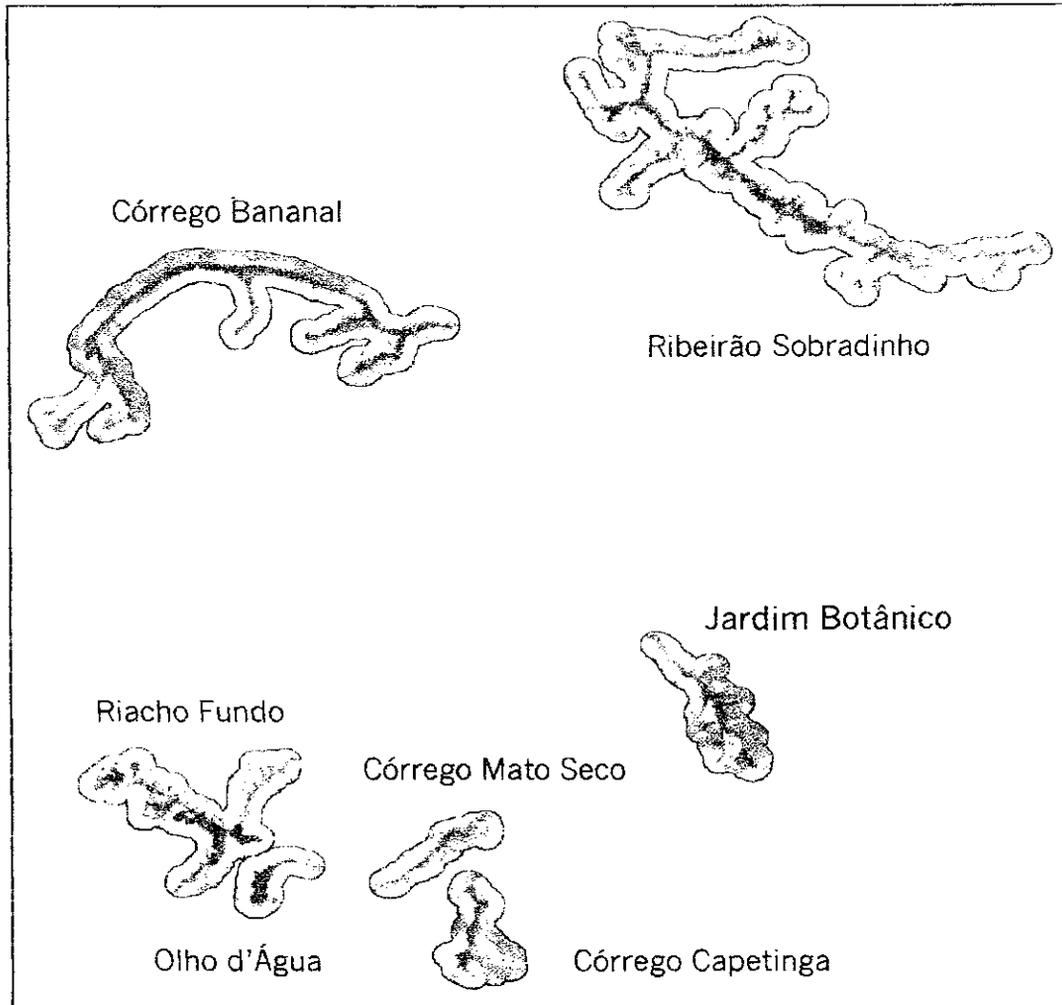


Figura 04 - Delimitação do entorno das matas de galeria amostradas no DF considerando-se uma distância de 540 m.

Tabela 05 – Valores percentuais dos vários tipos de ambientes no entorno dos fragmentos amostrados.

	Sobradinho	Bananal	Capetinga	Riacho Fundo	Rio Vermelho	Olho d'Água	Jardim Botânico	Mato Seco
degradado	44,34	3,42	12,53	33,30	17,14	49,20	3,21	16,76
urbano 1	18,24	7,37	11,84	19,85	34,60	11,68	8,08	29,33
urbano 2	8,04	0,58	0,65	5,10	0	1,92	0,81	2,71
degradado	13,54	53,37	38,12	16,57	28,12	16,85	35,61	23,00
degradado	12,82	33,66	36,59	16,72	20,14	7,53	50,51	26,27
degradado	2,90	1,43	0,27	7,84	0	12,80	1,64	1,89
degradado	0,12	0,17	0	0,62	0	0,02	0,14	0,04
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Esta tabela nos permite observar que no entorno da mata de galeria do Ribeirão Sobradinho, o ambiente que apresenta maior proporção é o degradado com um percentual de 44,34%. Se somarmos os quatro tipos de ambientes alterados (queimada, urbano 1, urbano 2 e degradado), teremos um percentual de 73,52% de ambiente alterado no entorno desta mata. Os ambientes naturais juntos (cerrado e campo) somam 26,36%.

Observando os dados relativos ao Córrego Bananal, é possível notar que o ambiente predominante é o campo. Os ambientes naturais em conjunto (cerrado e campo) somam 87,03%. Por outro lado, os ambientes alterados somados representam um total de 12,97%. Para a mata de galeria do Córrego Mato Seco, os ambientes alterados representam 79% e os ambientes naturais somam 21%. Embora este valor indique proporções diferentes entre as duas situações, porções da própria mata de galeria estão sendo consideradas como cerrado devido à degradação da mata nestes locais. Este fato também ocorre em locais onde, no passado existiram conexões entre sistemas de matas de galeria. Atualmente estes sistemas se encontram com graus variáveis de continuidade.

Os dados que se referem à mata de galeria do Córrego do Capetinga, indicam que os ambientes naturais representam um total de 74,71% e os ambientes alterados representam 25,29%. Na mata de galeria do Riacho Fundo, constata-se que os ambientes naturais representam 33,29% e que a somatória dos vários tipos de ambientes alterados

representam 66,09%. Esta mata ainda possui uma composição de espécies bastante rica (36 p), considerando-se o esforço amostral e comparações com outras áreas já urbanizadas, como córrego Mato Seco e ribeirão Sobradinho.

O entorno da mata de galeria do Olho d'Água, possui ambientes naturais totalizando 24,38% da área e os ambientes degradados somam 75,6%. Combinando estes dados com o conhecimento de campo do local, ao classificar a imagem as pastagens também foram consideradas como áreas degradadas, fato este responsável pelo valor de 49,20% encontrado para este tipo de ambiente. A mata de galeria do Jardim Botânico tem como ambiente mais frequente no seu entorno o cerrado (50,51%) que, juntamente com o campo (35,61) representam 86,12% de ambientes naturais.

Finalmente, os resultados da análise do entorno da mata de galeria da Rio Vermelho, mostram que existe um equilíbrio entre ambientes alterados e naturais, sendo que estes primeiros, englobando ambiente urbano e degradado, somaram 51,74% e aqueles naturais, 48,26%.

A Tabela 6 nos fornece um resumo do percentual de ambientes naturais e alterados nos vários fragmentos amostrados.

Tabela 06 – Apresentação resumida dos valores percentuais dos ambientes naturais e alterados no entorno dos vários fragmentos amostrados.

Área	Ambientes naturais	Ambientes alterados
Córrego Bananal	87,03	12,97
Jardim Botânico	86,12	13,88
Córrego do Capetinga	74,71	25,29
Córrego Mato Seco	49,27	50,73
Olho d'Água	48,4	51,6
Rio Vermelho	48,26	51,74
Riacho Fundo	33,29	66,71
Ribeirão Sobradinho	26,36	73,64

Calculando-se o coeficiente de correlação entre riqueza de espécies nos vários fragmentos e o percentual de ambiente natural nos entornos destas áreas, foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,75 ($\alpha = 0,1; t_{\text{calculado}} = 2,36; t_{\text{crítico}} = 2,02$). Esta correlação é, portanto, positiva e significativa estatisticamente, ou seja, fragmentos com o entorno mais preservado apresentam uma maior riqueza de espécies. A mata de galeria do Riacho Fundo compôs o conjunto analisado por ser uma área em que as alterações do entorno se limitaram somente nos últimos 3 ou 4 anos, segundo moradores do local, e certamente não afetou a comunidade de aves da área (observação pessoal) uma vez que aí tivemos uma alta riqueza de espécies. Além do mais, no período das coletas, houve uma grande presença de formigas, atraindo uma grande quantidade de aves, tornando os dados, quanto a este aspecto, tendenciosos, pois nos outros locais tal fato não ocorreu. O cálculo do coeficiente de correlação entre entorno e riqueza de espécies de mata apresentou um valor de 0,06 ($\alpha = 0,1; t_{\text{calculado}} = 0,13; t_{\text{crítico}} = 2,02$), portanto não significativo.

Não foi encontrada correlação significativa (0,11) entre a área do fragmento e a riqueza de espécies de espécies ($\alpha = 0,1; t_{\text{calculado}} = 0,25; t_{\text{crítico}} = 2,02$). Não foi encontrada correlação significativa (-0,35) entre a área do fragmento e a percentagem de ambiente natural no entorno ($\alpha = 0,1; t_{\text{calculado}} = 0,67; t_{\text{crítico}} = 2,02$).

Efeito da fragmentação das matas de galeria sobre *Antilophia galeata*

Analisando os dados da dissertação de mestrado "Dinâmica de Comunidades de Aves em Matas de Galeria do DF", no que diz respeito à abundância relativa de *Antilophia galeata*, nos vários fragmentos amostrados em 94/95, através de censo com pontos com raio de 10m, vemos que sua abundância relativa declina com a redução da área, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Na área controle (Córrego Capetinga – o maior fragmento) para as análises da dissertação de mestrado, foi encontrada a maior abundância relativa desta espécie. À medida que ocorre um decréscimo de tamanho nestes fragmentos, ocorre também uma redução da abundância relativa até que, no menor dos fragmentos (2,9 ha), não é mais detectada esta espécie. Ao fazer uma análise de correlação, foi encontrado um $r=0,94$ ($t_{\text{cal}}=4,97; t_{\text{crit}}=3,18$;

$r=0,05$), indicando que quando maior a área, maior a densidade de *A. galeata* nas matas de galeria analisadas.

Tabela 07 – Dados sobre área e abundância relativa de *Antilophia galeata* em vários fragmentos de matas de galeria do Distrito Federal. Dados da dissertação de mestrado “Dinâmica de Comunidades de Aves em Matas de Galeria do DF”, coletados em 94/95.

Espécie	Fragmento									
	Córrego do Capetinga		Córrego Mato Seco		Ribeirão Gama		Córrego Mata Gado		Córrego Canjerona	
	Área	A.Rel	Área	A.Rel	Área	Rel	Área	Rel	Área	Rel
<i>Antilophia galeata</i>	149,1	33,9	91,3	23,6	62,9	25,8	5,9	4,1	2,3	0

A partir dos dados gerados pela classificação para isolar a classe das matas de galeria, foi possível estimar que existem, na fração analisada do DF, 12692 fragmentos de matas de galeria ou ambientes semelhantes a elas.

Com os dados deste levantamento, foi possível calcular o número de fragmentos existentes com tamanhos semelhantes aos das matas inventariadas em 94/95 e sobre as quais existem dados de abundância relativa para *Antilophia galeata*. Esta informação está na Tabela 8. Podemos observar que 92,88% dos fragmentos de matas de galeria existentes na fração analisada do DF, têm área inferior ou igual a 2,34 há e que somente 0,08 das matas de galeria destes locais possuem área maior que 150 ha, sendo, em valor absoluto igual a 10 localidades.

Tabela 08 – Número de fragmentos existentes nas classes de tamanho correspondentes às matas de galeria inventariadas em 94/95..

Classe de tamanho do fragmento (ha)	Frequência em uma porção do DF	
	Absoluta	Relativa
≤ 2,34	11789	92,88
2,4 a 5,9	499	3,93
6 a 62,9	372	2,93
63 a 91,26	10	0,08
91,35 a 149	12	0,10
> 150	10	0,08
Total	12692	100,00

Medidas de distância e resistência ao deslocamento

O resultado do cálculo de distância entre as áreas se encontra na Tabela 9, Anexo. Podemos notar que as maiores distâncias estão entre Sobradinho e Capetinga, Mato Seco, Olho d'Água e Riacho Fundo. Considerando-se o conjunto de áreas amostradas no DF, Sobradinho está mais isolada, também por distância, em relação às demais.

Podemos perceber, ainda, que as áreas mais próximas são o Riacho Fundo e Olho d'Água, Olho d'Água e Mato Seco e Capetinga e Mato Seco.

Tabela 09 - Distância (km) entre as áreas amostradas, tomadas duas a duas.

	Sobradinho	Capetinga	Mato Seco	Olho d'Água	Jardim Botânico	Riacho Fundo	Rio Vermelho
Bananal	9,75	21	19,05	20,1	16,05	18,75	118
Sobradinho		29,25	27,3	31,05	18,0	31,05	140
Capetinga			1,65	5,55	10,5	7,35	102
Mato Seco				2,4	9	4,2	103
Olho d'Água					13,95	1,05	90
Jardim Botânico						15,45	108
Riacho Fundo							90

A Figura 5 permite visualizar as rotas de deslocamento potencial entre os vários fragmentos estudados geradas pela análise de custo para o deslocamento que tem como objetivo determinar a rota mais fácil e curta entre dois pontos. A Tabela 10 permite observar os valores encontrados para as distâncias potencialmente percorridas por *A. galeata* entre os pares de áreas amostradas em possíveis processos de dispersão. Quanto a este deslocamento, as rotas mais longas seriam entre Riacho Fundo e Sobradinho, Olho d'Água e Sobradinho, Mato Seco e Sobradinho, Capetinga e Sobradinho e Bananal e Capetinga.

Tabela 10 - Distâncias (km) percorridas no deslocamento potencial de *Antilophia galeata* entre fragmentos de matas de galeria do DF.

	<i>Sobradinho</i>	<i>Capetinga</i>	<i>Mato Seco</i>	<i>Olho d'Água</i>	<i>Jardim Botânico</i>	<i>Riacho Fundo</i>
<i>Bananal</i>	25,02	41,40	38,10	35,70	47,64	35,37
<i>Sobradinho</i>		41,55	40,23	46,38	36,21	50,10
<i>Capetinga</i>			3,18	17,04	13,08	17,10
<i>Mato Seco</i>				5,22	13,68	10,59
<i>Olho d'Água</i>					21,18	1,17
<i>Jardim Botânico</i>						25,74

A matriz ambiental alterada, e os tipos de ambientes entre os vários fragmentos amostrados com níveis de dificuldade diferentes para os deslocamentos tornam as rotas potenciais de migração, ou deslocamento, bem maiores que as distâncias lineares. Em valores absolutos, os maiores acréscimos foram entre as matas de galeria do Córrego do Capetinga e Ribeirão Bananal, Córrego Mato Seco e Córrego Bananal e Riacho Fundo e Ribeirão Sobradinho. Somente para as matas de galeria do Córrego Mato Seco e Córrego do Capetinga, o valor foi praticamente insignificante. Para as demais áreas, variou de 42,05% entre o Córrego do Capetinga e do Ribeirão Sobradinho, a 207,02% entre o Olho d'Água e o Córrego do Capetinga.

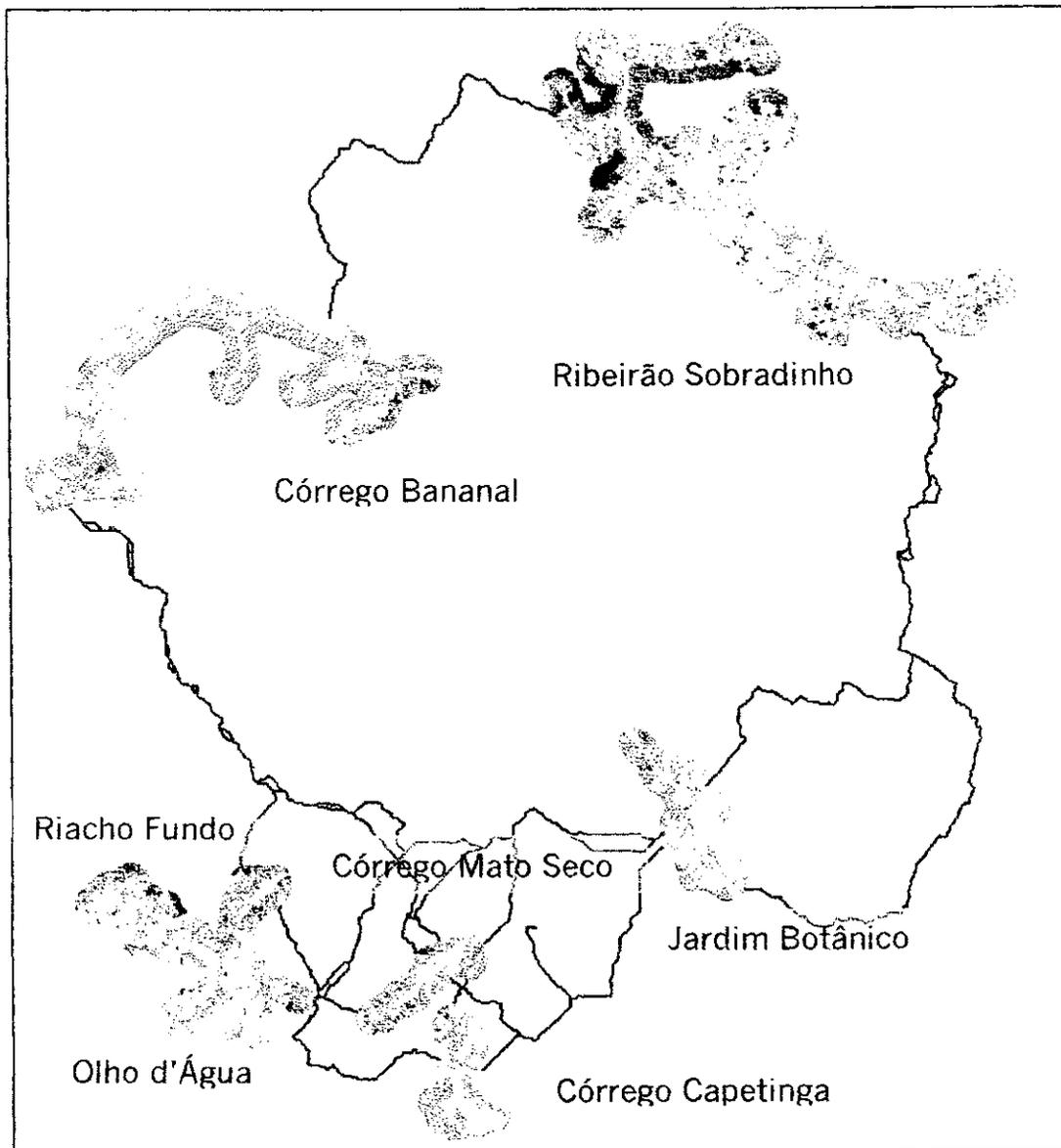


Figura 05 - Deslocamento potencial de *Antilophia galeata* entre os fragmentos amostrados.

Discussão

Como foi observado, as áreas do Córrego Bananal (29), Córrego do Capetinga (27) e Jardim Botânico (27) apresentaram uma maior riqueza de espécies em relação ao Ribeirão Sobradinho (24) e Córrego Mato Seco (21), respectivamente, considerando-se a riqueza total de espécies nos seis primeiros dias de coletas com redes de captura ornitológica. Quando da coleta para a dissertação de mestrado, onde foram abordadas questões sobre comunidades de aves em fragmentos de matas de galeria do DF, a variável mais importante que aparentemente teve papel mais relevante, influenciando positivamente a riqueza de espécies, foi o tamanho do fragmento, com uma forte correlação (índice de correlação de Pearson (r), tanto para espécies exclusivamente de matas ($r = 0,91$; $t = 3,80$; $p < 0,05$), quanto para número total de espécies $r = 0,94$; $t = 4,77$; $p < 0,05$). Nas coletas atuais, em uma análise visual, podemos perceber a discrepância nos resultados, principalmente no que diz respeito às matas de galeria do Ribeirão Sobradinho, que é a maior área amostrada e possui uma das menores riquezas de espécies. As áreas Córrego do Capetinga, Olho d'Água, Bananal e Jardim Botânico estão dentro de Unidades de Conservação do DF. Também a mata de galeria situada na Rio Vermelho, em Silvânia, se encontra dentro de uma área protegida. Este fator faz com que o entorno destas matas, na sua maioria, esteja também preservado. As áreas onde se encontram as matas de galeria do Córrego Mato Seco e Ribeirão Sobradinho estão próximas a locais extremamente urbanizados e apresentaram baixos valores para riqueza de espécies. Segundo a correlação positiva e significativa, encontrada entre o entorno e a riqueza de espécies, supostamente, esta variável é o fator que favorece uma maior riqueza em matas associadas a unidades de conservação, refletindo o grau de preservação local e funcionando, muito possivelmente, como um fator tamponador, minimizando os efeitos das influências externas sobre a mata. Machado (2000) usando métodos de avaliação da estrutura da paisagem a partir de classes de uso da terra também encontrou, usando método independente de análise, correlação positiva e significativa entre a riqueza de espécies e a variação na quantidade de cerrado entre as áreas contínuas e isoladas de matas de galeria. As análises aqui apresentadas corroboram as análises feitas por Machado (2000). O fato de não ter sido encontrada correlação positiva significativa entre a proporção de ambientes naturais e área dos fragmentos, pode ser um indicador da alteração ambiental que está ocorrendo, no caso analisado, no entorno destes locais. Segundo Wiens *et al.* (1985), a influência do entorno

sobre o fragmento pode ser mais importante que os processos que ocorrem dentro do fragmento. Através destas informações é possível perceber a importância das reservas ou unidades de conservação na manutenção da integridade física destes ambientes, auxiliando na manutenção de uma zona tampão para as matas de galeria, indicação feita também por Machado (2000). Também o fato da riqueza de espécies de mata não ter apresentado correlação significativa com o entorno certamente se dá em função destas espécies estarem menos susceptíveis à influência do entorno do que as demais que muitas vezes exploram a interface entre dois ambientes, no caso mata e cerrado ou mata e campo, que participam na composição da riqueza total.

Considerando-se a biologia de *Antilophia galeata* e seu hábitat preferencial, que é a mata de galeria, ao compararmos as tabelas que dizem respeito ao deslocamento potencial e as distâncias calculadas entre os vários fragmentos, podemos perceber que a dificuldade de deslocamento em função da alteração da matriz ambiental, faz com estas distâncias de deslocamento sejam muito maiores que as distâncias lineares. Por ser uma espécie que não ocorre em áreas abertas nem em ambientes antrópicos, o Plano Piloto e demais ambientes urbanos exercem um papel de barreira total ao seu deslocamento, fazendo com que a ligação potencial entre áreas como o córrego do Capetinga e do córrego Bananal, por exemplo, fique com um trajeto bastante aumentado ou mesmo impossibilitando a migração. Assim como *A. galeata*, várias outras espécies típicas de matas são susceptíveis a este mesmo processo que influencia tanto aspectos populacionais como da composição da comunidade de aves destes locais. Machado (2000) usando modelo de dispersão de aves entre fragmentos de ambientes naturais em que também atribuiu níveis de dificuldade de dispersão pelos vários ambientes do cerrado cita que a estrutura da paisagem apresenta uma grande influência na dinâmica local das espécies mesmo para grupos como as Aves que apresentam uma alta capacidade de deslocamento.

A partir das análises dos dados do entorno dos fragmentos amostrados, podemos perceber que as matas de galeria do Ribeirão Sobradinho e do Riacho Fundo são as mais isoladas se considerarmos que uma matriz ambiental alterada pode transformar os ambientes naturais imersos nesta matriz em verdadeiras ilhas sob o ponto de vista biogeográfico e conservacionista. É essencial distinguir o isolamento entre a escala individual e

populacional. Considerando-se a escala individual, o isolamento está relacionado ao padrão de deslocamento e limites da área de vida dos indivíduos, pares ou grupos. Na escala populacional, o isolamento depende da troca de indivíduos entre gerações e entre populações (Haila *et al.* 1993). Aparentemente a mata de galeria do Ribeirão Sobradinho está em processo de isolamento há um período de tempo maior, pois está sob influência direta da cidade-satélite de mesmo nome e que já a englobou totalmente. A mata de galeria do Riacho Fundo, certamente está no início da intensificação do processo de isolamento e degradação, pois só recentemente este local tem sido mais intensamente explorada do ponto de vista imobiliário. Segundo Vogelmann (1995), existe uma correlação fortemente positiva entre a densidade regional da população humana e níveis de fragmentação, segundo resultados encontrados em estudos usando sensoriamento remoto na análise destas variáveis. Devido à elevada riqueza de espécies de aves aí existente (Riacho Fundo) e à proximidade do novo foco de pressão, certamente a estrutura das comunidades locais sofrerá mudanças radicais, bem como a estrutura populacional de *Antilophia galeata* aí existente, pois com a proximidade da urbanização, geralmente ocorre retirada de madeira, abertura de novas trilhas, caça e captura, presença de animais domésticos, pisoteio e queimadas.

Na imagem de satélite do DF, de 1995, temos 92,88% dos fragmentos de matas de galeria, ou ambientes similares., com área igual ou inferior a 2,3 ha, ou agrupamentos de pixels. Caso estes fragmentos estejam isolados, ou parte deles, como a mata de galeria do arrojo Canjerona, que está totalmente ilhada dentro do ambiente antrópico da asa sul, certamente *Antilophia galeata* deixaria de existir nestes locais. Aqueles fragmentos isolados podem também de funcionar como área de possível rota de deslocamento. Muitos destes fragmentos estão circundados por outros tipos de ambientes cujo papel como barreira seria menos efetivo do que os ambientes antrópicos, mas, por outro lado, com o crescimento das áreas urbanizadas, muitos deles ficarão mais isolados ou deixarão, inclusive, de existir. A fragmentação altera, ainda, a configuração espacial, provocando subdivisões na população e criando uma estrutura metapopulacional, caso esta estrutura ainda não exista, que pode afetar a persistência e a estabilidade populacional (McGarigal e McComb 1995) não só de *A. galeata*, como de outras espécies dependentes de matas.

Considerando-se os conceitos de tamanho mínimo de população viável e que segundo muitos estudos empíricos, o tempo de vida de uma população aumenta com seu tamanho efetivo (N_e) (Willianson 1978; Diamond 1984; Schoener e Spiller 1987 apud Hanski *et al.* 1996) e ainda que áreas maiores apresentam maiores tamanhos populacionais, temos DF um grande chance de que *Antilophia galeata* venha a desaparecer, ou já não ocorra, em muitos daqueles pequenos fragmentos, cujas áreas não comportam populações residentes. Por outro lado, considerando-se o conceito de MVM (tamanho mínimo de metapopulação viável) (Hanski *et al.* 1996), que pode ser definido como o número mínimo de interações das populações locais para a persistência de uma metapopulação, é necessário considerar também o valor mínimo de habitats adequados necessário à persistência deste tipo de estrutura populacional, pois nem todas as manchas de habitat adequadas são simultaneamente ocupadas. A persistência da espécie se dá, portanto, devido a um equilíbrio entre extinção e recolonização. Neste contexto, segundo estes autores, devemos nos questionar sobre extinções devido à perda permanente de habitats.

Considerando o modelo clássico de metapopulações formulado por Levins (1969), que assume uma vasta rede de pequenas manchas de habitat ocupadas por um conjunto local de populações com risco de extinções locais, a metapopulação sobrevive sob um balanço entre estas extinções locais e recolonizações de manchas de habitats adequados. Na perda de habitat, assume-se que uma fração de manchas permanentemente destruídas com que estas recolonizações ocorram em uma proporção reduzida porque a densidade de habitats adequados é igualmente reduzida. Segundo a Lei de Levins, a condição necessária para a sobrevivência da metapopulação é que o número de manchas de habitat remanescentes após a alteração da matriz, exceda o número de habitats adequados mas existentes antes da destruição. Segundo Hanski *et al.* (1996), esta regra só é válida para metapopulações que têm baixa taxa de turnover e destruição de habitat muito baixa. Em uma escala regional, é possível que *Antilophia galeata* possa subsistir por um longo tempo biológico considerando-se sua distribuição por toda a região do bioma do cerrado e o elevado número de fragmentos, porém, se a intensidade de destruição ambiental aumentar, esses processos relacionados às extinções locais podem ser superiores numericamente às recolonizações, e assim comprometer a manutenção destas e outras espécies que possam ter um padrão metapopulacional de persistência regional.

Segundo Frankham (1995), em animais de laboratório e domésticos, a extinção cumulativa está correlacionada com endocruzamento. De acordo com este mesmo autor, endocruzamento ocorre na natureza como uma consequência do efeito do tamanho de populações. Para populações originalmente em *outbreeding*, é esperada uma redução da heterozigidade na proporção do coeficiente de endocruzamento. Também uma distorção na proporção entre machos e fêmeas é freqüentemente encontrada em populações que sofrem endocruzamento (Frankham 1995 apud Soulé 1980), diminuindo o tamanho efetivo da população. Populações em ilhas podem ser susceptíveis à extinção através da perda da diversidade genética quando do estabelecimento, geralmente por um par de fundadores em ilhas pequenas, com consequente tamanho populacional reduzido e com alta susceptibilidade a flutuações populacionais com poucos predadores e doenças para prevenir ciclos de explosão e redução populacional (Frankham 1995). Sob a ótica do tamanho mínimo de população viável, o endocruzamento, e consequente depressão por endocruzamento e a deriva gênica, têm um papel importante na extinção de populações com tamanho reduzido (Boyce 1992). Estudos em populações selvagens concluem que muitas vezes o endocruzamento é associado à diminuição da taxa reprodutiva, resistência às doenças e taxa de crescimento (Blackwell et al. 1995). Como áreas como a mata do Ribeirão Sobradinho e Riacho Fundo estão mais isoladas de outras matas, ou possíveis fontes colonizadoras ou de renovação do *pool* gênico, existe a possibilidade de que as populações destes locais venham a sofrer depressão por endocruzamento no decorrer do processo de alteração ambiental.

Em muitas espécies, a perda de hábitat surgindo da fragmentação também resulta na redução do tamanho da população regional. Hinsley et al. 1996 encontrou resultados que corroboram com esta hipótese estudando várias espécies em fragmentos que variam de tamanho. Vários autores têm usado dados baseados em presença/ausência para manchas de vários tamanhos para inferir a área mínima requerida para determinadas espécies (Opdam et al. 1985; Robbins et al. 1989; Viekery et al. 1994). Embora as mudanças ambientais sejam inevitáveis, contudo, segundo Dolman (1994), é difícil prever como uma determinada espécie responderá a estas mudanças.

Perda ou degradação de hábitat é o fator mais importante na extinção de espécies também no futuro. Para 82% das aves atualmente ameaçadas de extinção, esta é a principal causa (Temple 1986). A alteração ambiental pode criar barreiras ao movimento porque hábitats desfavoráveis podem não oferecer abrigos contra predadores ou ainda as distâncias são grandes o suficiente para não permitir a travessia em um único movimento (Arnold et al. 1993). Populações em ambientes isolados e fragmentados são mais vulneráveis à extinção através da estocasticidade demográfica e ambiental e catástrofes, perda da heterozigidade genética e alelos raros, efeito de borda e distúrbios provocados por humanos (Turkey 1995). Também a configuração do hábitat de determinada espécie afeta a população e influencia o padrão de movimentos de indivíduos (McGarigal e McComb 1995). É possível que ocorra este fato com *Antilophia galeata* devido ao aumento significativo no deslocamento entre os vários fragmentos de matas de galeria inventariados devido à alteração ambiental.

Devido ao aumento das atividades humanas, com expansão da população, hábitats de muitas espécies têm sido destruídos ou fragmentados em manchas cada vez mais pequenas. A fragmentação é a maior ameaça à persistência das populações e um problema de importância primária na biologia da conservação. Uma vez que o cerrado vem sendo destruído a um ritmo mais acelerado que a Amazônia (Alho e Martins 1995) e que no Brasil somente cerca de 3,7% do território esteja legalmente (aproximadamente 5% se considerarmos Unidades de Conservação Federais - Dr. Ricardo Bonfim Machado comunicação pessoal), que é um valor muito baixo da média de outros países em desenvolvimento, como Indonésia (16%), Venezuela (10%) e Costa Rica (8%) (Alho e Martins *op. cit.*), mesmo espécies que inicialmente são abundantes e de ampla distribuição merecem atenção e acompanhamento a longo prazo.

Observando a Tabela 4, que se refere aos resultados do levantamento das várias classes de ambientes existentes no DF, podemos perceber que, comparando-se ambientes naturais (cerrado + mata de galeria + campo), temos um percentual de aproximadamente 45%, contra aproximadamente 55% de áreas alteradas (áreas queimadas + ambiente urbano + áreas degradadas). Embora as áreas queimadas representem um percentual em torno de 10%, este valor pode oscilar em uma escala significativa no decorrer de um mesmo ano e entre vários anos em função da recuperação natural destes locais. Um outro aspecto que merece

estaque é o fato de as matas de galeria representarem em torno de 5% dos ambientes naturais existentes no Cerrado, o que corresponde, a princípio, com dados bibliográficos de (1989). Ainda que este percentual aparentemente permaneça inalterado, em muitas matas a qualidade intrínseca a elas é alterada comprometendo as chances de permanência de muitas espécies (observação pessoal). Outro fator a ser levado em consideração é o percentual de fragmentos de pequenas dimensões (menos de 3 ha) que chega a 92% dos fragmentos de matas de galeria. Um aspecto muito importante, levando-se em consideração os dados de (1972), que diz que o cerrado era o ambiente mais abundante no Cerrado (75%) na região do DF, e com base nas análises da imagem de satélite de 1995, este percentual está em torno de 20%.

Conclusões

No conjunto de áreas amostradas, a riqueza de espécies está correlacionada à idade do entorno, que foi representada pelo percentual de ambientes naturais. Esta conclusão pode ser feita uma vez que não houve correlação significativa entre a riqueza de espécies como um todo ou riqueza de espécies de mata e a área dos fragmentos amostrados.

Analisando a matriz ambiental, podemos perceber que a sua alteração pode promover o isolamento de ambientes naturais aí existentes. Um indicativo desta situação é o caso da mata do Ribeirão Sobradinho, que possui maior área e um das menores riquezas de espécies, possui o seu entorno com um maior percentual de alteração ambiental. Certamente os fatores decorrentes da proximidade de locais urbanizados, como invasões, presença de animais domésticos, retirada de madeira, destruição do subosque, caça, dentre outros, estão atuando, direta ou indiretamente nesta redução da riqueza de espécies.

A porção do Cerrado analisado está intensamente fragmentada em manchas de pequenas dimensões e com vários níveis de isolamento, que pode futuramente promover mecanismos de migração de várias espécies o que pode, potencialmente, levar à redução populacional, ao endocruzamento e conseqüente extinções locais e, possivelmente a longo prazo, regionais.

Devido às alterações ambientais, o nível de dificuldade de espécies dependentes das matas para a migração entre fragmentos é substancialmente aumentado, mais uma vez propiciando processos perniciosos à manutenção de populações em se considerando os tempos de tempo ecológicos e evolutivos.

Vem ocorrendo, no Cerrado, uma acentuada alteração da matriz ambiental, que pode ser observada através da comparação de dados gerados a partir de informações atuais com avaliações anteriores de alguns autores. Em conseqüência desta alteração da matriz ambiental, o ambiente que vem sofrendo maior pressão é o cerrado, que representa, atualmente, cerca de 20% dos ambientes da porção analisada do DF.

Bibliografia

- Per, A. N. 1971. A organização natural das paisagens inter e subtropicais brasileiras. 1-4. In: Ferri, M. G. [Coord] III Simpósio sobre o cerrado. Editora Edward Blücher Ltda/Editora da USP.
- Per, A. N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira Aproximação. Geomorfologia, 52:1-21.
- Per, A. N. 1983. O domínio dos cerrados: introdução ao conhecimento. Fundação Centro de Formação do Servidor Público, 111(4):41-55.
- C. J. R. e Martins, E. S. [Eds]. 1995. **De Grão em Grão o Cerrado Perde o Espaço**. WWF. 66pp.
- Per, P. T. 1954. Teoria sobre a formação dos campos cerrados. Revta. Brasil. Geogr., 16(4):96-98.
- Per, P. T. e Araújo, W. A. 1952. El suelo como factor ecológico el desarrollo de la vegetación en el centro-oeste del Brasil. Turrialba, 2(4), 153-160.
- Per, G. W., Steven, D. E., Weeldenburg, J. R. e Smith, E. A. 1993. Influences of remnant size spacing pattern and connectivity on population boundaries and demography in euros *Macropus robustus* living in a fragmented landscape. Biological Conservation, 64:219-230.
- Per, J. & Nelson, W. S. 1989. Molecular genetic relationships of the extinct dusky seaside sparrow. Science, 243(4891):646-648.
- Per, P. E., Hinsley, S. A. e Newton, I. 1996. Local extinctions and recolonizations of passerine bird populations in small woods. Oecologia, 108:64-71.
- Per, D. J., Contreras, T. A. e Fahrig, L. 1998. Habitat loss and population decline: a meta-analysis of the patch size effect. Ecology, 79(2):517-533.
- Per, B. F., Doerr, P. D., Reed, J. M. e Walters, J. R. 1995. Inbreeding rate and effective population size: a comparison of estimates from pedigree analysis and a demographic model. Biological Conservation, 71:299-304.
- Per, M. S. 1992. Population viability analysis. Annu. Rev. Ecol. Syst., 23:481-506.
- Per, M. A., Matter, S. F., Dooley Jr, J. L., Dauten, J. L. e Simkins, J. A. 1996. Controlled experiments of habitat fragmentation: a simple computer simulation and a test using small mammals., Oecologia, 108:185-191.

- ewer, B. A., Lacy, R. C., Foster, M. L. e Alaks, G. 1990. Inbreeding depression in insular and central populations of *Peromyscus* mice. *Journal of Heredity*, 81:257-266.
- rgman, M. A., Akcakaya, H. R. e Loew, S. S. 1988. The use of extinction models for species conservation. *Biological Conservation*, 43:9-23.
- rkey, T. V. 1995. Extinction rates in archipelagoes: implications for populations in fragmented habitats. *Conservation Biology*, 9(3):527-541.
- ughley, G. 1994. Directions in conservation biology. *J. Anim. Ecol.*, 63:215-244.
- valcanti, R. B. 1999. Bird species richness and conservation in the cerrado region of central Brazil. *Studies in Avian Biology*, 19:244-249.
- Charlesworth, D. e Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:237-268.
- sta-Neto, P. L. O. 1977. **Estatística**. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo - SP.
- utinho, L. M. 1990. Fire in the ecology of the brazilian cerrado. 81-105. In: Goldammer, J. G. [Ed] **Fire in the Tropical Biota**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- mond, J. M. 1984. Normal extinctions of isolated populations. In: Nitecki, M. H. [Ed.] **Extinctions**, University of Chicago Press, Chicago, pp. 191-246.
- s, B. F. S. 1989. Cerrados: uma caracterização. 11-26. In: Dias, B. F. S. **Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis**. Brasília - DF . FUNATURA. 96pp.
- man, P. M e Sutherland, W. J. 1994. The response of bird population to habitat loss. *IBIS*, 137:S38-S46.
- Anjos, R. S. A. 1996. Distrito Federal do Brasil - Mapa Imagem Multitemporal.
- n, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Bot. Rev.*, 38(2):201-341.
- li, J. M. e Silva Jr, M. C. 1993. A comparative study of cerrado (*sensu stricto*) vegetation in Central Brazil. *Journal Trop. Ecol.*, 9:227-289.
- reira, A. A. 1995. Dinâmica de comunidades de aves em matas de galeria. Dissertação de Mestrado. UnB
- i, M. G. 1977. Ecologia dos cerrados. In: Simpósio sobre o cerrado, Belo Horizonte, Itatiaia e São Paulo. Editora USP. 15-36.
- akham, R. 1995. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology*, 9(4):792-799.

- Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78:311-327.
- Furley, P. A. e Ratter, J. A. 1988. Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. *J. Biogeogr.*, 15:97-108.
- Saines, M. S., Diffendorfer, J. E., Tamarin, R. H. e Whittam, T. S. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity*, 88:294-304.
- Gilpin, M. 1996. Forty-eight parrots and the origins of population viability analysis. *Conservation Biology*, 10(6):1491-1493.
- Goodland, R. 1971. A physiognomic analysis of the 'cerrado' vegetation of central Brazil. *J. Eco.*, 59:411-419.
- Goodnight, C. J. 1988. Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variance. *Evolution*, 42(3):441-454.
- Green, R. E. e Griffiths, G. H. 1994. Use of preferred nesting habitat by stone curlews *burhinus- oedicnemus* in relation to vegetation structure. *J. Zool.*, 233:457-471.
- Haila, Y., Hanski, I. K. e Raivio, S. 1993. Turnover of breeding birds in small forest fragments: the "sampling" colonization hypothesis corroborated. *Ecology*, 74(3):714-725.
- Hanski, I. E Gilpin, M. 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biol J. Linn. Soc.*, 42:73-88.
- Hanski, I. 1994. A practical model of metapopulation dynamics. *Journal of Animal Ecology*, 63:151-162.
- Hanski, I., Moilanen, A. e Gyllenberg, M. 1996. Minimum viable metapopulations size. *Amer. Nat.*, 147(4):527-541.
- Harris, R. B. e Allendorf, F. W. 1989. Genetically effective population size of large mammals: an assessment of estimators. *Conservation Biology*, 3(2):181-191.
- Innsley, S. A., Bellamy, P. E. e Newton, I. 1996. Influence of population size and woodland area on bird species distributions in small woods. *Oecologia*, 105:100-106.
- Ink, C. A., Macedo, R. H. e Mueller, C. C. 1994. Cerrado: processo de ocupação e implicações para a conservação e utilização sustentável de sua diversidade biológica. WWF-Brasil report. 104pp.

- Py, R. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, 1(2):143-158.
- de, R. 1993. Risks of populations extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Amer. Nat.*, 142(6): 911-927.
- de, R. 1995. Mutation and Conservation. *Conservation Biology*, 9(4):782-791.
- ins, R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 15:237-240
- ins, R. 1970. Extinction. In: Gerstenhaber, M. [Ed.] *Some Mathematical Problems in Biology*, pp. 77-107. American Mathematical Society, Providence, RI.
- ch, M. e Gabriel, W. 1990. Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, 44(7):1725-1737.
- chado, R. B. 2000. **A fragmentação do Cerrado e a avifauna na região de Brasília - DF.** Tese de Doutorado. Departamento de Ecologia. UnB.
- Cauley, D. E., Raveill, J. e Antonovics, J. 1995. Local founding events as determinants of genetic structure in a plant metapopulation. *Heredity*, 75:630-636.
- Garigal, K. e McComb, W. C. 1995. Relationships between landscape structure and breeding birds in the Oregon Coast range. *Ecological Monographs*, 65(3):235-260.
- ila, J., Björklund, M. e Baker, A. J. 1996. The successful founder: genetics of introduced *Carduelis chloris* (greenfinch) populations in New Zealand. *Heredity*, 77:410-422.
- ola, M. 1994. A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. *Conservation Biology*, 8(4):961-971.
- anen, A. e Hanski, I. 1998. Metapopulation dynamics: effects of habitat quality and landscape structure. *Ecology*, 79(7):2503-2515.
- nba, T., Umemoto, A. e Minami, E. 1999. The effects of habitat fragmentation of persistence of source-sink metapopulations in systems with predators and prey or apparent competitors. *Theoretical Population Biology*, 56:123-137.
- eira-Filho, A. T., Shepherd, G. J., Martins, F. R. e Stubblebine, W. H. 1989. Environmental factor affecting physiognomic and floristic variation in an area of cerrado in central Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 5:413-431.

- Oliveira-Filho, A. T. e Ratter, J. A. 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinb. J. Bot.*, 52(2):141-194.
- Olivieri, I., Michalakis, Y. e Gouyon, P.-H. 1995. Metapopulation genetics and the evolution of dispersal. *Amer. Nat.*, 146(2):202-228.
- Opdam, P., Foppen, R., Reijnen, R., Schotman, A. 1985. The landscape ecological approach in bird conservation: Integrating the metapopulation concept into spatial planning. *Ibis*, 137 n.SUPPL. 1: S139-S146.
- Pogson, G. H., Mesa, K. A. e Boutilier, R. G. 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics*, 139:375-385.
- Rolls, K., Ballou, J. e Brownell, R. L. J. 1983. Genetic diversity in California sea otters: theoretical considerations and management implications. *Biological Conservation*, 25:209-232.
- Ratter, J. A. e Dargie, T. C. D. 1992. An analysis of the floristic composition of 26 cerrado areas in Brazil. *Edinb. J. Bot.*, 49(2):235-250.
- Ribeiro, J. F., Sano, S. M., Macêdo, J. E Silva, J. A. 1983. Os principais tipos fitofisionômicos da região dos cerrados. EMBRAPA. Boletim de Pesquisa, 21: 1-28.
- Ribeiro, J. F. e Walter, B. M. T. 1998. Fitofisionomia do bioma do Cerrado. In: Sano, S. M. e Almeida, S. P. [Eds] **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina - DF - EMBRAPA. 556pp.
- Robbins, C. S., Dawson, D. K. e Dowell, B. A. 1989. Habitat area requirements of breeding forest birds of the Middle Atlantic states. *Wildl. Monogr.* 103:1-34.
- Rosenberg, D. K., Noon, B. R. e Meslow, E. C. 1997. Biological corridors: form, function, and efficacy. *BioScience*, 47(10):677-687.
- Rowe, G., Beebee, T. J. C. e Burke, T. 1998. Phylogeography of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: genetic differentiation of native and translocated populations. *Molecular Ecology*, 7:751-760.
- Schieck, J., Lertzman, K., Nyberg, B. e Page, R. 1995. Effects of patch size on birds in old-growth montane forest. *Conservation Biology*, 9(5):1072-1084.
- Shaffer, M. L. 1981. Minimum population sizes for species conservation. *BioScience*, 31(2):131-134.
- Silva, J. M. C. 1995a. Birds of the cerrado region, South America. *Steenstrupia*, 2:69-92.

- va, J. M. C. 1995b. Biogeographic analysis of the South American Cerrado avifauna. *Steenstrupia*, 21:49-67.
- va, J. M. C. 1995c. Avian inventory of the cerrado region, South America: implications for biological conservation. *Bird Conser. Intern.*, 5:291-304.
- va, J. M. C. 1996. Distribution of amazonian and atlantic birds in gallery forests of the cerrado region, South America. *Ornit. Neot.* 7:1-18.
- berloff, D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. 1988. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 19:473-511.
- kin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 16:393-430.
- all, M. F. e Hunter, M. L. 1988. Forest fragmentation and avian predation in forested landscapes. *Oecologia*, 79:62-64.
- th, J. N. M., Taitt, M. J., Rogers, C. M., Arcese, P., Keller, L. F., Cassidy, A. L. E. V. e Hochachka, W. M. 1996. A metapopulation approach to the population biology of the song sparrow *Melospiza melodia*. *IBIS*, 138:120-128.
- ndelow, J. A., Nichols, J. D., Hays, H., Cormons, G. D., Burger, J., Safina, C., Hines, J. E e Gochfeld, M. 1995. Estimating annual survival and movement rates of adults within a metapopulation of roseate terns. *Ecology*, 76(8):2415-2428.
- Stacey, P. B. e Taper, M. 1992. Environmental variation and the persistence of small populations. *Ecological Applications*, 2(1):18-29.
- Stacey, P. B. e Taper, M. 1992. Environmental variation and persistence of small populations. *Ecol Appl* 2(1):18-29.
- ple, S. A. 1986. The problem of avian extinctions. *Curr. Ornithol.*, 3:453-485.
- ery, P. D., Hunter, M. L. Jr. e Melvin, S. M. 1994. Effects of habitat area on the distribution of grassland birds in Maine. *Conserv. Biol.*, 8:1087-1097.
- L. J. & Caldwell, J. P. 1991. Ecological observations on cerrado lizards in Rondônia, Brazil. *Journal Hepet.*, 27(1):46-52.
- Imann, J. E. 1995. Assessment of forest fragmentation in Southern New England using remote sensing and geographic information systems technology. *Conservation Biology*, 9(2):439-449.
- , M. J. e McCauley, D. E. 1988. Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*, 42(5):995-1005.

- ahlborg, N., Moilanen, A. e Hanski, I. 1996. Predicting the occurrence of endangered species in fragmented landscapes. *Science*, 273:1536-1538.
- alter, H. S. 1990. Small viable populations: the red-tailed hawk of Socorro Island. *Conservation Biology*, 4(4):441-443.
- ens, J. A. 1994. Habitat fragmentation: island v landscape perspectives on bird conservation. *IBIS*, 137:S97-S104.
- ens, J. A., Crawford, C. S. e Gosz, J. R. 1985. Boudary dynamics: a conceptual framework for studying landscape ecosystems. *Oikos*, 45:421-427.
- llianson, G. B. 1978. A comment on equilibrium turnover for islands. *The American Naturalist*, 112:241-243.

Anexo

Lista de Espécies

abela 03 – Lista das espécies e número de indivíduos capturados nas várias matas de galeria amostradas no Distrito Federal. CC = Córrego Capetinga; CRF = Córrego Riacho Fundo; MG = Córrego Mato Seco; OD = Olho d'Água; CB = Córrego Bananal; RS = Ribeirão Sobradinho; JB = Jardim Botânico; RV = Rio Vermelho. Nomes populares e ordem filogenética segundo Sick 1985.

Espécie	Local de Coleta							
	CC	CRF	MG	OD	BN	RS	JB	RV
Ordem Columbiformes								
Família Columbidae – 3 spp								
<i>Columbina talpacoti</i> - rolinha-caudo-de-feijão	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Leptotila rufaxilla</i> - juriti (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Leptotila verreauxi</i> - gemedeira	1	0	0	0	0	0	0	1
Ordem Caprimulgiformes								
Família Caprimulgidae - 1 spp								
<i>Nyctidromus albicollis</i> - curiango	0	0	0	0	0	0	0	1
Ordem Apodiformes								
Família Trochilidae – 6 spp								
<i>Phaethornis pretrei</i> - rabo-branco-de-sobre-amarelo	0	0	1	0	0	0	0	2
<i>Eupetomena macroura</i> - tesourão	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Colibri serrirostris</i> - beija-flor-de-orelha-violeta	0	0	0	0	1	0	3	0
<i>Chlorostilbon aureoventris</i> - bico-vermelho	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thalurania furcata</i> - beija-flor-tesoura-verde	2	2	1	2	0	4	4	2
<i>Thalurania glaucopsis</i> - tesoura-de-frente-violeta	1	0	0	1	0	0	4	0
Ordem Coraciiformes								
Família Momotidae – 1 sp								
<i>Baryphthengus ruficapillus</i> - juruva (M)	0	1	0	0	0	0	1	3

Ordem Piciformes

Família Galbulidae – 1 sp

<i>Galbula ruficauda</i> – bico-de-agulha-de-rabo-vermelho (M)	0	1	0	0	1	0	0	0
--	---	---	---	---	---	---	---	---

Família Ramphatidae - 1 sp

<i>Pteroglossus castanotis</i> - araçari-castanho	0	0	0	0	0	0	0	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Família Picidae – 2 spp

<i>Picumnus minutissimus</i> – pica-pau-anão-escamado M	0	0	0	3	0	0	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Veniliornis passerinus</i> – pica-pauzinho-anão	0	0	0	0	1	0	0	1
--	---	---	---	---	---	---	---	---

Ordem Passeriformes

Família Dendrocolaptidae – 3 spp

<i>Sittasomus griseicapillus</i> – arapaçu-verde	9	4	3	7	5	0	4	7
--	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Lepidocolaptes fuscus</i> – arapaçu-rajado	0	2	0	1	1	0	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Dendrocolaptes platyrostris</i> - arapaçu-grande (M)	2	0	0	0	0	0	0	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Família Furnariidae – 6 spp

<i>Poecilurus scutatus</i> – estrelinha-preta	2	2	0	9	1	0	1	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Phacellodomus ruber</i> – graveteiro	0	1	0	0	0	1	0	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Phyllidor dimidiatus</i> – limpa-folha-do-brejo – (M)	3	1	4	1	2	6	0	0
--	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Automolus leucophthalmus</i> – fura-barreira (*)	0	0	0	0	0	0	0	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Automolus rectirostris</i> - fura-barreira (*) (M)	0	0	1	0	0	0	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Lochmias nematura</i> – joão-porca – (M)	0	0	0	0	0	1	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Família Formicariidae – 4 spp

<i>Thamnophilus caerulescens</i> – choca-da-mata	4	2	3	3	0	1	3	0
--	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Dysithamnus mentalis</i> – choquinha-lisa (M)	2	8	0	4	0	0	0	6
--	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Herpsilochmus pileatus</i> – chororozinho-de-chapéu-preto	0	2	0	0	0	0	0	0
--	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Conopophaga lineata</i> – chupa-dente (M)	3	3	0	3	0	2	0	3
--	---	---	---	---	---	---	---	---

Família Pipridae – 4 spp								
<i>Pipra fasciicauda</i> – uirapuru-laranja (M)	0	0	0	0	0	0	0	13
<i>Antilophia galeata</i> – soldadinho (M)	21	31	20	23	21	21	9	21
<i>Neopelma pallescens</i> – fruxu (*) (M)	0	5	0	0	0	0	0	1
<i>Schiffornis virescens</i> – flautim (M)	3	6	0	9	5	0	2	3
Família Tyrannidae – 12 spp								
<i>Myiodinastes maculatus</i> – bem-te-vi-rajado	0	0	0	0	0	1	0	3
<i>Pitangus sulphuratus</i> – bem-te-vi-de-coroa	0	0	1	0		1	0	
					0			0
<i>Myiarchus ferox</i> – maria-cavaleira	0	0	1	0	1	3	0	0
<i>Empidonax euleri</i> – enferrujado	6	9	2	3	5	2	5	0
<i>Platyrhincus mystaceus</i> – patinho (M)	1	0	0	0	3	0	3	4
<i>Tomolmyias sulfuresces</i> – bico-chato-de-orelha-preta (M)	0	3	0	1	0	0	2	0
<i>Elaenia flavogaster</i> – guaracava-de-barriga-amarela	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Suiriri affinis</i> – suiriri-cinzento	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Camptostoma obsoletum</i> – risadinha	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptopogon amaurocephalus</i> – abeçudo (M)	2	3	3	4	2	4	1	6
<i>Hionectes (Pipromorpha) rufiventris</i> – bre-asas (*) (M)	1	1	0	0	0	0	3	7
<i>Chorothops delalandi</i> – estalador (M)	2	2	0	1	0	0	0	1
Família Troglodytidae – 1 sp								
<i>Thryothorus leucotis</i> – garrinchão-da-barriga-vermelha	6	0	1	2	2	5	0	0
Família Turdidae – 5 spp								
<i>Turdus nigriceps</i> – sabiá-ferreiro	1	2	0	0	0	0	1	0
<i>Turdus rufiventris</i> – sabiá-laranjeira	4	1	10	1	5	0	1	6
<i>Turdus leucomelas</i> – sabiá-barranco	6	2	12	1	3	18	5	5
<i>Turdus amaurochalinus</i> – sabiapoca	1	0	9	0	0	3	0	0
<i>Turdus albicollis</i> – sabiá-coleira	12	1	1	2	3	1	2	7
Família Vireonidae – 1 sp								
<i>Cyclarhis gujanensis</i> – pitiguari	0	1	1	2	0	2	0	0
Família Parulidae – 3 spp								
<i>Basileuterus flaveolus</i> – canário-do-nato	6	2	0	9	0	0	5	3
<i>Basileuterus hypoleucus</i> – pichito (M)	5	15	2	12	6	2	3	9
<i>Basileuterus leucophrys</i> – pula-pula-de-sobrancelha (*)	0	0	4	1	3	3	2	0
Família Coerebidae – 2 spp								
<i>Coereba flaveola</i> – cambacica	0	0	0	1	3	1	0	3
<i>Dacnis cayana</i> – saí-azul	0	1	0	0	0	0	0	0

mília Thraupidae – 7 spp								
<i>Euphonia violacea</i> – gaturamo-verdadeiro (M)	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Tangara cayana</i> – saíra-amarelo	1	1	1	3	1	1	0	0
<i>Thraupis sayaca</i> – sanhaço-cinzento	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Tachyphonus rufus</i> – pipira-preta	2	1	1	3	1	1	0	1
<i>Trichotrupis melanops</i> – tié-de-topete (M)	12	6	4	7	6	3	6	2
<i>Eucometis penicilata</i> – pipira-da-taoca (M)	1					1		
<i>Pyrhocomia ruficeps</i> – cabecinha-castanha		2	1	8	2		4	5
	1	1	0	0		0	0	
					1			1
mília Fringillidae – 5 spp.								
<i>Saltator maximus</i> – tempera-viola	1	3	0	5	0	0	0	7
<i>Saltator similis</i> – trinca-ferro-verdadeiro	8	2	0	7	2	1		0
<i>Volatinia jacarina</i> – tiziu	0	0	0	0	2	1	0	0
<i>Arremon taciturnus</i> – tico-tico-do-mato-de-bico-preto	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Arremon flavirostris</i> – tico-tico-do-mato-de-bico-amarelo	5	0	2	3	3	4	1	0
Total/Área	36	36	25	34	28	27	25	38
Total Geral - 68 spp								

Capítulo 2 – Diversidade genética de *Antilopha galeata* em matas de galeria do Planalto Central

Introdução

Nos últimos 20 anos, várias técnicas de bioquímica e genética molecular, como eletroforese de enzimas, têm sido amplamente aplicadas ao estudo da diferenciação de populações e evolução. Entretanto, elas têm sido pouco usadas em problemas demográficos como a atribuição de parentesco a indivíduos de uma população. Muitos sistemas de enzimas só podem ser examinados *post mortem* e são de pouco uso caso o objetivo seja estudar animais selvagens na natureza. Além do mais, sistemas de enzimas apresentam um baixo grau de polimorfismo (Mumme *et al.* 1985; Romagnano *et al.* 1989; Ellegren 1991; Estoup *et al.* 1995; Haig 1998), principalmente em aves (Haig 1998 apud Barrowclough 1983). A busca por novas técnicas mais sensíveis para detecção da variabilidade genética tem continuado e, recentemente, a maior descoberta tem sido a biologia molecular (Wetton *et al.* 1987). Embora nos últimos 20 anos, vários pesquisadores pudessem perceber o potencial de aplicabilidade dos marcadores moleculares em estudos sobre estrutura populacional (diversidade genética, tamanho efetivo de população, endocruzamento) só nos últimos 5 a 7 anos pesquisadores atuam em biologia da conservação reconheceram a utilidade das técnicas envolvendo marcadores moleculares na quantificação e avaliação de fatores interrelacionados a este tema e que podem afetar a viabilidade de uma população (Haig 1998).

O DNA está sendo mais e mais frequentemente usado em biologia evolutiva e conservação. Taxonomistas, geneticistas e ecologistas evolutivos têm usado informações de frequências de mitocôndrias, cloroplastos e DNA nuclear (Avise *et al.* 1987; Seutin *et al.* 1991). Recentemente o campo da genética comportamental foi revolucionado pela verificação de marcadores moleculares que podem descobrir relacionamentos e parentescos dentro de grupos sociais de animais (Jeffreys *et al.* 1985a; Quinn *et al.* 1987; Burke 1989; Millar *et al.* 1992). Nos últimos vinte anos várias técnicas da genética-bioquímica e biologia molecular têm sido amplamente empregadas no estudo de diferenciação de populações e evolução (Plotsky *et al.* 1995). Porém tais técnicas têm sido pouco empregadas em problemas demográficos. A busca por técnicas mais sensíveis na detecção da variação genética também tem continuado e a maior descoberta está no âmbito da biologia molecular.

A descoberta de um novo componente no genoma dos vertebrados, as seqüências de minisatélites, tem emergido do trabalho de vários autores (Georges *et al.* 1988). Em 1980, Wyman e White descreveram o primeiro marcador multialélico, altamente polimórfico no DNA humano (Nakamura *et al.* 1988). Em seqüência a este fato, o gene da insulina, o gene do H-ras e da zetaglobina mostraram-se polimórficos devido a diferença no número de pequenas seqüências de DNA repetitivas (Nakamura *et al.* 1988). A descoberta destas regiões hipervariáveis no DNA humano (Hillel *et al.* 1989), também chamado de minisatélite de DNA (Jeffreys *et al.* 1985a; Wetton *et al.* 1987; Burke e Bruford 1987) ou VNTR (variable number of tandem repeats, Nakamura *et al.* 1987), levou ao estabelecimento da técnica do DNA *fingerprinting* multilocus (Jeffreys *et al.* 1985b). Atualmente, somente para o genoma humano, embora não se conheça o número exato, pode exceder a 1500 (Pena *et al.* 1991).

O descobrimento dessas regiões altamente polimórficas no genoma e o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, que permitem caracterizar indivíduos, raças, populações, gêneros, etc (Smouse e Chevillon 1998; Hillel *et al.* 1989; Ellegren *et al.* 1992), baseados nestas regiões de polimorfismos, abre um vasto campo de exploração para a genética (Avice e Nelson 1989; Hadrys *et al.* 1992; Marinelli *et al.* 1992), biologia de populações (Dawson *et al.* 1997) ou diversidade genética (Haberfeld *et al.* 1992; Plotsky *et al.* 1995). Esse poder de individualização do DNA *fingerprinting* permitiu o desenvolvimento da genética molecular de populações (Dunnington *et al.* 1991; Devlin *et al.* 1991; Ellegren *et al.* 1992; Schwaiger *et al.* 1992; Zhu *et al.* 1996a), uma ferramenta útil para estudos sobre genética comportamental e biologia de populações (Hadrys, *op cit.*).

O DNA *fingerprinting* é um procedimento útil para avaliar as diferenças genéticas em grande número de sítios de DNA através do genoma de uma população animal (Jeffreys 1987; Zhu *et al.* 1996a). A relação entre conjuntos de genes e endocruzamento, dentro de conjuntos, é refletida no padrão de bandas encontrado no DNA *fingerprinting* (Grunder *et al.* 1994). Parentesco refere-se ao grau pelo qual dois conjuntos genéticos compartilham alelos em cada locus. A frequência alélica é refletida na frequência de bandas do DNA *fingerprinting* e as bandas seguem um padrão de herança mendeliana (Kuhnlein *et al.* 1989; Hanotte *et al.* 1992). Endocruzamento refere-se ao grau de homozigosidade dos loci dentro de um conjunto

nico (Grunder *et al.* 1994). Segundo Falconer (1982), endocruzamento pode ser definido como o acasalamento entre indivíduos que são relacionados entre si através de um ancestral comum. Quanto maior frequência de uma banda na população, assumindo-se que cada banda apresenta um alelo de uma região de minissatélite hipervariável, maior o endocruzamento (Kuhnlein *et al.* 1990). O coeficiente de endocruzamento pode ser estimado baseado no *endogamy* atual ou tamanho das populações e variações no tamanho das famílias. Contudo, o cálculo pode não refletir o endocruzamento verdadeiro da população, porque muitos outros fatores também alteram este parâmetro. Além do mais, o cálculo de endocruzamento requer registros completos da população que podem não estar disponíveis. A similaridade de DNA *fingerprints* entre indivíduos, provavelmente é um bom indicador de endocruzamento. Um estudo realizado por Kuhnlein *et al.* (1990) mostrou que as frequências de bandas e frequências alélicas estimadas de DNA *fingerprints* foi altamente relacionada ao coeficiente de endocruzamento de uma maneira linear e o coeficiente de compartilhamento de bandas (BS) também foi correlacionado ao endocruzamento (Zhu 1996b).

O *fingerprinting* multilocus foi anteriormente usado em galinhas para caracterizar variabilidade genética dentro de linhagens e para estimar distância genética entre linhagens experimentais (Kuhnlein *et al.* 1989, Bruford e Burke 1994). Tem sido também aplicado para a identificação de padrões linhagem-específica. Em aves o primeiro sucesso no uso de minissatélites de DNA foi relatado por Burke *et al.* (1989) para descrever o comportamento ou estratégia reprodutiva em populações de *Prunella modularis*. Foi acompanhado um período reprodutivo de 80 indivíduos subdivididos pelo comportamento sexual em 3 grupos (monogamia, poliandria e poliginandria). Através dos escores dos padrões de bandas obtidos e das observações visuais registradas, a paternidade entre os machos dos diferentes grupos foi identificada e quantificada, determinando-se com precisão o sucesso reprodutivo dos machos alfa e beta dentro de cada grupo. A participação do macho na alimentação da prole é progênie-específica e a aceitação de machos beta pelas fêmeas está diretamente relacionada à incapacidade do macho alfa do harém em participar da alimentação de toda a prole normalmente produzida. A participação dos machos beta (30 - 40% da paternidade observada) permite reduzir o custo energético no cuidado da prole e aumentar a expectativa de sobrevivência individual (Burke *et al. op. cit.*).

Vários outros autores têm também empregado esta técnica com sucesso em aves. Autores como Burke e Bruford (1987), Jeffreys *et al.* 1987a e 1987b e Wetton *et al.* 1987 demonstraram que sondas derivadas de humanos podem ser usadas neste grupo. Wetton *et al.* (1987) aplicou-a em *Passer domesticus*, sugerindo seu poder no estudo de populações. Também Hillel *et al.* (1989) usou o DNA *fingerprinting* em aves domésticas constatando seu potencial. Ainda com relação a este grupo, Kuhnlein *et al.* (1989) usou DNA *fingerprinting* como ferramenta para determinar distância genética. Gibbs *et al.* (1991) usou esta mesma técnica para detectar locus de DNA hipervariável em aves através da hibridização com sonda MHC de gato. Grunder *et al.* (1994) determinou endocruzamento em gansos.

Avise e Nelson (1989), utilizando sondas de DNA mitocondrial, puderam demonstrar a diversidade gênica de grupos de "Dusky Seaside Sparrow" de todo o litoral atlântico dos Estados Unidos. Os padrões de bandas obtidos permitiram caracterizar uma subespécie tida como ameaçada de extinção, mantida sob proteção desde 1966, como uma população híbrida, resultado do cruzamento de duas outras subespécies vizinhas, colonizando uma área de transição.

Gibbs *et al.* (1990), também utilizando seqüências de minissatélites como sonda, demonstraram a dispersão gênica de "Red-winged blackbirds", bem como o *fitness* reprodutivo individual, demonstrando com eficiência que a poligamia é a estratégia reprodutiva encontrada pela espécie para a dispersão de genes silenciosos e/ou recessivos, com manutenção do equilíbrio gênico na população.

Pela possibilidade de estimar o conjunto gênico de uma espécie (*loci genes*) e delinear cruzamentos do tipo *back-cross*, o DNA *fingerprinting* pode ser utilizado para apurar o perfil genético de espécies mestiçadas, visando separar e recuperar estes perfis (*pedigree*) com alto padrão de resolução. Essa estratégia foi utilizada para caracterizar geneticamente espécies de *Canis rufus* (red wolf), *Canis lupus* (grey wolf) e *Canis latrans* (coyote). Os scores dos padrões de bandas obtidos permitiram certificar o já descrito cruzamento entre *Canis lupus* e *C. latrans*, separar os indivíduos miscigenados e delinear cruzamentos seletivos para restaurar o perfil genético de *C. lupus*, cujo declínio populacional e miscigenação reduziu os

os característicos da espécie a números alarmantes (Gittleman e Pimm 1991; Wayne e Mills 1991).

As aplicações do DNA *fingerprinting* não estão restritas à genética humana. Em outros campos da ciência podem potencialmente se beneficiar desta técnica (Dolf *et al.* 1992). Embora Gilbert *et al.* (1991) cita como aplicações potenciais de VNTRs, a determinação de paternidade para estudos sobre sistemas de acasalamento, diversidade genética com a finalidade de analisar endocruzamento histórico e particionamento geográfico e medidas de parentesco entre indivíduos em populações naturais.

A alta frequência dos VNTRs e seu modelo de dispersão pelo genoma os torna uma ferramenta adicional para a identificação e isolamento de genes, além do mapeamento cromossômico. Um excelente painel da exploração desses marcadores de DNA, encontra-se apresentado no genoma de camundongos. Estima-se que existem cerca de 100.000 cópias de VNTRs com tamanho médio de 100 bases, contendo pelo menos uma cópia do tetranucleotídeo (CA)_n espalhados no genoma desses animais (Hearne *et al.* 1991; Love 1990). Sondas contendo esse tetranucleotídeo junto a outros minissatélites de locus polimórficos, já permitiram a identificação de centenas de genes em camundongos, possibilitando perfeccionar o mapa genômico mais completo entre os mamíferos. A semelhança de fisiologia entre o organismo humano e a possibilidade de realizar cruzamentos seletivos, permitiu que a estrutura e funcionamento de vários genes de interesse clínico pudessem ser estudados nos camundongos, como a família das imunoglobulinas, receptores de superfície, diferenciação celular, etc (Kaestner *et al.* 1990). Esse grande potencial culminou na elaboração de mapas cromossômicos cada vez mais complexos, e na determinação do seqüenciamento de todo o genoma de camundongos, que também está sendo estendido, por outros grupos, para outros mamíferos e no homem através do projeto GENOMA.

Outra aplicação prática do DNA *fingerprinting* é a medida da diversidade genética em populações. A determinação da diversidade genética, é um importante fator que permite definir a melhor técnica de manejo a ser aplicada em populações naturais e cativas. Estudos em várias taxa demonstraram uma relação positiva entre heteroziguidade e outros parâmetros, como o aumento de longevidade, taxa de crescimento, fecundidade, eficiência metabólica e

abilidade global (Mitton 1978; Garton 1984; Mitton e Grant 1984). Em populações alhoradas, alguns fatores genético-econômicos necessitam ser selecionados para homoziguidade, como os alelos recessivos relacionados a um ganho econômico. Nestas populações, foi observado o aumento da taxa de efeitos deletérios provocados pelo endocruzamento, como aumento da mortalidade infantil, redução da altura, infertilidade e suscetibilidade a doenças (Wright 1977; Falconer 1982; Ralls e Ballou *et al.* 1984). De acordo com Merola (1994) a análise da diversidade genética tem sido vista como uma contribuição à sobrevivência dos indivíduos considerando a espécie, bem como também para o potencial evolutivo de uma espécie como um todo.

Em aves há um crescente número de seqüências de STRs clonadas e utilizadas para monitorar a dinâmica de populações selvagens. Dado a diversidade de espécies, a distância evolutiva entre elas e a rápida evolução das seqüências não codantes, o uso filogenético destas seqüências tem sido restrito, com maiores chances de sucesso para uso em espécies correlatas. No Brasil o isolamento de STRs de aves selvagens ainda é muito reduzido, o que incentiva a clonagem destas seqüências.

Diferentes métodos de isolamento de seqüências polimórficas têm sido utilizados, alguns laboriosos de difícil seleção, dificultando o acesso a diversas áreas, como a Botânica e Zoologia, como a tradicional clonagem em fagos com fragmentos de elevada massa molecular (Wong *et al.* 1986). Métodos mais modernos como clonagens de fragmentos com extremidades abruptas produzidos com digestão pelas enzimas *Hae* III, *Hinf* I, *Pvu* II, *Rsa* I são laboriosos e de baixa eficiência, principalmente quando requer seleção de tamanho de fragmentos (Ellegren *et al.* 1992b). Clonagem de fragmentos digeridos parcial ou totalmente com *Sau* 3A1, em vetores plasmidiais, também requerem seleção de tamanho de fragmentos (Coppieters *et al.* 1990). Seleção de fragmentos em agarose leva geralmente numa adição de impurezas no DNA, dificultando sua ligação ao vetor, com drástica redução na eficiência de clonagem.

Rubertis *et al.* (1993) elaborou uma técnica de clonagem com enriquecimento de seqüências contendo os nucleotídeos G+C, típicos dos minissatélites, através da seleção de fragmentos de 0.4 a 4 kb duplamente digeridos com as enzimas *Hind* III e *Sac* II. Embora

sa técnica tenha sido eficiente, ela é laboriosa, além de destruir parte das seqüências dos minissatélites GC-ricos.

Baseado na elevada incidência de sítios de restrição no genoma dos mamíferos por enzimas que reconhecem 4 a 5 nucleotídeos simples (Lindsay e Bird 1987), e na localização intrônica das seqüências repetitivas, foi delineada uma nova estratégia de clonagem através da redução do tamanho dos exons e enriquecimento de fragmentos contendo íntrons. A alta incidência de clivagem em seqüências simples, tipicamente exônicas, reduz o tamanho dos exons e restringe os fragmentos ao tamanho das seqüências repetitivas. Os fragmentos duplamente digeridos gerados, permitem uma maior eficiência na clonagem pela utilização de vetores simples e por apresentarem extremidades coesivas. A técnica desenvolvida pode ser ainda mais simplificada, podendo ser usada sem seleção de tamanho de fragmentos, e não requerendo grande treinamento em biologia molecular.

O objetivo deste capítulo é determinar e comparar a diversidade genética das populações amostradas de *Antilophia galeata*. Este capítulo, juntamente com o Capítulo 3, compõe parte das análises que visam testar a hipótese de que a distância genética entre populações é uma função da distância espacial e do tamanho da população.

Metodologia

Seleção da espécie a ser estudada

A espécie *Antilophia galeata* foi selecionada por ser típica de matas de galeria (Sick 1995) e por não ter uma ampla capacidade de dispersão, não ultrapassando, segundo Paulo de Tarso Z. Antas (comunicação pessoal) uma distância de 3 a 4 quilômetros em áreas abertas. Silva (1995) cita *A. galeata* como espécie dependente de habitats florestais, ou seja, cerradão, mata de galeria e matas secas, considerando-a, também, endêmica. Outro critério para a escolha desta espécie, foi o número de capturas em um ano de coleta (3 dias, dimensionalmente em cada área, utilizando 10 redes ornitológicas de captura), no decorrer do projeto de mestrado concluído em 95. Esta tabela mostra que *A. galeata* é a espécie mais abundante em matas de galeria, dentre as capturadas em redes. Além do mais, os dados por

servação por pontos com raio fixo, mostraram que *A. galeata* não ocorre em fragmentos muito pequenos, por exemplo, 3 ha (Ferreira e Cavalcanti, em preparação).

A família Pipridae, aparentada aos Cotingidae e Tyrannidae, evoluiu junto com diferentes tipos de matas neotropicais, assim como vários outros suboscines. As espécies que compõem são geralmente pequenas e apresentam forte dimorfismo sexual. Os machos são muito policromos e as fêmeas e os machos jovens são verdes (Sick 1985). Alimentam-se de matéria vegetal e de pequenos insetos e aranhas, sendo que as proporções de um ou de outro em alimentar pode variar entre os membros da família. *Antilophia galeata* é uma espécie altamente frugívora, embora uma proporção menor de artrópodes possa ser encontrada na dieta (aproximadamente 20% do volume estomacal total (Marini 1992a)). Apresentam uma distribuição única no Brasil sul-central (Marini 1992b), em capões, mata em terreno pantanoso, buritizais e matas de galeria (Figura 6). Nestas últimas, *A. galeata* é muito abundante tanto em matas secas quanto úmidas, principalmente onde o sub-bosque é mais denso (observação pessoal). Embora a maioria das espécies da família Pipridae explore o estrato médio de matas, *A. galeata* utiliza níveis mais altos, subindo às copas das árvores das matas de galeria.



Figura 06 - Distribuição de *Antilophia galeata* (linha vermelha, segundo Ridgely e Tudor 1989) em relação à distribuição do cerrado brasileiro (hachurado em preto, segundo Ribeiro e Walter 1998).

Capturas

As capturas foram feitas nas áreas já descritas no capítulo 1. Para este procedimento foi pedida a autorização junto ao IBAMA, para coleta e transporte de material biológico e para o anilhamento foi renovada a licença expedida pelo CEMAVE para esta finalidade (Licença nº 404). Em cada um destes fragmentos foi previamente aberta uma trilha com aproximadamente 140 metros com as condições de sombreamento necessárias para a instalação de uma bateria de 10 redes ornitológicas de captura. Em cada ponto amostrado, as coletas se deram por três dias consecutivos. Após o terceiro dia, foi aberta uma nova trilha em um novo ponto, distante pelo menos 200 metros do ponto anterior e a bateria de redes foi instalada neste novo local, uma vez que após três dias de coletas, a taxa de captura cai

sticamente pois os indivíduos capturados passam a evitar o local de captura. Em cada um
tes locais as redes foram abertas por volta das 06:00 horas da manhã, ficando abertas por
período de 6 horas consecutivas. Todos os indivíduos capturados foram identificados e
lhados com anilhas metálicas com identificação única cedidas pelo CEMAVE e conforme as
pecificações do **Manual de Anilhamento de Aves Silvestres** (IBAMA 1994). Os dados de
tura foram devidamente anotados em formulário próprio. Este procedimento permitiu a
ntificação do indivíduo capturado e recapturado e posteriormente irá, ainda, permitir uma
ssível recuperação de dados que podem vir a auxiliar em estudos sobre a biologia das
pécies anilhadas.

Coleta de sangue

Foi feita a coleta de sangue de todos os indivíduos capturados, com exceção das
pécies pertencentes à família Trochilidae, por serem, de modo geral, muito pequenos.
mbém não foi feita a coleta daqueles indivíduos de outras espécies que apresentassem
nais de *stress* intenso, como ofegação e batimento cardíaco muito acelerado. Nos demais
divíduos, foi feita a coleta de aproximadamente 70 μ L de sangue, por venicupuntura na veia
taquial, utilizando seringas descartáveis de 1 ml, utilizadas para aplicação de insulina. Este
lume foi transferido para tubos eppendorf com 50 μ L de EDTA. Cada eppendorf recebeu
numeração única correspondendo à mesma numeração das fichas de campo utilizadas para o
registros dos dados. Após cada dia de coleta este material foi estocado em freezer a -20°C
ara análises posteriores. Nenhuma seringa foi reaproveitada, pois o reaproveitamento
plicaria em risco de contaminação do material genético entre indivíduos, o que
omprometeria as análises.

Padronização da técnica do DNA Fingerprinting

Primeiramente foram usadas amostras de sangue de outras aves para
adronização da técnica de extração, uma vez que as amostras de sangue de *Antilophia*
aleata geralmente não ultrapassavam o valor de 80 μ L. Foram usadas amostras de *Phyllidor*
imidatus, *Phacellodomus ruber*, *Thamnophilus caerulescens*, *Turdus leucomelas*, *Turdus*
lbicollis, *Turdus rufiventris*, *Turdus nigriceps*, *Schiffornis virescens*, *Saltator similis*,

Antilopha galeata e *Arremon flavirostris*, selecionados em função da maior quantidade de sangue disponível nas amostras.

Na fase inicial, em que as proteínas são desnaturadas, foram usados HUGCN ou Azol (GIBCO), combinados a SDS (sodium dodecil sulfato), TWEN ou sarcosil. Foi também usada a proteinase K em variações de temperatura (45°C a 65°C) e período de incubações diferentes (1h, 2h e *overnight*). Foram testadas, ainda, reduções dos volumes das amostras, partindo-se inicialmente microextrações em eppendorffs de 1,6 ml. Finalmente chegou-se ao protocolo descrito em anexo, em tubos de vacutainer de 6 ml, por comportar os volumes de amostras considerados adequados no decorrer das várias tentativas de otimizar as extrações. No final da extração, se não havia a formação do pellet de DNA e o volume a ser descartado se mostrava muito viscoso, foram feitas novas reextrações com a finalidade de se complementar o material necessário para o uso com o DNA *fingerprinting*, seguindo o mesmo protocolo para as extrações.

Amostras de sangue de *Antilopha galeata* foram preservadas em tampão ACG (Sambrook *et al.* 1986) a -20°C. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol (Sambrook *et al.* 1986). O detalhamento dos protocolos utilizados encontram-se no anexo do capítulo. Cada amostra de DNA extraído foi quantificado visualmente após ter sido submetida a eletroforese e os resultados foram notados para cálculo do volume de amostra necessário para ser feito o DNA *fingerprinting*. Foram inicialmente consideradas as amostras com 10 ng de DNA porém algumas amostras com menor quantidade de DNA foram também usadas para se completar os 10 indivíduos necessários em cada área para esta técnica.

Para determinar qual a melhor enzima de restrição para gerar bandas discerníveis pelo padrão do DNA *fingerprinting*, o DNA de 2 indivíduos de *Antilopha galeata* foram digeridas com as enzimas de restrição *Alu*, *Hae III*, *Hinf I*, *Hind III* e *RSA* e hibridizada com sonda M13

Hibridações e lavagens foram feitas em forno de hibridação (BioRad). A membrana de nylon foi lavada com 2X SSC e pré-hibridizada em solução contendo caseína 1%, 0,5% de Tris-HCl 0,1M pH7,5/NaCl 0,5 M/3% de gelatina de pele de porco/0,05% de tween

w/v) a 65°C por 2 horas. A hibridização foi executada *overnight* a 42°C em solução de Dykes (Georges *et al.* 1988) contendo 200 ng de [α -³²P]ATP ou [γ -³²P]ATP (10⁹ cpm/ μ g DNA). Após a hibridização a membrana foi lavada 2X 5 min com 2X SSC/SDS 0,1% e 1X SSC/SDS 0,1% (42 a 65°C), secas e expostas contra filma XAR-5 (Kodak) com intensificador de tela por um período mínimo de 12 horas até 4 dias. Para re-hibridização, as membranas foram primeiro lavadas para remover a sonda com 0,1X SSC/SDS. As membranas foram checadas quanto a existência de radioatividade residual com um contador Geiger. Caso este resultado fosse positivo (radioatividade maior que a do ambiente - > 30 cps), o procedimento de lavagem era repetido.

A caracterização dos clones selecionados foi efetuada através de hibridização em *Southern-blot* com DNAs de animais não relacionados, preparado de acordo com Sambrook *et al.* (1986). O DNA foi fixado na membrana por *cross-link*, e o nylon lavado com 2X SSC e pré-hibridizado por 2 a 3 horas em solução de bloqueio a 65°C sem pirofosfato de sódio. A hibridização foi feita *overnight* a 42°C em solução de Dykes (Georges *et al.* 1988) contendo 200 ng da sonda marcada com [α -³²P]ATP (10⁹ cpm/mg DNA). Após a hibridização a membrana foi lavada duas vezes (5min) com 2X SSC/SDS 0.1% e uma vez com 1X SSC/SDS 0.1% (42 to 55°C), seca e exposta contra filme XAR-5 (Kodak) com intensificador por 12 horas até 4 dias. Para re-hibridização, a membrana foi lavada com solução de 0.1X SSC/SDS 0.1% a 65°C para remoção do probe, até que a contagem fosse inferior a 30 cps.

Análise dos dados

Variabilidade genética

Para a análise dos dados foi montada uma matriz de presença/ausência de bandas computadas a partir da autoradiografia relativa às várias populações amostradas nos fragmentos de matas de galeria já citadas no Capítulo 1. Foram consideradas bandas entre 230 e 2 kb.

Para discriminação da variabilidade entre as populações das três áreas foram usados o índice de bandas compartilhadas (*band-sharing*) entre indivíduos, segundo Muntington *et al.* (1991) e Haberfeld *et al.* (1991), segundo a fórmula que se segue:

$$= 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

sendo:

n_{xy} = número de bandas entre cada par de indivíduos

$n_x + n_y$ = número total de bandas em ambos os indivíduos

Foi calculada a frequência média de bandas (\bar{v}_i) e o índice de variabilidade (V), segundo Kuhnlein *et al.* (1989).

Além dos parâmetros anteriores, foram calculados o poder de individualização (\bar{v}_i^m), sendo m = número médio de bandas por indivíduos, a probabilidade de dois indivíduos não relacionados tenham mesmo perfil de bandas.

O valor APD (*average percent of difference*), foi calculado segundo Ellegren *et al.* (1992) e Gilbert *et al.* 1991, computando-se o número de fragmentos diferentes entre dois indivíduos e dividindo-se este valor pelo número de fragmentos presentes nos dois indivíduos. As diferenças no número médio de bandas foram testadas pelo teste t considerando-se um nível de significância de 0,5%.

Foi calculada também a distância genética entre os pares de populações, segundo Kuhnlein *et al.* 1989, conforme fórmulas abaixo:

$$= -\ln(I)$$

$$= \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \frac{2V_i^{(1)} \cdot V_i^{(2)}}{[V_i^{(1)}]^2 + [V_i^{(2)}]^2}$$

sendo:

N = número de bandas nas duas populações

$V_i^{(1)}$ = frequência da banda i na população 1

$V_i^{(2)}$ = frequência da banda i na população 2

Análise de Componentes Principais

Foi feita uma análise de componentes principais (PCA) não centrada, também com a finalidade de confirmação da diferenciação entre áreas. Foi considerada a matriz de presença/ausência de bandas nas várias classes de peso molecular, a saber: 23 a 9 kb, 9 a 6 kb, 6 a 4 kb e 4 a kb. A PCA foi feita no software MVSP Plus, versão 2.0a.

Resultados

Padronização da técnica do DNA Fingerprinting

Para determinar qual a melhor enzima de restrição para gerar bandas discerníveis pelo padrão do DNA *fingerprinting*, o DNA de 2 indivíduos de *Antilophia galeata* foram digeridas com as enzimas de restrição *Alu*, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III e *RSA* e hibridizada com sonda M13 (Figura 7).

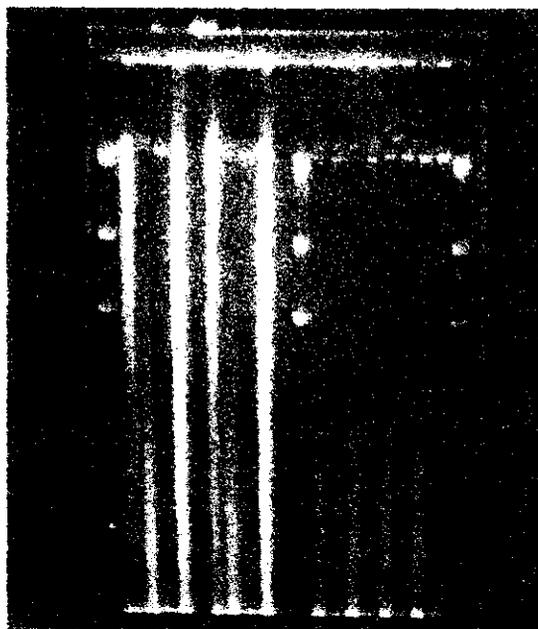


Figura 07 – Teste de enzimas de restrição usando *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III e *RSA*.
Indivíduo 1: Slot 1 – Padrão de massa molecular (PMM); 2 - *Alu* I; 3 - *Hae* III; 4 - *Hinf* I; 5 - *Hind* III; 6 - *RSA*; Indivíduo 2: Slot 6 - *Alu* I; 7 - *Hae* III; 8 - *Hinf* I; 9 - *Hind* III; 10 - *RSA*; demais slots - *Turdus* sp.

Foi observado padrão de bandas polimórficas do tipo DNA *fingerprinting* multilocus quando o DNA foi digerido com as enzimas **Hae III** e **Hinf I**. A hibridização com DNAs digeridos com **Alu I**, **Hind III** e **Rsa** resultou num rastro em toda a faixa de peso molecular (Figura 8). Apesar da seleção de clones ter sido efetuada com oligonucleotídeos sintéticos contendo seqüências típicas de microssatélites, seqüências de minissatélites puderam ser selecionadas, como demonstrado pela Figura 8.

Para a extração da quantidade de DNA suficiente para as análises de DNA *fingerprinting*, foram processadas 261 amostras de sangue de *Antilophia galeata* uma vez que foram feitas repetições para alguns indivíduos.

Após a extração, todas as amostras que apresentaram pellet de DNA foram quantificadas e o resultado desta quantificação se encontra na Tabela 11, no anexo do capítulo. Em função da quantidade de DNA extraído em cada amostra não foi possível obter padrões de bandas para todas as populações nas quais foram coletadas amostras de sangue.

A partir da digestão e hibridação, foi possível obter padrões de bandas pela técnica do DNA *fingerprinting* para três das sete populações analisadas. O padrão obtido para os sete indivíduos da população da mata de galeria do Riacho Fundo se encontra na Figura 9 e aquele obtido para as populações das matas de galeria de Rio Vermelho e Sobradinho, na Figura 10.

PPM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 PM 11 12 13 14 15 16 17 18 PPM

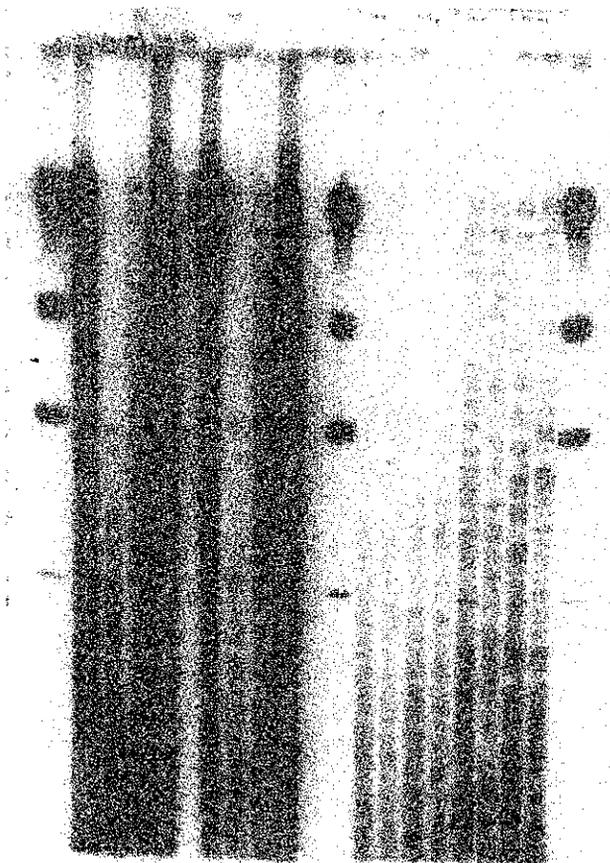


Figura 08 - DNA *fingerprinting* de *A. galeata* (AG), *T. rufus* (TC) e *T. rufiventris* (TR) hibridizados com a sonda AG9. 1 a 5 e 6 a 10 AG digerido com enzimas *Alu I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Hind III* e *Rsa*; 11 a 12 e 13 a 14 TC digerido com *Hae III* e *Hinf I*; 15 a 16 e 17 a 18 TR digerido com *Hae III* e *Hinf I*.



Figura 09 – Padrão de bandas obtido pela técnica do DNA *fingerprinting* para a população da mata de galeria do Riacho Fundo.

10 - Silvânia, 06-1-2001

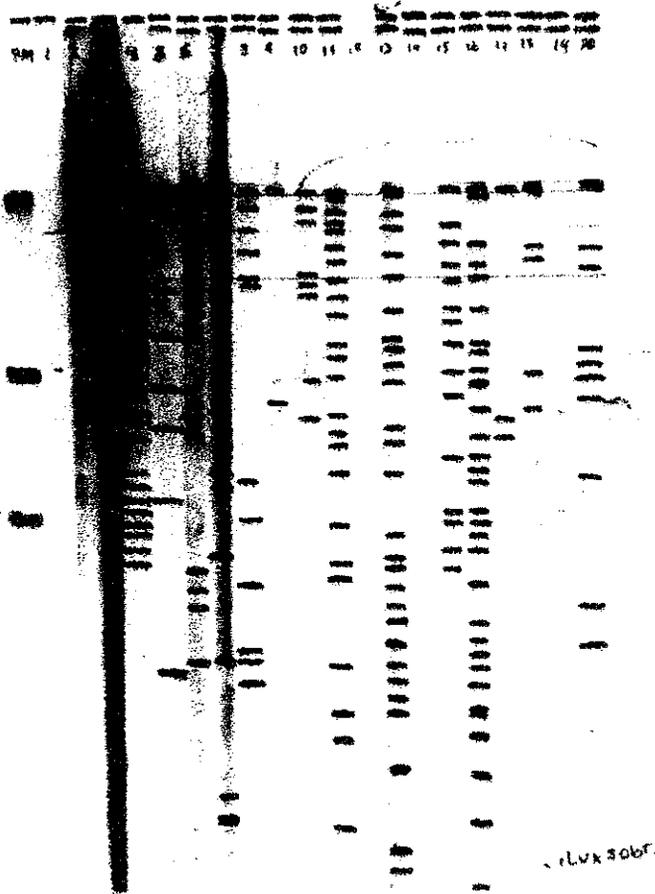


Figura 10 – Padrão de bandas obtido pela técnica do DNA *fingerprinting* para a população das matas de galeria de Silvânia e Riacho Fundo.

Variabilidade genética

Foi possível obter informações sobre presença/ausência de bandas em 3 das 7 populações analisadas inicialmente (Tabela 12, no anexo do capítulo), sendo 7 indivíduos referentes à população de Riacho Fundo, 8 de Rio Vermelho e 7 de Sobradinho. Observando os resultados das análises apresentadas na Tabela 13, podemos perceber que as três áreas apresentaram aproximadamente a mesma variabilidade genética, embora Rio Vermelho tenha apresentado um valor ligeiramente mais elevado (0,87). Ao analisarmos o desvio-padrão do número médio de bandas, podemos notar que as três populações apresentaram similaridade quanto a este critério (aproximadamente 50% do número médio de bandas). Examinando o coeficiente de bandas compartilhadas, nota-se que a população do Riacho Fundo apresenta um maior valor para esta variável.

Tabela 13 – Resultado das análises a partir da matriz de presença/ausência gerada pelo DNA *fingerprinting* para as matas de galeria de Rio Vermelho, Sobradinho e Riacho Fundo. P_i = Poder de individualização; P_a = probabilidade de 2 indivíduos tomados ao acaso possuam mesmo perfil de bandas; P_r = Probabilidade de 2 indivíduos relacionados exibam o mesmo perfil de bandas; B_S = coeficiente de compartilhamento de bandas.

Área	Média de bandas/lane	Média de bandas/ind. genética	Var. genética	P_a	P_r	P_i	B_S
Rio Vermelho	0,94 DP = 1,00	11,14 DP = 6,61	0,873x10 ⁻¹¹	4x10 ⁻³	4x10 ⁻⁹	0,177	DP = 0,081
Sobradinho	1,31 DP = 0,88	14,88 7,85	0,838x10 ⁻¹²	3x10 ⁻⁵	2x10 ⁻¹³	0,141	DP = 0,127
Riacho Fundo	2,45 DP = 1,55	20,5 DP = 10,52	0,845,1x10 ⁻⁴	5,1x10 ⁻⁴	9,9x10 ⁻⁶	0,348	DP = 0,10

Comparando-se a média de número de bandas em cada população, foram obtidos os seguintes resultados, considerando-se um nível de significância igual a 5%:

Rio Vermelho x Sobradinho: as diferenças no número médio de banda não foram significativas ($t_{\text{calculado}} = 1,14$; $GL = 18$; $t_{\text{crítico}} = 2,10$)

Sobradinho x Riacho Fundo: as diferenças no número médio de bandas não foram significativas ($t_{\text{calculado}} = 1,27$; $GL = 15$; $t_{\text{crítico}} = 2,13$)

Rio Vermelho x Riacho Fundo: as diferenças no número médio de bandas foram significativas ($t_{\text{calculado}} = 2,28$; $GL = 15$; $t_{\text{crítico}} = 2,13$)

Analisando os dados para estas três áreas, podemos notar que a população de Riacho Fundo é a que possui menor APD. Observando as comparações das três áreas tomadas duas a duas, percebe-se que a população da mata de galeria de Rio Vermelho possui uma maior diferenciação em relação à de Sobradinho e Riacho Fundo (maior APD) do que entre Riacho Fundo e Sobradinho, que podem ser consideradas populações mais próximas entre si.

Tabela 14 – Resultado com o APD calculado para as populações de Rio Vermelho, Sobradinho e Riacho Fundo tomadas isoladamente e duas a duas.

<i>Área</i>	<i>APD</i>
Rio Vermelho	81,13
Sobradinho	80,4
Riacho Fundo	60,3
Rio Vermelho x Sobradinho	83,53
Rio Vermelho x Riacho Fundo	85,11
Riacho Fundo x Sobradinho	78,36

Como resultado dos cálculos de distância genética, temos que entre a população de Riacho Fundo e Sobradinho, foi encontrada uma distância genética = 1,66. Entre Rio Vermelho e Riacho Fundo, este valor foi igual a 1,47 e entre Rio Vermelho e Sobradinho foi de 0,97.

PCA

A Tabela 15 apresenta o percentual de variância e o percentual de variância acumulada para cada eixo gerado pela auto-análise da PCA, a partir da matriz da presença/ausência de bandas para as matas de galeria das áreas Rio Vermelho, Sobradinho e Riacho Fundo. A somatória da variância dos 3 primeiros eixos representou apenas 48,07 % da variância do sistema. Na Figura 11 podemos perceber que houve uma separação mais evidente da mata do Riacho Fundo em relação às demais (Rio Vermelho e Sobradinho) com uma variância acumulada de 40,82% nos dois primeiros eixos. Este resultado pode ser observado plotando-se os componentes 1 e 2.

Tabela 15 – Dados de variância % e % cumulativa nos 4 primeiros eixos gerados pela PCA feita a partir dos dados de presença/ausência de bandas geradas pelo DNA *fingerprinting* em 3 áreas de amostragem.

Eixo	Variância	
	%	% acumulada
1	32,27	32,27
2	8,55	40,82
3	7,25	48,07
4	6,67	54,74

Discussão

Estudos envolvendo aloenzimas têm revelado diferenciação genética mesmo em curtas distâncias dentro de vários grupos de Passeriformes da Amazônia e México. Escalante-Pliego (1991) tem documentado substanciais diferenças em trabalhos envolvendo isoenzimas entre populações disjuntas de *Geothlypis* na América do Sul e Central e Hackett e Rosenberg (1990) demonstraram pronunciada subdivisão geográficas e diferenciação em Formicariidae (Seutin 1993).

PCA com matriz de presença/ausência de bandas

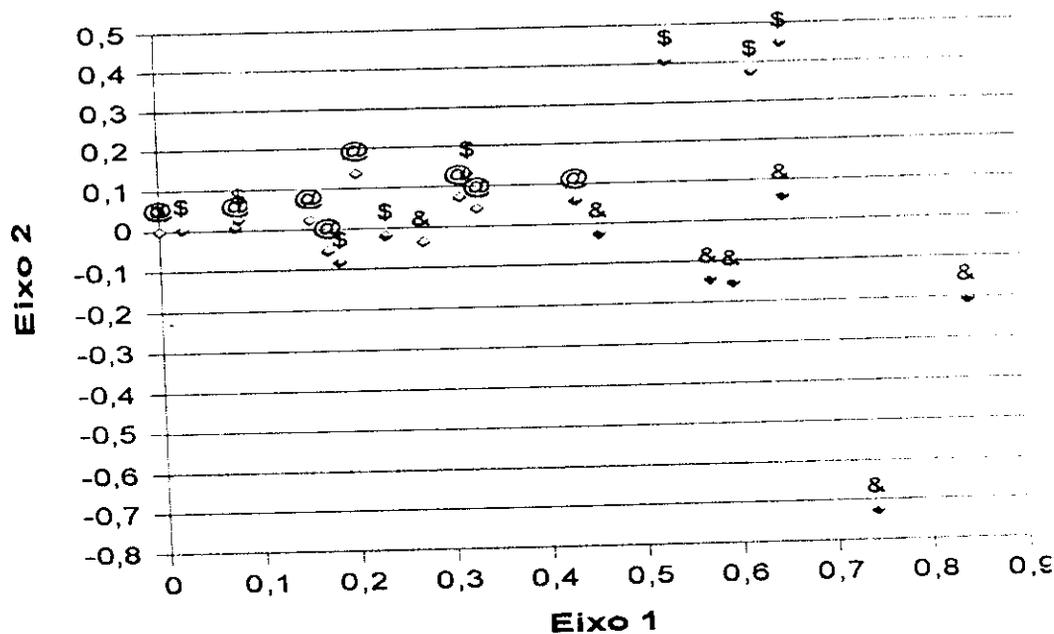


Figura 11 – Representação gráfica dos resultados da PCA feita usando a matriz de presença/ausência de bandas geradas pelo DNA *fingerprinting* para as matas de galeria das áreas Rio Vermelho (@), Sobradinho (\$) e Riacho Fundo (&). Pontos A, B, C, L, N sobrepõem-se no ponto 0,0. Eixos 1 e 2.

Vários autores têm usado com sucesso análises de pedigree demonstrando que DNA *fingerprinting* fornece um conjunto estável de marcadores genéticos, como por exemplo Degnan (1993), que usou esta técnica para estudar populações de *Zosterops lateralis* (Aves: Zosteropidae); Pereira *et al.* (1996) também usou esta técnica para estudar populações de *Pipile jacutinga* (Cracidae, Aves); Grunder *et al.* 1994 estimou endogamia e parentesco em gansos, entre outros.

Comparando os dados da variabilidade genética, podemos considerar que as três populações analisadas apresentam valores bastante similares entre si. Considerando-se que as alterações da matriz ambiental no Planalto Central tenham se intensificado na década de 50, com a construção de Brasília, podemos supor que estas não atingiram ainda

um patamar suficiente para interferir na variabilidade genética destas populações. Podemos supor, ainda, que o período de tempo transcorrido entre as modificações ambientais e estas análises não tenha sido o suficiente para que os resultados se expressem neste componente do perfil genético.

O coeficiente de bandas compartilhadas e as análises de frequência de bandas são estimativas de diversidade, pois bandas com deslocamentos similares em indivíduos diferentes podem ser consideradas alelos idênticos se a diferença no deslocamento entre elas está dentro de um limite de ± 1 mm (Hermans *et al.* 1993). Pena e Chakraborty (1994) indicam que para estudos genéticos envolvendo DNA *fingerprinting*, assume-se que bandas observadas em gel são alelos de diferentes loci e comportam-se independentemente. Segundo Zhu *et al.* (1996), a similaridade do DNA *fingerprinting* entre indivíduos é um bom indicador de endogamia. Em estudos, foi observado que o DNA *fingerprints* de uma população humana em endocruzamento foi mais similar do que em relação a populações em *outbreeding*. Segundo Kuhnlein *et al.* (1990), a frequência de bandas e a frequência alélica estimadas a partir de DNA *fingerprints* foi altamente correlacionada com o coeficiente de endocruzamento em linhagens de galinhas de uma maneira linear. O coeficiente de compartilhamento de bandas foi também correlacionada ao endocruzamento, embora em um padrão não linear. Este autor, analisando a correlação entre o índice de compartilhamento de bandas do DNA *fingerprinting* e o endocruzamento, encontrou um valor para o coeficiente de correlação igual a 0,983. A análise de regressão usando um modelo linear a partir de dados do índice de compartilhamento e endocruzamento levou a um modelo linear altamente significativo.

Desta forma, este coeficiente foi usado como uma estimativa da endogamia entre as várias áreas. Se compararmos os valores encontrados para o coeficiente de bandas compartilhadas, podemos perceber que a população do Riacho Fundo apresenta um valor bastante mais elevado (quase o dobro das outras duas áreas). Considerando-se o elevado coeficiente de correlação entre este coeficiente e a endogamia obtido por outros autores, podemos supor que esta área apresenta um teor mais elevado para esta variável. Correlacionando os dados citados por Gilbert *et al.* (1994) com as populações analisadas de *Antilophia galeata*, aquela que pertence à mata de Rio Vermelho e Sobradinho apresentaram coeficiente de compartilhamento de bandas em torno do patamar (Rio Vermelho = 0,177)

para populações com indivíduos com grau de parentesco próximo a tios e tias (Sobradinho = 0,141), porém a população do Riacho Fundo apresentou um coeficiente de compartilhamento bastante superior (0,348) que estaria entre populações com indivíduos com grau de parentesco entre avós e meio irmãos e filhos e pai ou filhos e mãe.

Gilbert *et al.* (1994) cita os dados que se seguem:

BS = 0	→	indivíduos não relacionados
= 0,5	→	filhos e pai ou filhos e mãe
= 0,25	→	avós e meio irmãos
= 0,125	→	tios e tias
= 0,0625	→	primos de 1° grau

Uma vez que a população de Riacho Fundo apresentou valores intermédios a estas classes determinadas por Gilbert *et al.* (1994), podemos supor que os indivíduos que compõem esta população apresentam um maior percentual de indivíduos relacionados entre si do que as outras duas populações.

Pereira (1996) encontrou que o coeficiente de bandas compartilhadas para espécies não ameaçadas está em torno de 0,17 (Pereira apud Birkhead *et al.* 1990; Burke e Bruford 1987; Miyaki *et al.* 1993) embora para algumas espécies esteja em torno de 0,26 (Pereira apud Quinn *et al.* 1994; Warketin *et al.* 1994). Riacho Fundo apresentou um coeficiente de compartilhamento bastante superior (0,348) ultrapassando em muito o valor considerado para populações não ameaçadas.

Muitas tentativas têm sido feitas para incorporar perspectivas geográficas aos métodos de estudos de variação de DNA (Bertorelle e Barbujani 1995). Estudos de variação genética em fragmentos pequenos e isolados pode gerar oportunidades para avaliar o efeito de processos pertinentes à diferenciação populacional (Slatkin 1989) até mesmo para a conservação genética (Degnan 1993). Estas diferenças encontradas entre subpopulações podem levar a planejamentos de estratégias de conservação diferentes caso a tomada de decisão seja feita localmente ao invés de regionalmente, como por exemplo a implantação ou

manutenção de corredores entre reservas ou a translocação de indivíduos potencializando um menor nível de endogamia.

Considerando-se que uma das razões para a endogamia seja o isolamento da população, e que no entorno desta área exista aproximadamente 63% de ambientes alterados, os dados sugerem que esta população pode já estar sofrendo as consequências do isolamento. Este isolamento pode ocorrer em decorrência da necessidade de um maior deslocamento para que a migração entre áreas ocorra com sucesso. Os dados obtidos sugerem que a população de Riacho Fundo, certamente está em processo de endogamia embora não se possa afirmar que este processo seja em função da matriz existente ou por processos anteriores às alterações atuais.

Gilbert *et al.* (1991) usa o APD para quantificar a diversidade genética de populações porque este valor varia de forma diretamente proporcional à heterozigidade média da população, que é a forma tradicional de medir este tipo de variação. Porém, para estimativa de parentesco, este mesmo autor usa o percentual médio de similaridade = $100 - \text{APD}$. Analisando Columbiformes, Miyamoto *et al.* (1994) cita que, comparando-se pares de indivíduos, o valor esperado é igual ou superior a 70% para indivíduos não relacionados e igual a 50% para parentes de primeiro grau. Como regra geral, aves comumente exibem menos divergência genética que outras classes de vertebrados (Avice e Zink 1988). Ainda assim, foi possível diferenciar as três populações analisadas. Considerando-se os resultados encontrados, a população de Riacho Fundo apresenta um menor percentual de diferença intrapopulacional, se comparada com Rio Vermelho e Sobradinho. Ao compararmos as áreas tomadas duas a duas, a população de Rio Vermelho x Sobradinho apresenta um percentual de diferença maior que as combinações entre Sobradinho e Riacho Fundo. Se tomarmos este índice como passível de mensurar a diversidade genética, podemos considerar que Riacho Fundo, que embora não seja o fragmento de menor área, possui a mata mais isolada, o que pode ser notado pela observação das imagens de satélite apresentadas nas Figuras 02 e 03. Como a delimitação das matas teve que ser arbitrada, podemos observar que tanto Rio Vermelho quanto Sobradinho estão mais interligadas com outras matas nas proximidades que podem funcionar como possíveis fontes colonizadoras e como um acréscimo real no sistema de matas de galeria, por estarem interligadas. Observando também os acréscimos nas

distâncias potencialmente percorridas por indivíduos de *Antilophia galeata*, a mata do Riacho do Sudoeste é a que apresentou maior acréscimo quanto a este aspecto. A população de Riacho do Sudoeste apresentou, ainda, uma maior distância genética em relação às demais, que pode estar, também, correlacionada a estes fatores já citados para diversidade genética.

Um número crescente de estudos tem tido como alvo populações finitas. A fragmentação de habitat subdivide populações em unidades menores sujeitas a riscos demográficos e genéticos (Sjögren e Wyöni 1994). Fragmentos de habitats terrestres são, muitas vezes tratados como ilhas de ambientes naturais imersas em uma matriz de ambiente degradado. Assim, as consequências de habitar locais fragmentados é de importância fundamental para ecologistas e conservacionistas, principalmente no que diz respeito às consequências genéticas destas ocorrências para as várias populações residentes nestes locais. Anteriormente às alterações ambientais geradas e intensificadas pela construção de Brasília no centro-oeste, e a expansão da fronteira agrícola através do cerrado, certamente as várias populações aí existentes estivessem sofrendo apenas o isolamento por distância, uma vez que as matas de galeria formam uma rede de comunicação não só local como regional conectando o cerrado a outros biomas brasileiros, como floresta Amazônica e Atlântica. Este quadro certamente está sofrendo alterações, pois a razão entre ambiente alterado e natural mostrou-se diferente ao compararmos dados de autores como Eiten (1972), que cita que o cerrado é o ambiente mais abundante do Cerrado (75%) e, atualmente, segundo as análises baseadas em imagem de satélite Landsat TM de 95, acusa um valor de apenas 20%.

Quando a espécie decai para o patamar de status vulnerável/rara (IUCN) uma das causas é que a população era originalmente grande e contínua e foi reduzida para fragmentos pequenos e isolados. Em tais situações a população pode ser alvo de mudanças, mesmo se as causas de declínio originais forem interrompidas, como caça excessiva e destruição ambiental. As várias causas principais que fazem com que uma população pequena esteja sujeita a variações estocásticas, como variação ambiental, eventos catastróficos, deriva genética e endogamia podem ter um efeito de retroalimentação negativa levando a população rapidamente à extinção (Pereira 1996).

Segundo Hadrys e Schierwater (1992), tem sido questionado se o DNA *fingerprinting* é tão importante para estudos comportamentais e populacionais e que, mesmo assim, infelizmente, suas aplicações estejam limitadas a poucos laboratórios especializados ao invés de ser utilizada por uma extensa comunidade trabalhando nesta área. Espera-se que os maiores progressos desta metodologia ocorra em duas direções: (1) aumento no poder de análise por unidade de esforço, e (2) simplificação da tecnologia que irá refletir na redução dos custos.

Conclusões

A partir da análise dos resultados, foi possível concluir que considerando a variabilidade genética, não existem diferenças significativas entre as três populações analisadas.

Considerando-se aspectos como o coeficiente de bandas compartilhadas e o APD, foi possível perceber que a população de Riacho Fundo encontra-se bastante diferenciada em relação às àquelas de Rio Vermelho e Ribeirão Sobradinho. Embora o número de populações sobre as quais foi possível obter dados de estrutura genética das populações seja insuficiente para testar possíveis influências de área e grau de isolamento, certamente o fator diferenciador é a interligação entre matas que possivelmente esteja compensando deficiências em tamanho e pressão antrópica,

Outras análises indicam que a população do Riacho Fundo apresenta características diferentes das demais, como a PCA, que discriminou bem esta população em relação às demais. Também a distância genética apresentou valores mais elevados quando a análise considerava a população de Riacho Fundo como componente do par analisado, bem como o número médio de bandas na população que, para esta população, apresentou diferença estatisticamente significativa.

Também as análises espaciais indicaram a mata de galeria do Riacho Fundo como das mais isoladas a partir da análise do entorno e do acréscimo percentual nas

âncias potencialmente percorridas por possíveis indivíduos migrantes e, sequentemente, agentes de fluxo gênico.

Correlacionando as análises espaciais, existe a possibilidade de que os processos de fragmentação possam estar causando efeitos nocivos a subpopulações de *Antilopha leata* no que diz respeito ao caráter endogamia, que pode estar aumentado em alguns fragmentos mais isolados em relação aos demais.

Através das análises moleculares foi possível caracterizar algumas populações da espécie considerada e correlacionar suas características genéticas com variáveis espaciais a partir de dados secundários.

Bibliografia

- Wise, J. C., Arnold, J., Bali, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. e Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18:489-522.
- Wise, J. C. e Zink, R. M. 1988. Molecular genetic divergence between avian sibling species: king and clapper rails, long-billed and short-billed dowitchers, boat-tailed and great-tailed grackles, and tufted and black-crested titmice. *The Auk*, 105:516-528.
- Wise, J. e Nelson, W. S. 1989. Molecular genetic relationships of the extinct dusky seaside sparrow. *Science*, 243(4891):646-648.
- Bertorelle, G. e Barbujani, G. 1995. Analysis of DNA diversity by spatial autocorrelation. *Genetics*, 140:811-819.
- Bruford, M. W. e Burke, T. 1994. Minisatellite DNA markers in the chicken genome. I. Distribution and abundance of minisatellites in multilocus DNA fingerprint. *Animal Genetics*, 25:381-389.
- Burke, T. e Bruford, M. W. 1987. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327:149-15.
- Burke, T. 1989. DNA fingerprinting and other methods for the study of mating success. *Trends. Ecol. Evol.*, 4:139-144
- Burke, T., Davies, N. B., Bruford, M. W. e Hatchwell, B. J. 1989. Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature*, 338:249-250.
- Coppieters, W., Vandeweghe, A. e Depicker, A. 1990. A hypervariable pig DNA fragment. *Animal Gen.*, 21(1):29-38.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A. e Yezerinac, S. M. 1997. Isolation of microsatellite DNA marker from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79:506-514.
- Degnan, S. M. 1993. Genetic variability and population differentiation inferred from DNA fingerprinting in silvereyes (Aves: Zosteropidae). *Evolution*, 47(4):1105-1117.
- Devlin, B., Risch, N. e Roeder, K. 1991. Estimation of allele frequencies for VNTR loci. *Am. J. Genet.*, 48:662-676.
- Dolf, G., Glowatski, M.-L. e Gaillard, C. 1992. DNA fingerprinting in cattle using the probe pV47. *Animal Genetics*, 23:63-69.

- ington, E. A., Gal, O., Plotsky, Y., Haberfeld, A., Kirk, T., Goldberg, A., Lavi, U., Cahaner, A., Siegel, P. B. e Hillel, J. 1991. DNA fingerprints of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. *Anim. Genetics*, 24:247-257.
- n, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Bot. Rev.*, 38(2):201-341.
- gren, H. 1991. Fingerprinting birds' DNA wiht a sinthetic polynucleotide Probe (TG)_n. *Auk*, 108:956-981.
- gren, H., Andersson, L., Hohansson, M. e Sandberg, K. 1992. DNA fingerprinting in horses using a simple (TG)_n probe and its application to population comparisons. *Animal Genetics*, 23:1-9.
- alante-Pliego, B. P. 1991. Genetic differentiation in yellowthroats (Parulinae: Geothlypis). *Acta XX Congressus Internationalis Ornithologici*. Christchurch, New Zealand. P 333-343.
- oup, A., Garnery, L., Solignag, M. e Cornuet, J-M. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140:679-695.
- coner, D. S. 1982 *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman House, Burnt Mill, Essex, UK.
- rton, D. W. 1984. Relationship between multiple locus heterogozity and physiological energetis of growth in the estuarine gastropod thais-haemastoma. *Physiol. Zool.*, 57(5):530-543.
- orges, M, Lequarré, A. -S, Castelli, M., Hanset, R. e Vassart, G. 1988. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cell Genet* 47:127-131.
- obs, H. L., Wheatherhead, P. J., Boag, P. T., White, B. N., Tabak, L. M. e Hoysak, D. J. 1990. Realized reproductive suces of polygynous red-winged blackbirds revealed by DNA markers. *Science*, 250(4986):1394-1397.
- obs, H. L., Boag, P. T., White, B. N., Weatherhead, P. J. e Tabak, L. . 1991. Detection of a hypervariable DNA locus in birds by hybridization with a mouse MHC probe. *Mol Biol Evol* 8(4):433-446.
- lbert, D. A., Packer, C., Pusey, A. E., Stephens, J. C. e O'Brien, S. J. 1991. Analytical DNA fingerprinting in lions: parentage, genetic diversity, and kinship. *Journal of Hered.*, 82:378-386.
- ttleman, J. L. e Pimm, S. L. 1991. Conservation biology – crying wolf in North America. *Nature*:351(6327):524-525.

- Under, A. A., Sabour, M. P. e Gavora, J. S. 1994. Estimates of relatedness and inbreeding in goose strains from DNA fingerprints. *Animal Genetics*, 25:81-88.
- Haberfeld, A., Cahaner, A., Yoffe, O., Plotsky, Y. e Hillel, J. 1991. DNA fingerprints of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. *Animal Genetics*, 22:299-305.
- Haberfeld, A., Dunnington, E. A. e Siegel, P. B. 1992. Genetic distances estimated from DNA fingerprints in crosses of White Plymouth Rock chickens. *Animal Genetics*, 23:167-173
- Madry, H., Balick, M. e Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1:55-63.
- Maig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79(2):413-425.
- Manotte, O., Bruford, M. W. e Burke, T. 1992. Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. *Heredity*, 68:481-494.
- Marne, C. M., McAleer, M. A., Love, J. M., Aitman, T. J., Cornall, R. J., Ghosh, S. Knight, A. M., Prins, J. B e Todd, J. A. 1991. Additional microsatellite markers from mouse genome mapping. *Mamm. Genome*, 1:273-282.
- Hermans, I. F., Morris, C. A., Chambers, G. K., Towers, N. R. e Jordan, T. W. 1993. Assessment of DNA fingerprinting for determining diversity in sheep populations. *Animal Genetics*, 24:385-388.
- Hillel, J., Plotzy, Y., Haberfeld, A., Lavi, U., Cahaner, A. e Jeffreys, A. J. 1989. DNA fingerprints of poultry. *Anim. Genet.*, 20:145-155.
- IBAMA. 1994. **Manual de Anilhamento de Aves Silvestres**. Brasília. DF. 146p.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. e Thein, S. L. 1985a. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature (London)*, 316:76-79.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. e Thein, S. L. 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature (London)*, 316:76-79.
- Jeffreys, A. J. 1987a. Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Bioch. Soc. Trans.*, 15:309-317.
- Jeffreys, A. J., Hartley, N. E., Wilson, V., Bulfield, G. e Taylor, B. A. 1987b. Mouse DNA 'fingerprints': analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acid Research*, 15:2826-2836.

- Kaestner, K. H., Christy, R. J. e Lane, M. D. 1990. Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:251-255.
- Kuhnlein, U., Dawe, Y., Zadworny, D. Dawe, e Gavoras, J. S. 1989. DNA fingerprinting – a tool for determining genetic distances between strains of poultry. Theor Appl Genet, 77(5):669-672.
- Kuhnlein, U., Zadworny, D., Dawe, Y. Fairfull, R. W. e Gavoras, J. S. 1990. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting – a development of a calibration curve using defined strains of chickens. Genetic, 125(1):161-165.
- Lindsay, S. e Bird, A. P. 1987. Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA. Nature, 327:330-338.
- Love, J. M., Knight, A. M., McAleer, M. A. e Todd, J. A. 1990. Towards construction of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. Nucleic Acid Research, 18:4123-4130.
- Marinelli, L., Messier, F. e Plante, Y. 1992. Use of DNA fingerprinting to determine parentage in muskrats (*Ondatra zibethicus*). Journal of Heredity, 83:356-360.
- Marini, M. A. 1992a. Notes on the breeding and reproductive biology of the helmeted manakin. Wilson Bull 104(1):168-173.
- Marini, M. A. 1992b. Seleção de habitat e socialidade em *Antilophia galeata* (Aves - Pipridae). Condor 94(1):151-158.
- Merola, M. 1994. A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. Conservation Biology, 8(4):961-971.
- Millar, C. D., Lambert, D. M., Bellamy, A. R., Stapleton, P. M. e Young, E. C. 1992. Sex-specific restriction fragments and sex ratios revealed by DNA fingerprinting in the brown skua. Journal of Heredity, 83:350-355.
- Mitton, J. B. 1978. Relationship between heterozygosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural populations. Nature, 273:661-662.
- Mitton, J. B. e Grant, M. C. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. Annual Review of Ecology and Systematics, 15:479-499.

- Myiaki, C. Y., Hanotte, O., Wajntal, A. e Burke, T. 1993. Characterization and applications of DNA fingerprinting in Brazilian endangered macaws. In: Pena, S. D. J., Chakraborty, R., Epplen, J. T., Jeffreys, A. J. **DNA fingerprinting: The State of the Science**. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 395-401.
- Kanamori, M. M., Allard, M. W. e Moreno, J. A. 1994. Conservation genetics of the plain pigeon (*Columba inornata*) in Puerto Rico. *Auk*, 111:910-916.
- Epplen, R. L., Koenig, W. D., Zink, R. M. e Marten, J. A. 1985. Genetic variation and parentage in a California population of Acorn Woodpecker. *Auk*, 102:305-312.
- Kanamori, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. e White, R. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235:1616-1622.
- Kanamori, Y., Carlson, M., Krapcho, K., Kanamori, M. e White, R. 1988. New approach for isolation of VNTR marker. *Am. J. Genet.*, 43:854-859.
- Pena, S. D. J., Macedo, A. M., Gontijo, N. F., Medeiros, A. M. e Ribeiro, J. C. C. 1991. DNA bioprints: simple nonisotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis*, 12:146-152.
- Pena, S. D. J., Chakraborty, R. 1994. Paternity testing in the DNA era. *TIG*, 10(6):204-209.
- Myiaki, S. L., Myiaki, C. Y. e Wajntal, A. 1996. DNA fingerprinting in the rare black-fronted piping guan *Pipile jacutinga* (Cuculidae, Aves). *Rev. Brasil. Biol.* 56(4):783-791.
- Myiaki, Y., Kaiser, M. G. e Lamont, S. J. 1995. Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprinting and polymerase chain reaction using arbitrary primers. *Animal Genetics*, 26:163-170.
- Quinn, T. W., Quinn, J. S., Cooke, F. e White, B. N. 1987. DNA marker analysis detects multiple maternity and paternity in single broods of the Lesser Snow Goose. *Nature*, (Lond.), 326:392-394.
- Ballou, K., Ballou, J. e Brownell-Jr., R. L. 1984. Genetic diversity in California sea otters: theoretical considerations and management implications. *Biological Conservation*, 25:209-232.
- Ignacio, L., McGuire, T. R. e Power, H. W. 1989. Pitfalls and improved techniques in avian parentage studies. *Auk*, 106:129-136.
- Comincini, F., Comincini, S., Leone, P. e Ferretti, L. 1993. Construction of a library of bovine genomic fragments enriched in CpG islands. *Anim. Genetics*, 24:1-7.

- Sambrook, J., Fritsch, E. P. e Maniatis, T. 1986. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Schwaiger, R-W, Gomolka, M., Geldermann, H., Zischler, H., Buitkamp, J., Epplen, J. T. e Ammer, H. 1992. Oligonucleotide fingerprinting to individualize ungulates. *Applied and Theoretical Electrophoresis*, 2:193-200.
- Seutin, G., White, B. N. e Boag, P. T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Can. J. Zool.*, 69:82-90.
- Sick, H. 1985. *Ornitologia Brasileira, Uma Introdução*. Brasília. Editora Universidade de Brasília. Vol. 2. 827 pp.
- Silva, J. M. C. 1995. Birds of the cerrado region, South America. *Steenstrupia*, 2:69-92.
- Sjögren, P. e Wyöni, P-I. 1994. Conservation genetics and detection of rare alleles in finite populations. *Conservation Biology*, 8(1):267-270.
- Slatkin, M. 1989. Detecting small amounts of gene flow from phylogenies of alleles. *Genetics*, 121:609-612.
- Smouse, P. E. e Chevillon, C. 1998. Analytical aspects of population-specific DNA fingerprinting for individuals. *Journal of Heredity*, 89:143-150.
- Warketin, I. G., Curzon, A. D., Carter, R. E., Wetton, J. H., James, P. C., Oliphant, L. W. e Parkin, D. T. 1994. No evidence for extrapair paternity fertilizations in the merlin released by DNA fingerprinting. *Mol. Ecol.*, 3:229-234.
- Wayne, R. K. e Jenks, S. M. 1991. Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Canis rufus*. *Nature*, 351:565-568.
- Wetton, J. H., Carter, R. E., Parkin, D. T. e Walters, D. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327:147-149.
- Wong Z., Wilson, V., Jeffreys, A. J. e Thein, S. L. 1986. Cloning a selected fragment from a human DNA "fingerprint": isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucl. Acids Res.*, 14:4605-4616.
- Wright, S. 1977. *Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Vol. 3. Experimental results and evolutionary deductions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, J., Nestor, K. E. e Moritsu, Y. 1996b. Relationship between band sharing levels of DNA fingerprints and inbreeding coefficients and estimation of true inbreeding in turkey lines. *Poultry Science*, 75:25-28.

Zhu, J., Nestor, K. E., Patterson, R. A., Jackwood, D. J. e Emmerson, D. A. 1996a. Measurement of genetic parameters within and between turkey lines using DNA fingerprinting. Poultry Science, 75:439-446.

Anexo

Protocolos:

Extração do DNA

1. Numerar tubos e suas respectivas tampas para evitar trocas entre tubos durante o processo de extração;
2. Coletar em tubos vacutainer de 5 ml, amostras de 50 μ L de sangue total de *A. galeata*;
3. Adicionar 400 μ L de Mistura de Lise de Madsen, 6 μ L de Proteinase K (10mg/ml) e incubar a 37°C em banho-maria overnight;
4. Adicionar 400 μ L de clorofane e agitar por 5 min;
5. Centrifugar a 5 min., 5000rpm, T.A. e remover a fase aquosa para outro tubo igualmente numerado;
6. Repetir os passos 3 e 4;
7. Adicionar 100 μ L de TE e 400 μ L de clorofil e misturar por 5 min;
8. Centrifugar a 5 min., 7000 rpm, e transferir a fase aquosa para novo tubo numerado;
9. Adicionar 35 μ L de NaCl 4M e 800 μ L de Etanol 95% -20°C;
10. Misturar suavemente e centrifugar o tubo a 10.000rpm, 2 min;
1. Decantar o etanol e lavar o pellet de DNA com 1ml de etanol 70% gelado;
2. Secar o DNA e ressuspender o pellet em 100 μ l de tampão TE;
3. Quantificar o DNA.

Quantificação do DNA

A eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras de DNA foi feita segundo o protocolo abaixo:

- Preparar gel de agarose 0,8% = TAE 1X;
- Preparar as amostras no classificador nas seguintes proporções: DNA (5 μ L), TE Low (4 μ L) e TA (1 μ L);
- Dispor o material nos orifícios do gel de agarose;
- Correr o material com voltagem = 90 pelo tempo necessário para se efetuar a quantificação;

- Visualizar em ultra-violeta e fazer a quantificação visual;
- Fotografar.

Após ter sido feita a eletroforese, cada amostra foi quantificada visualmente e os resultados foram notados para cálculo do volume de amostra necessário para ser feito o DNA fingerprinting. Foram inicialmente consideradas as amostras com 10 ng de DNA porém algumas amostras com menor quantidade de DNA foram também usadas para se completar os 10 indivíduos necessários em cada área para esta técnica.

Digestão das amostras

- Selecionar a amostra;
- Retirar o volume necessário para que se tenha 10 ng de DNA e depositá-lo em eppendorf;
- Adicionar 20 μ L de tampão React 2;
- Completar o volume para 200 μ L com água mili-Q;
- Adicionar a enzima (6 μ L de Hinf I; 10 U/ μ L) e incubar O.N.;
- Correr 10% da mistura em gel de agarose corado com brometo de etídio para verificação do sucesso da digestão
- Estocar em freezer a -20°C

Tabela 11 – Matriz de presença/ausência de bandas obtidas por DNA fingerprinting a partir de amostras de DNA extraídas de sangue coletado em *Antilophia galeata* nas matas de galeria do Rio Vermelho, Ribeirão Sobradinho e Riacho Fundo. A = EFLEX; B = Sobradinho e C = Riacho Fundo.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
23kb	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23kb	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23kb	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
23kb	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
23kb	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
23kb	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
23kb	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
23kb	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
23kb	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0
23kb	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
23kb	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
23kb	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
23kb	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
23kb	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
23kb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
23kb	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23kb	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23kb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
23kb	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
9KB	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0
9KB	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
9KB	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
9KB	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
9KB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
9KB	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
9KB	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9KB	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 12 - Resultado da quantificação do DNA existente nas amostras nas quais foram feitas as extrações de DNA. São apresentados também o volume final, a concentração do DNA, volume requerido para uso na técnica do DNA fingerprinting.

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade mg</i>	<i>Volume final mL</i>	<i>Concentração mg/mL</i>	<i>Volume requerido - mL</i>	<i>Quantidade</i>
CÓRREGO BANANAL					
310 (*)	0.5	100	0.1	100	
313	0.15	60	0.03	400	10
313NE	0.15	100	0.03	400	1,8
313NE' (*)	0.35	150	0.07	400	3
314	0.2	125	0.04	150	10,5
324	0.25	175	0.05	300	5
324' (*)	0.6	200	0.12	240	8,75
326	0.1	100	0.2	100	24
326' (*)	0.5	100	0.1	600	2
336 (*)	0.35	150	0.07	100	10
346	0.25			171	10,5
346'	0.25	50			
352	0.1	100	0.05	240	2,5
352'	0.1		0.02	600	
355 (*)	0.5	175	0.1	120	2
355'	0.2	125	0.04	300	17,5
359 (*)	0.5	175	0.1	120	5
359'	0.5	75	0.1	120	17,5
343	0.25	75	0.05	120	7,5
344	0.05	35	0.01	240	3,75
344NE (*)	0.8	100	0.16	1200	0,35
348 (*)	0.35	150	0.07	75	16
350	0.25	125	0.05	150	10,5
352 (*)	0.4	200	0.08	240	6,25
355 (*)	0.3	150	0.06	150	16
350	0.3	75	0.06	200	9
350'	0.05	100	0.01	200	4,5
				1200	1
RIACHO FUNDO					
354	0.05	75	0.01	1200	0,75
354NE	0.1	100	0.02	600	2
359 (*)	0.3	125	0.06	200	7,5
362 (*)	0.35	150	0.07	150	10,5
364	0.4	50	0.08	150	4
367 (*)	0.4	175	0.08	150	14
368	0.25	75	0.05	240	3,75
362	0.4	75	0.08	150	6
366 (*)	0.25	175	0.05	240	8,75
366' (*)	0.4	75	0.08	150	6

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade mg</i>	<i>Volume final mL</i>	<i>Concentração mg/mL</i>	<i>Volume requerido - mL</i>	<i>Quantidade</i>
759 (*)	0.3	175	0.06	200	10,5
761 (*)	0.3	175	0.06	200	10,5
762 (*)	0.35	150	0.07	150	10,5
795 (*)	0.4	150	0.08	150	12
809	0.5	150	0.01	1200	1,5
CÓRREGO DO CAPETINGA					
130M	0.03	150	0.06	150	9
1133M (*)	0.35	150	0.07	150	10,5
410	0.05	175	0.01	1200	1,75
410' (*)	0.5	125	0.1	120	12,5
416	0.05	175	0.01	1200	1,75
416'	0.02	50	0.04	300	2
416'' (*)	0.25	175	0.05	240	8,75
416'''	0.05	75	0.01	1200	0,75
416'''' (*)	0.25	75	0.05	240	3,75
440 (*)	0.4	50	0.08	150	4
440' (*)	0.4	150	0.08	150	12
454 (*)	0.35	175	0.07	171	12,25
454'	0.35	175	0.07	171	12,25
478	0.45	75	0.09	133	6,75
484 (*)	0.4	150	0.08	150	12
492	0.4				
498 (*)	0.35	175	0.07	171	12,25
498	0.1	75	0.02	600	1,5
500 (*)	0.35	175	0.07	171	12,25
500'	0.2	175	0.04	300	7
500''	0.4	75	0.08	150	6
OLHO D'ÁGUA					
4 (*)	0.3	150	0.06	150	9
5 (*)	0.3	175	0.06	200	10,5
5'	0.4	75	0.08	150	6
5'' (*)	0.2	50	0.04	300	2
14 (*)	0.2	175	0.04	300	7
14' (*)	0.2	125	0.04	300	5
24 (*)	0.2	75	0.04	300	3
24' (*)	0.3	200	0.06	200	6
24'' (*)	0.4	100	0.08	150	8
36	0.4	30	0.08	150	2,4
73	0.2	175	0.04	300	7
73' (*)	0.4	175	0.08	150	14
76 (*)	0.4	175	0.08	150	14
76'	0.4	175	0.08	150	14
76''	0.05	100	0.01	1200	1
76'''	0.02	100	0,004	3000	0,4
78 (*)	0.4	150	0.08	150	12

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade mg</i>	<i>Volume final mL</i>	<i>Concentração mg/mL</i>	<i>Volume requerido - mL</i>	<i>Quantidade</i>
96	0.15	175	0.03	400	5,25
213 (*)	0.5	100	0.1	100	10
228 (*)	0.2	100	0.4	300	4
228' (*)	0.2	150	0.04	300	6
230	0.4	150	0.08	150	12
230' (*)	0.4	175	0.08	150	14
252	0.2	175	0.04	300	7
252'	0.35	150	0.07	171	10,5
252'' (*)	0.4	150	0.08	150	12
252'''	0.1	75	0.02	600	1,5
262 (*)	0.2	175	0.04	300	7
262' (*)	0.1	75	0.02	600	1,5
RIBEIRÃO SOBRADINHO					
828 (*)	0.3	175	0.06	200	10,5
828'	0.3	175	0.06	200	10,5
828''	0.35	150	0.07	171	10,5
833 (*)	0.3	175	0.06	200	10,5
836	0.2	150	0.04	300	6
841	0.05	75	0.05	1200	0,75
841' (*)	0.6	75	0.12	100	9
841NE (*)	0.2	100	0.4	300	4
843	0.25	75	0.05	240	3,75
843' (*)	0.4	150	0.08	150	12
860	0.2	175	0.04	300	7
860'	0.1	75	0.02	600	1,5
860'' (*)	0.15	150	0.05	240	7,5
860'''	0.45	75	0.09	133	6,75
860'''' (*)	0.25	100	0.05	240	5
860'''''	0.3	75	0.06	200	4,5
863 (*)	0.45	175	0.09	133	15,75
863'	0.5	75	0.1	100	7,5
863'''	0.1	75	0.02	600	1,5
893	0.2	75	0.04	300	3
893' (*)	0.35	75	0.07	171	5,25
893'' (*)	0.5	75	0.1	100	7,5
893''''	0.1	100	0.02	600	2
906	0.4	75	0.08	150	6
907 (*)	0.4	175	0.08	150	14
907'	0.5	100	0.1	100	10
908 (*)	0.2	150	0.04	300	6
908' (*)	0.3	125	0.06	200	7,5
917 (*)	0.2	125	0.04	300	5
917' (*)	0.2	100	0.04	300	4
CÓRREGO MATA GADO					
919	0.25	175	0.05	333	8,75

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade mg</i>	<i>Volume final mL</i>	<i>Concentração mg/mL</i>	<i>Volume requerido - mL</i>	<i>Quantidade</i>
519'	0.25	175	0.05	333	8,75
519" (*)	0.25	175	0.05	333	8,75
519''' (*)	0.2	100	0.04	300	4
523 (*)	0.3	200	0.06	200	12
523'	0.25	75	0.05	333	3,75
538	0.45	50	0.09	133	4,5
538' (*)	0.45	175	0.09	133	15,75
541	0.2	150	0.04	300	6
544 (*)	0.15	175	0.03	400	5,25
544' (*)	0.2	150	0.2	300	6
565	0.25	150	0.05	333	7,5
565'	0.25	150	0.04	300	7
565" (*)	0.2	175	0.08	150	12
565	0.4	100	0.08	150	8
578	0.3	175	0.06	200	10,5
578' (*)	0.4	150	0.08	150	12
584 (*)	0.5	100	0.01	120	7,5
584' (*)	0.1	100	0.02	600	2
584M (*)	0.3	150	0.06	150	9
584M' (*)	0.3	150	0.06	150	9
584M'' (*)	0.35	150	0.07	150	10,5
584M''' (*)	0.35	150	0.07	150	10,5
RIBEIRO VERVELHO					
6000 (*)	0.5	175	0.1	120	17,5
6000'	0.5	100	0.1	120	10
6002 (*)	0.15	150	0.03	400	4,5
6002' (*)	0.35	75	0.07	171	7
6010 (*)	0.1	125	0.02	600	2,5
6010' (*)	0.1	100	0.02	600	2
6010" (*)	0.25	240	0.05	240	5
6013 (*)	0.5	175	0.1	120	17,5
6017 (*)	0.1	100	0.02	400	3
6017' (*)	0.5	75	0.1	120	10
6018 (*)	0.5	150	0.1	120	15
6026	0.4	75	0.08	150	6
6032 (*)	0.5	150	0.1	120	15
6033	0.35	60	0.07	171	4,2
6033'	0.1	100	0.02	600	2
6034 (*)	0.5	75	0.1	120	10
6040	0.3	200	0.06	200	6
6076 (*)	0.3	175	0.03	200	10,5
6085	0.2	150	0.04	300	6
6086 (*)	0.4	50	0.08	150	4
6086' (*)	0.3	75	0.06		6
6086"	0.1	100	0.02	600	2

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade mg</i>	<i>Volume final mL</i>	<i>Concentração mg/mL</i>	<i>Volume requerido - mL</i>	<i>Quantidade</i>
1102	0.15	75	0.03	500	2,5
1121 (*)	0.3	100	0.06	200	6
1121' (*)	0.1	75	0.02	600	2
1121" (*)	0.1	100	0.02	600	2
1123	0.1	125	0.02	600	2,5
1130' (*)	0.25	100	0.05	240	5
1130 (*)	0.2	75	0.04	300	4
1130"	0.1	100	0.02	600	2
1132 (*)	0.35	125	0.06	200	7,5
1132' (*)	0.5	50	0.1	120	5
1134 (*)	0.4	100	0.08	150	12
1146 (*)	0.6	100	0.12	100	12

Não foram obtidos pellets das seguintes amostras: 889, 756, 863, 545, 565", 566, 228, 1134, 828, 893, 759, 717", 761, 416NE, 1132', 73, 793, 545, 1040, 81M, 64M, 141M, 50M, 130M, 1M, 302M, 12M, 311M, 695, 760, 792, 742, 704, 512, 537, 650, 634, 604, 293, 766, 742, 566, 860, 578, 454, 756, 537, 545, 73, 538, 826, 326, 313, 310, 424, 406, 503, 650, 542, 77, 1010, 1017, 465, 540, 186, 822, 310, 889, 75, 669, 634, 685, 695, 512, 42, 1036, 1123, 550, 313, 314, 544, 251.

Listagem dos Reagentes Utilizados

TRIS 1M pH 8,0

Volume: 1 litro
Tris base: 121,11 gr
Ajustar o pH 8,0 c/ HCl (=42ml)
q. s. p. 1000 ml com ddH₂O

TRIS 1M pH 7,5

Volume: 100 ml
Tris base: 12,11 gr
Ajustar o pH 7,5 c/ HCl (=5,0ml)
q. s. p. 100 ml com ddH₂O

EDTA 0,5 M pH 8,0 (SIGMA - Obs: para DNA)

Volume = 50 ml
EDTA: 9,305 gr (PM=372,22)
Ajustar o pH = 8,0 com NaOH pellet ou concentrado até dissolver.
Após dissolução, terminar de ajustar com NaOH concentrado até pH 8,0
q. s. p. 50 ml com ddH₂O
Autoclavar e aliquotar

EDTA 0,5 M pH 8,0 (RIEDEL - Obs: para tampão de corrida)

Volume = 200 ml
EDTA 2H₂O: 37,22 gr
Ajustar o pH = 8,0 com NaOH pellet ou concentrado até dissolver.
Após a dissolução, ajustar pH 8,0 com NaOH concentrado.
q. s. p. 200 ml com ddH₂O
autoclavar

NaCl 5,0 M

Volume: 100ml
NaCl: 29,22 gr
q. s. p. 100 ml com ddH₂O
autoclavar

DS 10%

Volume final: 200 ml
DS: 20 g
Dissolver em 150 ml de ddH₂O estéril e aquecer a 68°C
q. s. p. 200 ml com ddH₂O estéril

Acetato de amônio - 4 M

Volume: 100 ml

ACOONH₄: 30.8 gq. s. p. 100 ml com ddH₂O estéril

Esterilizar por filtração

Mistura de Lise de Madisen

(TRIS Hcl 0.1 M pH 8,0 / EDTA 0.5 M pH 8,0 / SDS 0,2% / NaCl 1 M)

10 ml Tris Hcl 1 MM pH 8,0 "Nuclease Free"

8 ml EDTA 0,5 M pH 8,0

2 ml SDS 10%

20 ml NaCl 5 M

q. s. p. com ddH₂O estéril.....100 ml

Toda vidraria deve ser esterilizada no forno a 180°C por 2 horas

Clorofil - Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1)

Volume: 100 ml

96 ml Clorofórmio destilado

4 ml Álcool isoamílico destilado

Etanol 75%, 80% ou 70%

75, 80 ou 70 ml de Etanol destilado

25, 20 ou 30 ml de ddH₂O estéril

Aliquotar e estocar a \20°C

Isopropanol Absoluto

Isopropanol destilado

Estocar a 4°C

High TE pH 8,0 (TRIS Hcl pH 8,0 100 mM/EDTA ph 8,0 40 mM)

Volume: 50 ml

5,0 ml Tris Hcl 1 M pH 8,0

4,0 ml EDTA 0,5 M pH 8,0

q. s. p. com ddH₂O.....50 ml**TE (LOW) pH 8,0 (TRIS Hcl pH 8,0 10mM/EDTA pH 8,0 1 mM)**

Volume: 50 ml

0,5 ml Tris Hcl 1 M pH 8,0

0,1 ml EDTA 0,5 M pH 8,0

q. s. p. com ddH₂O**Gel de Agarose 0,8%**

100 ml de agarose 0,8%

2 ml de TAE 1X

5 µL de Brometo de Etídio

TAE 50X

Volume: 1 litro
242 gr de TRIS BASE
57,1 ml de ácido acético glacial
100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0
q. s. p. com ddH₂O.....1000ml
Filtrar

Brometo de Etídio (Mutagênico) 10 mg/ml

USAR MÁSCARAS E LUVAS, PESAR EM CAPELA DE EXAUSTÃO

Volume: 10 ml
Brometo de Etídio: 100 mg
q. s. p. 10 ml com dd H₂O estéril
Agitar até a dissolução
Estocar a 4°C, no escuro

Clorofane (Fenol saturado com TRIS Hcl)

Destilar o fenol e estocar em alíquotas a -20°C ou sob gás N₂. Saturar com Tris Hcl 0,1 M pH 8,0 (igual volume) até que o sobrenadante adquira pH 7,5. A última lavagem é feita com Tris Hcl 0,1 M pH 8,0/Mercapto etanol 0,2% e medir o pH com papel até pH 8,0, então remover a fase aquosa.

Estocar em alíquotas a -20°C.

Tampão de Digestão React 2 10X concentrado

Volume: 10 ml
Tris Hcl estéril, 500 mM pH 8,0 5,0 ml
MgCl₂ estéril, 100 mM 1,0 ml
NaCl estéril, 500 mM 1,0 ml
q. s. p. com ddH₂O estéril 10,0ml
Aliquotar em microtubos e estocar a -20°C

TBE 5X (tampão de corrida)

Volume: 2 litros
Tris base: 100 gr
Ácido bórico: 55 gr
EDTA: 0,5 M pH 8,0: 40 ml

Capítulo 3 – Análise Populacional de *Antilopha galeata*

Introdução

O fenômeno da mobilidade de fragmentos de DNA foi primeiro observado a quase 20 anos atrás quando preparações de DNA com peso molecular similar exibiam padrões diferentes de migração em gel de acrilamida e este fenômeno ganhou atenção considerável. Muitos exemplos da mobilidade alterada para fragmentos de DNA foram relatados desde então (Kirkpatrick *et al.* 1993)

O advento das técnicas para detectar variação molecular iniciou com a eletroforese de proteínas e culminou com o sequenciamento de DNA. A enorme variação genética relevada por essas técnicas em quase todas as espécies tem permitido a construção de mapas genéticos incluindo centenas de marcadores uniformemente espaçados através de todo o genoma. Marcador é um identificador de um sítio genômico e marcadores de alelos representam polimorfismo em um determinado sítio (Crooijmans *et al.* 1996a). A disponibilidade de um número crescente de marcadores (Estoup *et al.* 1995) em muitas espécies possibilita a obtenção de informações genéticas (Ruiz e Barbadilla 1995), variação dentro de/entre raças como distância genética, heterogozidade e endocruzamento (Crooijmans *op cit.*)

A tecnologia baseada em DNA revolucionou as análises de estrutura de populações. Além do mais, a análise de regiões polimórficas de DNA tornou possível chegar a conclusões detalhadas sobre relações familiares de indivíduos. O número de marcadores polimórficos em potencial é tão grande, que a determinação da identidade individual veio a ser possível como objetivo imediato. Esta técnica ficou, portanto, conhecida como DNA *fingerprinting*. Existem vários métodos diferentes disponíveis para se obter o DNA *fingerprinting*. Podem ser baseadas em técnicas de Southern blotting ou em reação em cadeia de polimerase (PCR). Cada técnica explora uma certa classe de seqüências hipervariáveis no genoma. A técnica do PCR, que explora regiões hipervariáveis dentro de seqüências curtas que não podem ser analisadas em gel de agarose, pois sua resolução não permite discriminar as

diferenças de comprimentos nos fragmentos de DNA, é uma das ferramentas mais poderosas na biologia molecular (Meglécz e Solignac 1998) e está sendo usada em uma vasta gama de estudos genéticos (Rabenold *et al.* 1990a; Joshi *et al.* 1991; Primmer e Ellegren 1998), recebendo considerável atenção em análises do genoma (Ellegren 1992a; Primmer *et al.* 1995). Para uso da técnica do PCR são usados primers de oligonucleotídeos que flanqueiam uma certa seqüência simples, a seqüência contendo esta extensão do DNA genômico é amplificada e o resultado é individualizado em gel de poliacrilamida (Rassmann *et al.* 1991; Hoelzel e Dover 1991; Pena e Chakraborty 1994). Esta técnica tem uma série de vantagens, pois não requer DNA com alto peso molecular para amplificar as seqüências alvo. Somente as seqüências a serem amplificadas devem estar intactas. Desta forma, o PCR podem amplificar DNA parcialmente degradado ou desnaturado (Walsh *et al.* 1991; Gill e Evett 1995; Neumann e Wetton 1996; Fridolfsson *et al.* 1997). Além do mais, o poder de individualização do gel é tal que diferenças de um único nucleotídeo podem ser registradas usando os marcadores adequados. Isto pode ser particularmente útil para populações grandes, porque a composição alélica do indivíduo pode ser digitalizada sem a preocupação com diferenças nas condições em que o gel foi processado. É possível, ainda, individualizar ambos os alelos do locus, o que simplifica a interpretação dos padrões encontrados (Rassmann *et al.* 1991).

Microsatélites são famílias de seqüências consistindo de motivos de 1-15 pares de base (PB) interespaçado aleatoriamente (Jamieson 1994; Estoup *et al.* 1995; Crooijmans *et al.* 1996) através do genoma de certamente todos os eucariotos examinados até então (Holmes *et al.* 1993; Dawson *et al.* 1997; Kelly e Willis 1998). A base da variação alélica nos loci dos microsatélites é a variação no tamanho devida a diferenças no número de repetições simples (Oudet *et al.* 1991; Holmes *et al.* 1993) que podem se repetir mais de 100 vezes (Goldstein *et al.* 1995). Geralmente, quanto maior o número de repetições, maior o número de alelos (Crooijmans *et al.* 1993). Normalmente este processo é realizado usando primers que flanqueiam a repetição e o produto da reação é visualizado através de eletroforese em gel (Cheng e Crittenden 1994; Kelly e Willis 1998). Os microsatélites de DNA têm sido observados em todos os eucariotos observados até então (Cheng e Crittenden 1994 *apud* Hamada *et al.* 1982; Stallings *et al.* 1991) e são relativamente abundantes no genoma de muitos vertebrados (Cheng e Crittenden *op. cit.*) com alta probabilidade de serem polimórficos (Ruyter-Spira *et al.* 1996). Loci têm sido isolados de uma variedade de vertebrados, dentre eles, várias espécies

de aves (Dawson *op cit.*). Uma vez que o polimorfismo é encontrado entre indivíduos, o teor de informação dos microsátélites como marcadores genéticos fica bastante aumentado (Cheng e Crittenden *op.cit.*; Cheng *et al.* 1995; Goldstein *et al.* 1995; Ruyter-Spira *et al.* 1996). Dado o enorme potencial de polimorfismo dos microsátélites estes marcadores podem beneficiar de forma substancial estudos detalhados sobre estrutura de populações (Estoup *et al.* 1995; Kelly e Willis 1998). Além do mais, pelo fato do DNA ser amplificado inúmeras vezes de forma exponencial, pequena quantidade de DNA é requerida (Cheng *et al.* 1995; Ruyter-Spira 1996)

As seqüências polimórficas de DNA também conhecidas como (STRs), são descritas como ilhas ricas nos nucleotídeos citosina e guanina, representados como núcleos organizados de seqüência CpG. Essas ilhas são trechos do DNA não metilados, com 0,5 a 2Kb de comprimento, localizadas a 5' de todos os genes *housekeeping* seqüenciados de vários genes tecido-específicos de genomas de mamíferos (Aissani e Bernardi 1991; Bird 1987). Estima-se que existam cerca de 30.000 ilhas CpG no genoma dos mamíferos, possibilitando que uma grande fração de todos os genes (50 - 100.000) possam ser identificados a partir das ilhas CpG próximos a suas regiões 5'terminal (Rubertis *et al.* 1993). O baixo nível de metilação e a existência de enzimas de restrição que reconhecem como sítio de clivagem um ou dois CpGs oferece um grande artefato para identificação de genes polimórficos clonados. Recentemente, este artefato foi utilizado para clonagem direta de ilhas CpG do braço distal do cromossoma-X humano (Maestrini *et al.* 1990), de 126 genes de bovinos (Rubertis *et al.* 1993) e de cavalos (Ellegren *et al.* 1992).

Os VNTRs mais conhecidos, são sem dúvida, as seqüências genômicas formadas por repetições de mono-, di-, tri- ou tetra-nucleotídeos organizados em múltiplas cópias enfileiradas, ou repetições curtas em tandem (STR), também conhecidas como microsatélites de DNA. Microsatélites contendo várias combinações de nucleotídeos já foram identificados no genoma de todos os seres vivos conhecidos, os principais blocos repetitivos encontrados são (GATA)_n, (GACA)_n, (CAC)_n e (GT)_n (Epplen 1988; Rogers 1983; Weber e May 1989). No genoma eucariótico a classe de microsatélites mais freqüentes são repetições do tipo (CA)_n e (GT)_n, designadas como repetições CA (Hamada e Kakunaga 1982; Miesfeld *et al.* 1981; Tautz e Renz 1984). No genoma humano existem 50 - 100.000 blocos (CA)_n intercalados, com tamanhos de 15-30Kb, com um espaçamento uniforme de 30-60Kb (Hamada e Kakunaga

1982). No genoma dos vertebrados estima-se que existe entre 10^4 a 10^5 microsátélites (Tautz e Renz 1984; Litt e Luty 1989; Love *et al.* 1990; Crooijmans *et al.* 1993). Os primeiros microsátélites identificados para aves foram de *Hirundo rustica* e de *Ficedula hypoleuca* (Fridolfsson *et al.* 1997).

Marcadores moleculares que mostram um alto nível de diferenciação intra-específica é uma ferramenta útil para responder uma série de questões em biologia de populações, podendo ser usados para questões relacionadas a parentesco, diferenciação de populações, fluxo gênico e tamanho efetivo da população (Dawson *et al.* 1997).

Os objetivos deste capítulo são determinar a heterozigosidade observada, a heterozigosidade esperada das populações amostradas e determinar qual ou quais variáveis ambientais estão relacionadas à variação da heterozigosidade.

Metodologia

Construção da biblioteca genômica

Amostras de sangue coletadas por venicupuntura da veia braquial de *Antilophia galeata* (AG), *Tachyphonus rufus* (TC) e *Turdus rufiventris* (TR), em matas de galeria do cerrado do Distrito Federal foram preservadas em tampão ACG (Sambrook *et al.* 1986) a 20°C . O DNA extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol (Sambrook *et al.* 1986) segundo o protocolo em anexo:

Inicialmente foram construídas três bibliotecas genômicas diferentes, para as espécies *Turdus rufiventris*, *Tachyphonus rufus* e *Antilophia galeata*, a partir de $15\mu\text{g}$ de DNA total. Foi utilizada uma nova estratégia de clonagem, mais simples e eficiente para qualquer tipo de genoma. Esta técnica se caracteriza pela exclusão de exons e enriquecimento de fragmentos contendo VNTRs, através da digestão do DNA com enzimas que clivam moderadamente o genoma de vertebrados (sítios não CG-ricos). Para isso, o DNA foi exaustivamente digerido com a enzima **Hind III** (40U), *overnight* (O.N.), defosforilado e digerido novamente com a enzima **Eco R1** (80U). Os fragmentos digeridos foram purificados

com clorofane/clorofil e ligado ao vetor p-Bluscript tratado nas mesmas condições.

Para testar a simplificação da técnica de clonagem, foram construídas novas bibliotecas genômicas, com alterações de algumas etapas desta nova metodologia de clonagem como descrito em anexo. Foi feito o screening das livrarias genômicas, conforme protocolo em anexo.

Caracterização da sequência dos clones positivos de *A. galeata*

Dos 53 clones positivos selecionados nas três livrarias genômicas construídas de *A. galeata*, foram selecionados 14 clones baseado no peso molecular (2 a 0.5kb) e no tipo de microssatélite usado como sonda. Destes, 5 clones selecionados com as sondas (GATA)₄ e (CA/TG)_n, com peso molecular variando de 0.5 a 1.5kb, foram crescidos em 200ml de meio LB, o plasmídeo extraído e enviados para sequenciamento automático (ABIprism). Foi feito um sequenciamento primeiramente em Davis Sequencing (UCL-USA). Como este primeiro sequenciamento ficou incompleto, uma nova tentativa foi feita na Universidade Federal de Viçosa.

Diluição do primers

Baseado no valor picomoles total foi feita a diluição dos primer com água Mili-Q, para se alcançar uma concentração final igual a 5 pmol. A descrição da diluição está apresentada no anexo do capítulo.

Extração do DNA

Inicialmente foram usadas as amostras de DNAs extraídos para a técnica de minisatélites, em que já haviam sido confirmadas a existência de DNA e que porém esta quantidade era insuficiente para esta metodologia. Para as amostras que não apresentaram bons resultados de amplificação os DNAs foram novamente precipitados e ressuspensos em água Mili-Q, uma vez que o EDTA existente no TE pode inibir a amplificação. Para aquelas amostras nas quais as extrações não apresentaram sucesso, foram tentados três métodos de microextração. Os protocolos utilizados estão apresentados no anexo do capítulo.

Padronização das reações de PCR

Após as extrações do DNA das amostras de sangue, foram feitas tentativas de padronização das reações de PCR, testando-se condições de quantidade de DNA, temperatura, quantidade de Mg^{++} a ser adicionada para todos os primers sintetizados, bem número de ciclos. Para a quantidade de DNA foram testados 1,5, 2 e 3 μL . Para a quantidade de Mg^{++} a ser adicionada foram testadas 0,75 e 1,5 μL . A temperatura foi testada em intervalos de $2^{\circ}C$, iniciando-se a $-4^{\circ}C$ da temperatura recomendada pelo laboratório responsável pela síntese dos primers até se alcançar a temperatura ideal. Estas condições foram testadas simultaneamente e as condições ideais para cada primer foram utilizadas nas amplificações. A reação geral está descrita abaixo e as condições ideais encontradas está descrita nos resultados.

DNA	1,5 μL
H2O Milli-Q	Ajustada para um volume final = 25 μL
Tampão (*)	10% do volume final
dNTPs 2,5 mM	2 μL
Primer	2 μL
Taq DNA polimerase (**)(**)	2 μL
Volume final = 25 μL	

(*) Phoneutria.

(**) Produzida pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Anuniação no Laboratório de Enzimologia da UFG.

Todas as amostras de DNA foram submetidas à amplificação (Perkin Elmer 2400) conforme as condições ideais para cada primer, como descrito a seguir:

94°C – 3 min		26 ciclos
55°C – 1 min		
72°C – 1 min		
94°C – 40 s		36 ciclos
55°C – 40 s		
72°C – 1 min		
4°C · ∞		

Posteriormente à amplificação todo o produto do PCR foi checado em gel de agarose 8% corado com brometo de etídio para verificação da ocorrência da amplificação.

Visualização das amplificações em gel de poliacrilamida

As amostras nas quais ocorreram amplificações foram estocadas para serem processadas com gel de poliacrilamida. Foram testadas amplificações nas concentrações de 8%, 9%, 10% e 12%. Foi testado também o gel desnaturante na tentativa de se buscar os melhores resultados. Para a eletroforese foi utilizada voltagem = 100 e miliamperagem = 14

Análise do polimorfismo

Para analisar o polimorfismo detectado a partir dos primers utilizados, foram computadas as frequências de alelos para cada locus detectado. A partir das contagem das frequências, foi calculada a heterogiosidade observada (H) segundo Nei (1978), conforme a fórmula que se segue:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

onde n = número de alelos;

p_i = frequência alélica do i ésimo alelo

A heterozigiosidade esperada foi calculada segundo Johnson e Brown (Mumme et al. 1985), conforme a fórmula descrita abaixo:

$$H_E = \sum p_i(1 - p_i)[1 + 1/(2n - 1)]$$

p_i = frequência alélica

n = número de indivíduos

Foi calculado também o número médio de alelos de cada população.

Foram feitas análises de componentes principais com a matriz de presença/ausência de amplificação dos vários loci analisados e também a partir da matriz de número de indivíduos que amplificou o locus *x*. As análises de componentes principais foram feitas usando-se o software MVSP versão 2,0a (não estandarizado, não centrado). Foi feita, também utilizando a matriz de presença/ausência de amplificação dos vários loci analisados, uma análise MRPP (Multi-Response Permutation Procedure), que tem é um teste de hipótese não-paramétrico, que testa a existência de diferenças entre dois ou mais grupos de variáveis. O procedimento é testar a distância média (delta) calculada dentro do grupo com a distância esperada. Para comparações, é calculado o fator *R* ($R = 1 - (\text{delta observado} / \text{delta esperado})$) que traduz a homogeneidade interna do grupo. Assim, o maior valor que pode ser atribuído ao *R* é igual a 1. Caso a heterogeneidade encontrada dentro do grupo, seja igual à heterogeneidade atribuída ao acaso, então $R = 0$. Se o ajuste entre os grupos for maior que o atribuído ao acaso, então $R < 0$. Este teste foi feito utilizando-se o software PC-ORD para Windows versão 3.0.

Foi calculada a covariância e a correlação entre a matriz de distâncias euclidianas e a distância linear entre as áreas e as distâncias potencialmente percorridas.

Resultados

Construção da biblioteca Genômica

Foram obtidos cerca de 400ng/ μ L de DNA de alta qualidade e integridade (Figura 12), verificado pela digestão com as enzimas *Hae* III, *Hinf* I e *Sau* 3A1 e eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 13 e 14).

Foi observado na digestão do DNA genômico com as enzimas *Hind* III/*Eco* RI, uma redução do peso molecular com concentração na faixa de 9 a 1Kb (Figura 14). Não foi observado alteração no peso molecular dos fragmentos tratados com a enzima (calf

intestinal phosphatase) CIP. No teste de ligação de uma alíquota dos DNAs de aves digeridos e do vetor verificou-se uma boa religação dos fragmentos, indicando a boa qualidade do material obtido. Para estimativa do sistema de ligação, foi considerado um tamanho médio dos fragmentos na faixa de 3.000kb, sendo obtidas as seguintes concentrações após a purificação:

Vetor p-Bluscript SKII	600ng/ μ L
DNA <i>A. galeata</i> Hind III/Eco RI	1.5 μ g
DNA <i>T. rufus</i> Hind III/Eco RI	2.4 μ g
DNA <i>T. rufiventris</i> Hind III/Eco RI	3 μ g

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

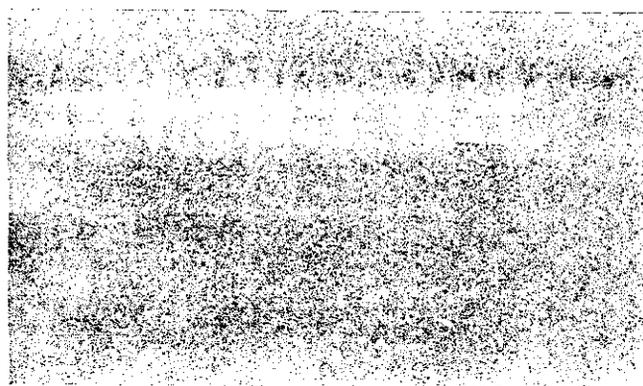


Figura 12 – DNA total extraídos de AG (1 a 8); TC (8 a 12) e TR (12 a 17)

PM DNA I II III

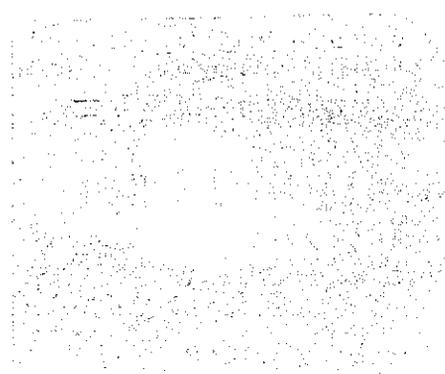


Figura 13 – Perfil de digestão do DNA total de AG (1), e digerido com I- *Hae* III; II- *Hinf* I; III- *Sal* I

AG = *Antilophia galeata*
 TC = *Tachyphonus rufus*
 TR = *Turdus rufiventris*

PM 1 2 3 4 5 6 7 8



Figura 14 – DNAs digeridos (*Antilophia galeata* (AG), *Turdus rufiventris* (TR) e *Tachyphonus rufus* (TC)) com enzimas de restrição para a construção da biblioteca genômica.

- | | |
|---|---|
| 1 – AG- <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI | 5 – TC <i>Hind</i> III |
| 2 – AG <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI – 1.5?g | 6 – TC <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI – 1.5 |
| 3 – AG <i>Hind</i> III | 7 – TR <i>Hind</i> III |
| 4 – AG <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI – 100ng | 8 – TR <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI – 2 |

Ligação, Plaqueamento e Screening da Livraria Genômica

Em todas as livrarias foi obtido uma boa eficiência de ligação (Figura 15). Na livraria de *A. galeata* foi observado a formação de tandem de 2,9kb (resultados não mostrados). A eficiência da eletroporação foi baixa (10^4). Como observado por Raleigh *et al.* (1988), a baixa eficiência de transformação, provavelmente, deve-se ao fenótipo da hospedeira

(mcr+ mrr+;) que seleciona contra as seqüências metiladas como as contidas nos fragmentos de VNTRs.

Quando frações das bibliotecas genômicas foi estocada em glicerol 50% a -20°C e plaqueada num intervalo de 17 dias, não foi observado decréscimo significativo da taxa de transformação. O aumento da taxa molar na ligação (inserto:vetor) produziu um efeito negativo na transformação de 1.6×10^4 para 0.8×10^3 clones/ μg inserto (Tabela 16).

1-AG sem DNA ligase								
2-AG com DNA ligase	PM	1	2	3	4	5	6	
3-TC sem DNA ligase								
4-TC com DNA ligase								
5-TD sem DNA ligase								
6-TD com DNA ligase								

2.2kb →

0.5kb →

Figura 15 – Ligação dos fragmentos de DNA em vetor p-Bluscript para construção da biblioteca genômica de *A. galeata* com *Hind III* / *Eco RI*.

O sinal variou de forte a fraco na autorradiografia, somente os clones positivos com sinais forte e médio foram selecionados e crescidos em meio LB líquido e estocados em glicerol 50% a -20°C. Não foi possível selecionar clones com a sonda genelll-M13 devido a reação cruzada com o vetor. Os clones recombinantes da livraria de pássaros foram

selecionados utilizando uma mistura das sondas (TG)_n/(CAC)_n e (GGAT)_n/(GATA)_n, e dos clones repicados para o nylon, foram obtidos 8 AG-positivos (267 clones) e 8 TC positivos (133 clones – (Tabela 16). Dos clones transferidos pela técnica do replic-plate foram selecionados 27 clones dos 1136 AG, 12 dos 760 TC e 16 dos 992 TD clones testados (Tabela 23). Isto resultou numa média de eficiência de clonagem das livrarias de 2.99% e 3.2% para as livrarias *Eco/Hind* de AG e TC. A caracterização dos insertos presentes nos plasmídeos dos clones positivos foi feita através da dupla digestão com as enzimas *Eco RI/Hind III*. O peso molecular variou de 0,2 a 4kb (Figura 16).

Tabela 16 – Sumário das estratégias de clonagem de VNTRs em diferentes genomas, utilizando o blot ou repique de clones para o nylon. ⁽¹⁾ transformação/μg vetor/ sistema de ligação - média; ⁽²⁾ média comparada aos clones analisados.

	AG		TC		TD
	Clones repicados	Clones blotados	Clones repicados	Clones blotados	Clones blotados
Taxa de transformação ⁽¹⁾	1.5×10^{-4}	1.6×10^{-4}	6.4×10^{-3}	1.2×10^{-4}	0.8×10^{-3}
Taxa Molar do DNA na ligação	3:1	3:1	4:1	4:1	5:1
Volume (μl) de células competentes na transformação	20		20		20
Colônias brancas analisadas (total)	267	1136	133	760	992
Numero de placas	04		03		03
Clones positivos	8	27	8	12	16
Eficiência de clonagem (média %) ⁽²⁾	2.99	2.43	3.2	2.0	3.08

Não foram observadas diferenças na clonagem quando o DNA genômico foi digerido simultaneamente com as enzimas *Hind III/Eco RI*, seguido da defosforilação no mesmo tubo. Este procedimento simplificou sensivelmente as etapas da construção, permitindo-se completar a construção da biblioteca genômica em 2 dias. Apenas uma pequena redução do número de colônias transformantes foi observado. Quando os fragmentos na faixa de 0.5 a 4kb foram selecionados em agarose (Figura 17), eluídos e purificados, foi obtido um acréscimo na taxa de transformação. Este aumento está

relacionado a maior população de fragmentos de baixo peso molecular ligados no vetor, o que facilita sua entrada dentro da célula hospedeira e evita sua exclusão do sistema de replicação bacteriano. Na clonagem sem seleção de tamanho de fragmentos, a seleção fica a cargo do sistema replicativo da própria célula hospedeira. Isto provoca uma redução da taxa efetiva de transformação, mas como o importante é obtenção de clones contendo seqüências de VNTRs, este problema pode ser contornado com aumento do número de células competentes na transformação, ou união de sistemas de transformação.

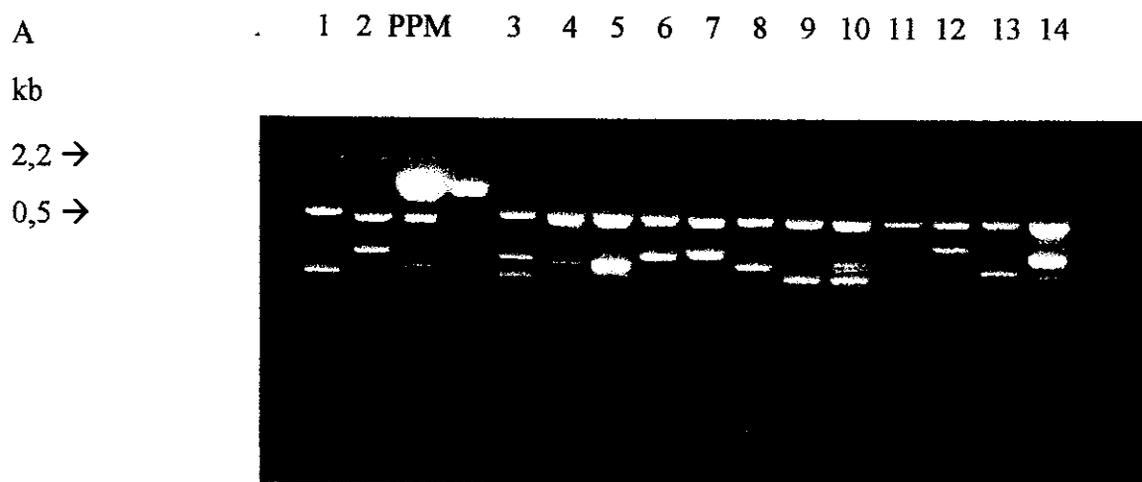


Figura 16 – Caracterização parcial do peso molecular de clones obtidos; **A** - Perfil de restrição dos clones selecionados da livreria genômica de *A. galeata* (1 a 7); *T. rufus* (8 a 10) e *T. rufiventris* (11 a 14). 1=µg de DNA foi digerido duplamente com 8U das enzimas *Eco RI*/*Hind III* para liberação do inserto.

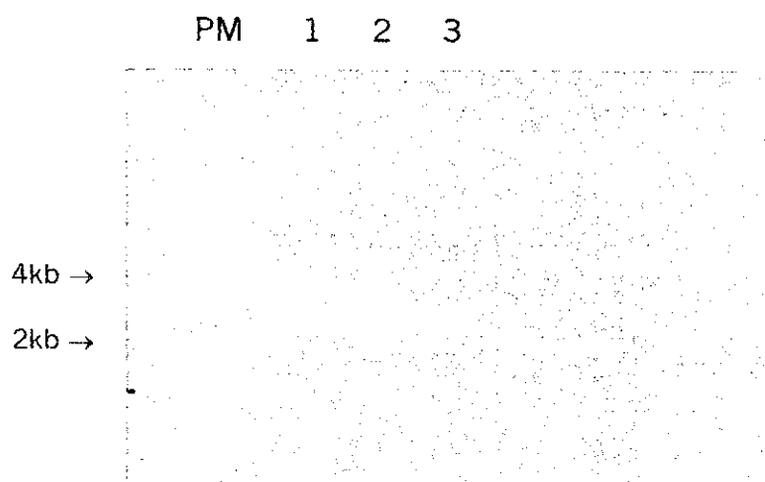


Figura 17 – Fragmentos de DNA selecionados e eletroeluídos para a construção da biblioteca genômica: 1 AG (*Antilophia galeata*), 2 TC (*Tachyphonus rufus*) e 3 TR (*Turdus rufiventris*).

Os clones positivos obtidos foram submetidos a uma seleção secundária. Destes, foram selecionados sete com sinal forte na autorradiografia e enviados para sequenciamento pelo método automático (Davis Sequencing Service – USA; Bioagro-UFV). O critério para seleção foram além do sinal forte, a hibridização com os motivos (CA)_n, clones AG 23, AG 25 e (CA)_n / (GATA)₄ nos clones AG B4, AGC 127, AG49, AG50 e AG A2. A análise de similaridade da sequência de DNA obtida foi feita no Genlibrary Databases. O alinhamento das sequências, a análise de motivos repetitivos e pesquisa de primers para amplificação foram feitas utilizando-se os softwares DNA-Strider, Dot Plotter (Don Gilbert, Indiana University) e GeneRun. Devido a ausência da sequência dos primers dos loci HrU2 e 6 e FhU2 nos artigos obtidos e, na impossibilidade de obter esses dados do autor, a definição destes primers, quando possível, foi feita por comparação e alinhamento das sequências obtidas nos bancos de dados Americano, Europeu e Japonês. A síntese química dos primers foi feita por KeyDNA Services (USA).

Após a busca dos primers passíveis de serem usados em *A. galeata*, através da literatura e dos bancos de dados GeneBank e MedLine (USA), foram selecionados 8 primers. A síntese dos mesmos foi feita pelo BioSource International. A identificação e as características de cada um deles estão descritas no anexo do capítulo.

Seqüenciamento e síntese dos primers

O seqüenciamento dos primers foi parcial em seis dos sete clones seqüenciados. Apenas no clone AG 50 não foi possível verificar a presença de seqüências tipo-repetitivas no total de bases seqüenciado. Os registros de microssatélites e outras seqüências de inserções transposoniformes nos Bancos de Dados ainda são modestos e não foi obtido nenhuma similaridade significativa com nenhuma seqüência de microssatélite registrado. Este fato ressalta a importância desta metodologia para clonar seqüências de VNTRs e dos clones Ags para estudos genéticos em Pipridae. Alguns registros foram observados quanto ao motivo repetitivo (CA)_n, comum a vários microssatélites descritos em humanos e outros animais. Foram observadas outras similaridades genéticas não polimórficas, como um trecho composto de aproximadamente 100pb do clone AGA2, sendo encontrada uma similaridade genética 85% (2x10⁻⁸; Gaps 4%) com um trecho de 484pb na região 5'do Transposon Minus (linha transgênica VD12) de *Anopheles stephensi*.

emb|AJ277721.1|AST277721 *Anopheles stephensi* transposon Minos, transgenic line VD12,
84 BP

Length = 484

Score = 65.9 bits (33), Expect = 2x10⁻⁰⁸

Identities = 84/98 (85%), Gaps = 4/98 (4%)

Strand = Plus / Plus

Query: 581 aagcttatcgatcc-gcgac-tcgangggggggcc-ggncccaattngccctatantgagt 637
|||||

Subject: 294 aagcttatcgatcccgcgacctcgagggggggcccggtccaattcgccctatagtgagt 353
|||||

Query: 638 cgtantacaattacttggncgcgntttacaacgctcgtg 675

||||| ||||| ||| ||||| |||||||

Objct: 354 -gtattacaattcactggccgcgntttacaacgctcgtg 390

No clone AG B4 também foi observado uma elevada similaridade genética com seqüências exônicas:

gb|U52642.1|RATPAM06 *Rattus norvegicus* peptidylglycine alph... 64 5×10^{-08}
ref|NM_000919.1| *Homo sapiens* peptidylglycine alpha-amidati... 60 8×10^{-07}
gb|AF010472.1|AF010472 *Homo sapiens* alpha-amidating monooxy... 60 8×10^{-07}
gb|S75038.1|S75038 pancreatic peptidylglycine alpha-amidati... 60 8×10^{-07}
gb|S75037.1|S75037 pancreatic peptidylglycine alpha-amidati... 60 8×10^{-07}
gb|M37721.1|HUMPAM12 Human peptidylglycine alpha-amidating ... 60 8×10^{-07}

Foram observados os seguintes motivos repetitivos na seqüência do DNA obtidas:

AG C127 – (TG)₆₁

AG 23 – (GT)₁₂

AG B4 – (CA)₈ cccaccccccaac(CA)₄ e (AGGGAG)₄ imperfeito

AG 49 –CCCCCCCCCCCCCCCCCAGGTTG imperfeito

Devido a ausência de reação com o primer reverso do M13 utilizado pelo método automático, O DNA dos clones AG23, AG25 foram novamente submetidos ao sequenciamento, mas este também foi parcial, não havendo alteração no quadro de seqüências repetitivas obtidas. Destes clones analisados, foram avaliados primers para os seguintes clones:

AG B4 98 (CA)₈ cccaccccccaac(CA)₄ 401

303 pb | _____ |

AG C127 331pb	42	(GT) ₆₁	373
AG 23 (179 pb)	423	(GT) ₁₂	581

Além das seqüências de *Antilophia galeata*, foram sintetizados os primers Dpu 05 e Dpu 16 de *Dendroica petechia* (Dawson et al. 1997), HrU 6 de *Hirundo rústica* (Primmer et al. 1995), STG 4 de *Hirundo rustica* (Ellegren 1992a) e Cum 4 e Cum 28 de *Catharus ustulatus* (Gibbs et al. 1999), todos de passeriformes, com representantes do gênero no Brasil. Não foi obtido nenhum microsatélite de passeriformes de gêneros próximos ao de *Antilophia galeata*.

Condições das reações de PCR

Todos os primers sintetizados foram testados para se determinar as condições ideais para amplificação.

Foram padronizadas as reações de amplificação para os primers HrU6, AGA2, ACG127 e DPU16. Os demais primers não apresentaram resultados satisfatórios e para serem utilizados futuramente, deverão ser avaliados mais detalhadamente.

A reação final para o PCR variou em função do primer e da quantidade de DNA existente nas amostras. Para os primers AGA2, ACG127, HrU6 e DPU16 foi usada a reação em baixa e várias amostras apresentaram um bom resultados de amplificação. O T_m utilizado foi igual a 53 °C.

DNA	1,5 μ L
H2O Milli-Q	14,25 μ L
Tampão	2,5 μ L
dNTPs	2 μ L
Primer	2 μ L
Mg ⁺⁺	0,75 μ L
DNA taq polimerase	2 μ L

Volume final = 25 μ L

Para as amostras que não apresentaram um bom resultado inicial com a reação anterior, foi feita uma segunda tentativa descrita na reação que se segue, com aumento da concentração do DNA para até 100 ng.

DNA	3,0 μ L
H2O Milli-Q	12,75 μ L
Tampão	2,5 μ L
dNTPs	2 μ L
Primer	2 μ L
Mg ⁺⁺	0,75 μ L
DNA taq polimerase	2 μ L

Volume final = 25 μ L

Extrações de DNA e amplificações

Foram feitas 2268 tentativas de amplificação nas várias amostras de DNA extraídas a partir de 140 amostras de sangue de *Antilopha galeata*, o que significa que foram feitas em média 16,2 tentativas para cada indivíduo dos quais foram feitas coletas de sangue.

Foram feitas extrações de DNA de 145 indivíduos, que estão na Tabela 17, no anexo do capítulo.

Devido às réplicas de tentativas de extração de DNA, em 277 delas foram observados pellet à análise visual. Estes resultados estão apresentadas também na Tabela 17, onde consta, para cada amostra, os primers amplificados. A Tabela 18, abaixo, apresenta o número de amostras onde foram conseguidas amplificações dos vários primers, amplificações estas comprovadas em gel de agarose. O primer que apresentou melhor resultado quanto ao número de amplificações foi o AGA2. Os demais apresentaram valores similares.

A Tabela 19 apresenta o número de indivíduos em cada população cujo DNA apresentou amplificações com pelo menos um dos primers. Como pode ser notado, a população da Rio Vermelho apresentou um maior número de amplificações quando feitas confirmações em gel de agarose.

Tabela 18 – Número de amostras nas quais os primers amplificaram com sucesso constatado em gel de agarose.

Área	Primer				Total
	HrU6	AGA2	AGC127	PDU16	
Rio Vermelho	17	19	16	15	67
Riacho Fundo	1	13	15	11	40
Capetinga	2	11	11	13	37
Bananal	5	6	12	14	37
Mato Seco	5	10	11	11	37
Olho d'Água	6	5	5	13	29
Sobradinho	6	9	7	8	30

Tabela 19 – Número de indivíduos em cada população com pelo menos um locus amplificado

<i>População</i>	<i>Nº ind. DNA amplificado</i>	<i>Total de indivíduos</i>
Olho d'Água	16	20
Bananal	18	20
Capetinga	17	20
Mato Seco	16	20
Riacho Fundo	17	25
Sobradinho	12	20
Rio Vermelho	19	20

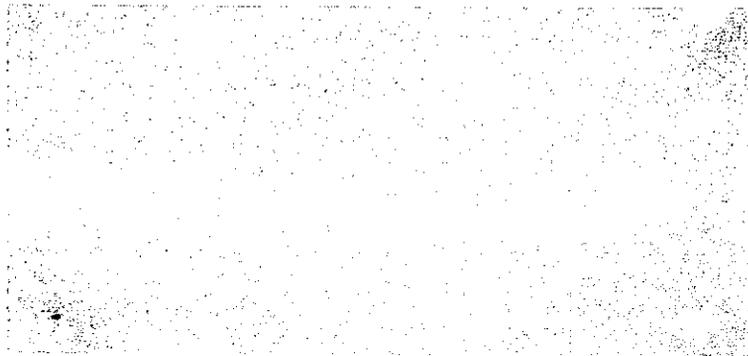
Análise de polimorfismo

A Figura 18 mostra exemplos do aspecto do resultado das amplificações no gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio.

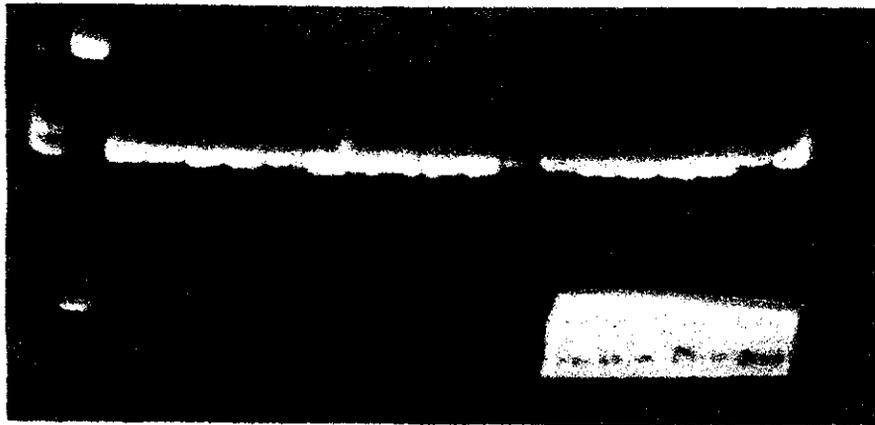
A Tabela 20 mostra o número de indivíduos cujo produto da amplificação foi visível no gel de poliacrilamida. As populações do Capetinga e de rio Vermelho apresentaram mesmo número de indivíduos que amplificaram pelo menos um locus. As demais populações apresentaram valores inferiores a estes.

Tabela 20 – Número de indivíduos que apresentaram amplificação em pelo menos um locus demonstrável em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio.

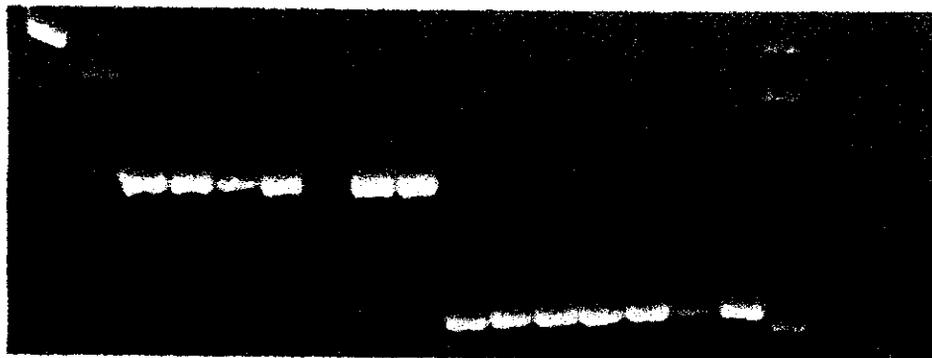
<i>População</i>	<i>Nº ind. DNA amplificado</i>
Olho d'Água	11
Bananal	13
Capetinga	17
Mato Seco	10
Riacho Fundo	14
Sobradinho	12
Rio Vermelho	17



Amplificações com o primer DPU16



Amplificações com o primer DPU16



Amplificações com HrU6 e AGC127

Figura 18 – Exemplos das amplificações de alguns loci visualizadas em gel de poliacrilamida.

A Tabela 21 permite observar a heterozigosidade em cada população amostrada, a heterozigosidade esperada e também o número médio de alelos. As populações de rio Vermelho e Bananal apresentaram, em média, um maior número de locus amplificados. A heterozigosidade observada variou em uma amplitude de 0,87 a 0,93. A população que apresentou maior heterozigosidade observada foi a do Rio Vermelho e aquelas do Córrego Mato Seco, Olho d'água apresentaram os menores valores para esta variável. A heterozigosidade esperada variou pouco em amplitude (0,94 a 0,97). Podemos também observar que as populações do Córrego Bananal e Rio Vermelho, apresentaram, em média, maior número de alelos/indivíduo.

Tabela 21 – Heterozigosidade observada (H) e heterozigosidade esperada (He) em cada população e o número médio de alelos por indivíduo em cada população.

<i>População</i>	<i>H</i>	<i>He</i>	<i>Media nº alelos/ind.</i>
Olho d'Água	0,87	0,94	1,58
Bananal	0,90	0,96	2,23
Capetinga	0,92	0,96	1,65
Mato Seco	0,87	0,96	1,8
Riacho Fundo	0,91	0,96	1,71
Sobradinho	0,91	0,97	1,25
Rio Vermelho	0,93	0,97	2,44

A Tabela 22 apresenta a freqüência alélica amplificadas nas várias populações de *Antilophia galeata*. O locus HRU6 apresentou 4 alelos, AGA2, 2 alelos e AGC127, apresentou 3. O locus DPU16 apresentou 5 alelos e também uma maior freqüência de amplificação dos vários alelos.

A Tabela 23 apresenta a matriz de dados usada para a análise de componentes principais e a Tabela 24 apresenta a matriz das distâncias euclidianas usada nas análises de correlação e covariância entre as distâncias euclidianas e distância percorrida entre distâncias lineares e distâncias potencialmente percorridas por possíveis migrantes.

A análise de componentes principais apresentou variância acumulada nos quatro primeiros eixos igual a 65,30% (Tabela 25) e, como podemos observar na Figura 19, não houve separação nítida entre as populações, havendo uma grande sobreposição nos pontos que representam as várias populações. Vários pontos coincidem em localização idêntica e devido ao seu elevado número, estão discriminados na Tabela 26.

Tabela 22 – Frequência alélica total dos locus HrU6, AGA2, AGC127 e Dpu16 em indivíduos de *Antilophia galeata*.

HRU 6		
Alelo	Freq.	Frequência
153	6	13,33
173	23	51,11
177	4	8,89
185	12	26,66
Total	45	100,00
AGA 2		
Alelo	Freq.	Frequência
465	14	87,50
480	2	12,50
Total	16	100,00
Dpu 16		
Alelo	Freq.	Frequência
130	1	1,16
142	9	10,46
150	24	27,91
154	31	36,05
159	21	24,42
Total	86	100,00
AGC127		
Alelo	Freq.	Frequência
360	5	23,81
373	5	23,81
369	11	52,38
Total	21	100,00

Tabela 23 – Matriz apresentando, em cada população número de indivíduos que amplificaram o alelo X.

Área	Alelo													
	HrU6				AGA		AGC127			DPU16				
	153	173	177	185	465	480	373	360	369	130	142	150	154	159
Silv.	2	7	2	8	1	0	0	0	0	1	3	4	6	5
Capet.	0	2	0	0	5	0	1	2	2	0	0	8	9	1
OD	1	2	0	1	0	0	3	1	2	0	2	3	1	2
Ban	3	2	1	2	2	0	0	2	3	0	1	2	2	8
MG	0	2	1	0	3	0	1	0	0	0	1	3	4	3
RF	0	4	0	1	2	0	0	0	4	0	1	2	8	2
Sob.	0	4	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	1	4

Tabela 24 – Matriz de distâncias euclidiana usadas para as análises de correlação e covariância.

	<i>SIL</i>	<i>CC</i>	<i>OD</i>	<i>BAN</i>	<i>MG</i>	<i>RF</i>	<i>SOB</i>
SIL	0,00	3,82	3,33	2,99	3,10	3,13	3,44
CC	.	0,00	2,60	3,07	2,01	2,02	2,99
OD	.	.	0,00	2,35	1,72	2,17	2,27
BAN	.	.	.	0,00	2,31	2,45	2,64
MG	0,00	1,68	1,81
RF	0,00	2,31
SOB	0,00

Tabela 25 – Variância absoluta e acumulada nos quatro primeiros eixos gerados pela análise de componentes principais.

Eixo	Variância absoluta	Variância acumulada
1	27,15	27,15
2	14,59	41,74
3	12,58	54,31
4	10,99	65,30

Tabela 26 – Número de pontos que se sobrepuseram na análise de componentes principais e suas coordenadas cartesianas.

População – n° de pontos	Eixo X	Eixo Y
1 rio Vermelho	0,07	0,07
1 Olho d'Água		
1 Capetinga	0,015	0,006
1 Olho d'Água		
2 Riacho Fundo		
1 rio Vermelho	0,17	0,12
1 Olho d'Água		
1 Sobradinho		
1 rio Vermelho	0,034	-0,04
1 Bananal		
2 Olho d'Água	0,47	0,103
1 Mato Seco		
2 Sobradinho		
2 Olho d'Água	0,061	-0,145
2 Bananal		
3 Mato Seco		
4 Sobradinho		
4 Capetinga	0,087	0,074
1 Olho d'Água		
4 Riacho Fundo		
1 rio Vermelho	0,112	0,086
1 Capetinga		
2 Capetinga	0,124	0,086
1 Mato Seco		
1 Capetinga	0,126	-0,162
1 Riacho Fundo		
1 rio Vermelho	0,15	0,188
1 Riacho Fundo		

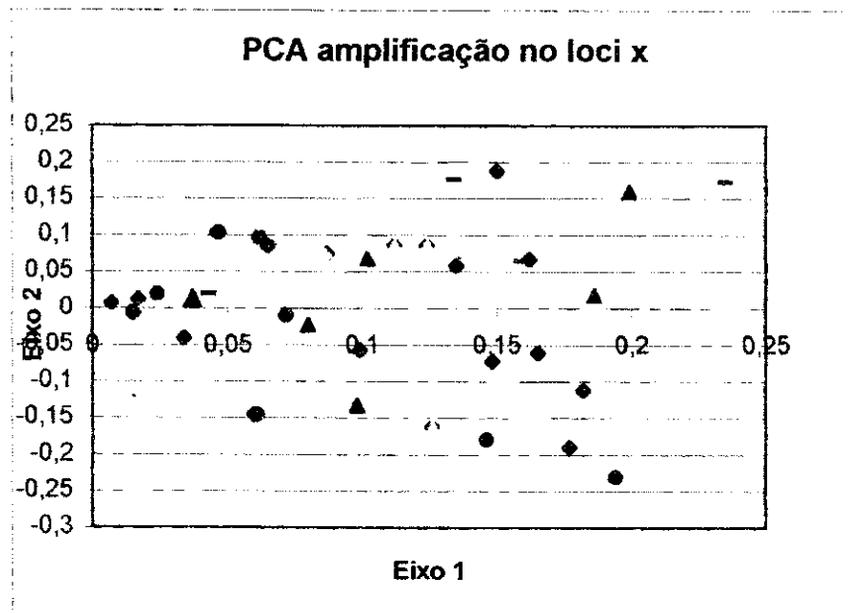


Figura 19 – Resultado da análise de componentes principais considerando-se a matriz de presença/ausência de loci amplificado (◆ = rio Vermelho; ◻ = córrego Capetinga; ● = Olho d'Água; ◻ = córrego Bananal; — = córrego Mato Seco; ◻ = ribeirão Sobradinho; ▲ = Riacho Fundo).

Os dados sobre a variância relacionada aos quatro primeiros eixos da PCA estão apresentados na Tabela 27. A análise de componentes principais, feita a partir da matriz de número de indivíduos que amplificou o loci x em cada área (Figura 19), permite observar que os pontos estão bastante próximos, podendo destacar apenas localizações extremas como rio Vermelho e Capetinga. Ao longo do eixo 1, que nesta análise sempre explica a maior proporção da variância do sistema e também é o eixo que normalmente está associado a uma maior proporção de informação do sistema não separa de forma acentuada as várias populações, destacando os pontos extremos, rio Vermelho e que áreas como Sobradinho e Olho d'Água estão bastante próximas. Ao longo do eixo 2, também temos pequenas distâncias entre áreas, com destaque para a população do córrego Capetinga que segundo este eixo, também ocupa posição extrema.

Tabela 27 – Variância absoluta e acumulada nos quatro primeiros eixos gerados pela análise de componentes principais.

Eixo	Variância absoluta	Variância acumulada
1	70,05	70,05
2	15,42	85,47
3	6,87	92,34
4	3,03	95,37

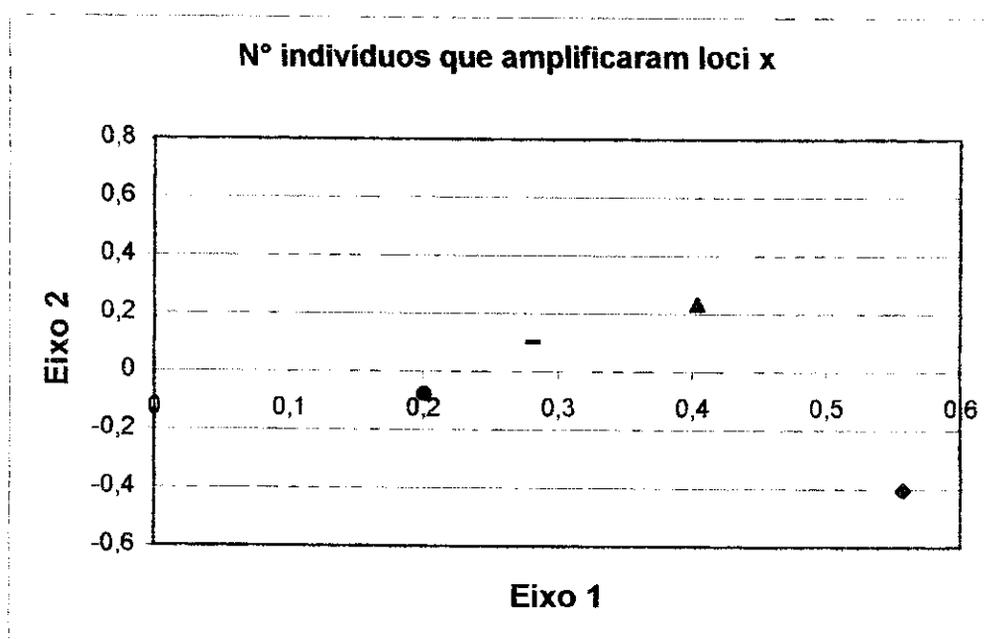


Figura 20 – Resultado da análise de componentes principais considerando-se a matriz de número de indivíduos que amplificou o loci x (◆ = rio Vermelho; ● = córrego Capetinga; ● = Olho d'Água; — = córrego Bananal; — = córrego Mato Seco; ○ = ribeirão Sobradinho; ▲ = Riacho Fundo).

O resultado do teste MRPP considerando-se todas as populações não acusou existência de diferenças entre elas ($R = 0,04482547$). Ao se comparar cada população com o restante, usando-se este mesmo teste, foram encontrados os valores abaixo para R, que também muito próximos do valor zero. A população do córrego Mato Seco, apresentou, a, ajuste com o conjunto das demais, maior que o esperado pelo acaso (valor negativo de

Vermeelho = 0,01644797

Córrego Capetinga = 0,01425530

Matad'Água = 0,00059115

Córrego Bananal = 0,00891280

Córrego Mato Seco = -0,00064985

Córrego Fundo = 0,00829549

Matad'Água Sobradinho = 0,00536017

Foram encontrados valores positivos para a covariância e para os coeficientes de correlação entre as distâncias euclidianas relativas à matriz de número de indivíduos que indicaram o alelo X e as distâncias lineares entre fragmentos e as distâncias potencialmente percorridas por indivíduos de *Antilophia galeata* ao deslocarem entre fragmentos. Para as covariâncias, foram encontrados os valores 19,75 ($n=19$) e 3,16 ($n=13$), respectivamente entre distâncias euclidianas X distâncias lineares e distâncias euclidianas X distâncias potencialmente percorridas. Os coeficientes de correlação apresentaram valores de 0,72 ($n = 19$; $t_{\text{calculado}} = 4,53$; $t_{\text{crítico}} = 2,11$; $\alpha = 5\%$) e 0,46 ($n = 15$; $t_{\text{calculado}} = 1,87$; $t_{\text{crítico}} = 1,75$; $\alpha = 10\%$), respectivamente. As duas análises indicaram que a distância linear está mais correlacionada a distâncias euclidianas encontradas e que as distâncias potencialmente percorridas estão correlacionadas mais fracamente.

Discussão

Os padrões de amplificação foram sensíveis a pequena variação na concentração do DNA, mesmo quando este estava ressuspenso em água. Dos primers delineados com as sequências de AG (21 a 24 mer), apenas o locus AG A2 apresentou um padrão de amplificação considerado estável nas condições experimentais, sendo observados dois alelos na população avaliada, cujas frequências relativas foram respectivamente 0,87 e 0,13 (Tabela 22). A ausência de um padrão de amplificação estável pode estar correlacionada as regiões adjacentes da sequência repetitiva, uma vez que a pesquisa de primers foi dificultada pela repetitividade de nucleotídeos dentro da região passível, sendo necessário aumentar ou reduzir o número de bases para minimizar a formação de dímeros (Primer/dimer) quando presente. A formação de dímeros foi observada na eletroforese em gel de agarose em quase todos os primers, incluindo os primers de outros passeriformes. Entretanto, a formação de dímeros não impossibilitou a presença de bandas discretas na amplificação. Outros fatores podem ter contribuído para a baixa amplificação ou obtenção de um padrão de bandas estável e entre eles destaca-se problemas na síntese dos primers e a presença de inibidores da atividade polimerásica nas amostras de DNA. Com os primers HrU 6, DpU 16 e AGC127 foram observados, respectivamente, 4, 5 e 3 alelos nas populações analisadas (Tabela 22). Isso pode ser uma característica da própria população de *Antilophia galeata*, efeito da população amostral ou ainda um reflexo do grau evolutivo destas sequências. Considerando que estas regiões polimórficas apresentam uma rápida evolução, com movimentos de expansão/retração de bases e mutações, e ainda que *A. galeata* está filogeneticamente inferior às espécies origens dos primers avaliados, estes loci podem estar sofrendo um mecanismo evolutivo de aumento do número de alelos na escala evolutiva.

Embora uma limitação dos microsátélites seja o fato do primer ser específico ou amplificar locus somente em espécies próximas, esse estado evolutivo desconhecido permite que se observem ampliações heterólogas em espécies separadas por 20 milhões de anos. O primer STG4, por exemplo, usado para amplificar loci em *Hirundo rustica* amplificou locus em espécies relacionadas (Ellegren 1992). Isto justifica a pesquisa de loci já caracterizados em indivíduos de mesmo gênero e até mesmo filo. Entretanto dado a estes loci apresentarem

de 18 (Dpu 16) a 28 alelos (HrU 6), era esperado um maior nível de polimorfismo, uma vez que foram obtidos amplificação de bandas estáveis e discretas.

Os dados envolvendo as análises de covariância entre as distâncias euclidianas e distâncias entre os fragmentos mostraram correlações positivas entre estas duas variáveis, indicando que as maiores diferenças entre pares de áreas quanto a amplificação de loci, estão relacionadas às maiores distâncias entre as áreas, o que pode ser um indicador do efeito da distância nas diferenças encontradas entre as populações amostradas. Embora estes valores sejam hipotéticos, gerados por modelagem em sistema de informação geográfica associado a imagem de satélite, pode-se afirmar que, pelo conhecimento que se tem da biologia desta espécie, ocorra de fato um aumento da distância entre as áreas em relação às distâncias lineares, embora não se saiba estes valores exatos.

O estudo bioquímico da genética de aves está entrando em sua quarta década e muitas espécies já têm sido estudadas com detalhes. Contudo, estes estudos geralmente têm abordado espécies de regiões temperadas e poucos deles têm sido feitos com espécies tropicais ou insulares (Peterson *et al.* 1992).

Foi encontrada uma menor heterozigidade observada em relação à esperada. Este fato pode se dar em função da perda de alelos nas populações analisadas, mas também pode ter ocorrido em função do pequeno tamanho amostral. A heterozigidade observada de *Antilophia galeata* variou entre populações numa amplitude de 0,87 (Mato Seco e Olho d'Água), que apresentaram, também, maiores desvios em relação à heterozigidade esperada, a 0,93 (Rio Vermelho) e que, por sua vez, apresentou menor desvio em relação à heterozigidade esperada. Os valores obtidos para a heterozigidade estão dentro do âmbito encontrado por outros autores de resultados de pesquisas semelhantes com aves. Ao compararmos *A. galeata* com outras espécies já analisadas e citadas pela literatura, Primmer *et al.* (1995) encontrou uma heterozigidade de 0,97 para *Hirundo rustica*. Frankham (1997) estudando espécies endêmicas e não endêmicas de várias classes em comparações entre ilha continente, encontrou que as populações das ilhas têm menor heterozigidade que populações continentais. A redução da heterozigidade tem sido associada com uma série de efeitos negativos sobre o indivíduo bem como declínio populacional em populações pequenas

ou isoladas (Stangel e Lennartz 1988). Mais uma vez correlacionando os dados de variáveis genéticas (número de indivíduos que amplificaram o locus X) a variáveis ambientais (distância entre áreas), podemos perceber que as populações do córrego Mato Seco e do Olho d'Água estão restritas ao menores dos fragmentos analisados e que têm, além deste fator, seus entornos muito alterados, indicando um maior isolamento.

Ao se utilizar microsátélites em estudos envolvendo espécies silvestres esbarra-se em uma série de obstáculos, como por exemplo o número limitado de marcadores disponíveis como leque de escolha. Embora Fridolfsson *et al.* (1997) usando microsátélites de *Phylloscopus trochilus* em *Ficedula hypoleuca*, *Ficedula albicollis*, *Hirundo rustica* e *Luscinia svecica* encontrou produto de amplificação semelhantes ao de *P. trochilus*. Também Dawson *et al.* (1997) conseguiu amplificar com sucesso o locus Dpu16 em outras espécies por ele analisadas que não *Dendroica petechia*, porém os autores não tecem comentários sobre aspectos do polimorfismo para este locus. Bussche *et al.* (1999) encontrou uma baixa diversidade alélica em estudos envolvendo *Mycteria americana* e cita que seus trabalhos de então devem ser complementado com novos estudos envolvendo microsátélites que amplifiquem outros loci com maior variabilidade. Winker *et al.* (1999) cita que 5 de 15 microsátélites usados em *Limnophlypis swainsonii* não apresentaram variações, dois outros mostraram polimorfismo mas as bandas não eram discerníveis. Primmer *et al.* (1996) cita que ao se usar marcadores isolados de outras espécies, geralmente estes são menos polimórficos do que nas espécies para as quais foram isolados, podendo esta ser uma causa parcial do baixo polimorfismo encontrado no produto de amplificação de *Antilophia galeata* ao se usar sondas de outras espécies.

Primmer *et al.* (1995) cita que devido ao número limitado de microsátélites disponíveis e diante da necessidade de se usar este conjunto de microsátélites em populações selvagens, devemos levar em conta situações que podem diminuir o valor potencial do microsátélite. Cita que alelos nulos (que não amplificam) podem ser comumente encontrados. Em porcos, microsátélites apresentando alelos nulos estão na ordem 5 a 10% e em humanos estes valores podem chegar a 30%. Primmer *et al.* encontrou alelos nulos em *Hirundo rustica* citando que estes foram muito frequentes, diminuindo o potencial da técnica.

Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas entre populações, há uma correlação positiva entre distância entre áreas e distância genética entre populações indicando uma possível tendência à separação em populações discretas. A similaridade genética entre populações pode estar ocorrendo devido a fluxo gênico ainda existente, ou talvez ainda não tenhamos um número de gerações suficiente para que a diferenciação genética tenha ocorrido em função da alteração da matriz ambiental que leva a redução das áreas de ambientes naturais remanescentes e seu isolamento em função da alteração do entorno destas manchas de ambientes naturais. Além destes aspectos, deve ser considerado pela variabilidade encontrada, a necessidade de uma amostragem maior, tanto espacial como temporal.

Conclusões

Foi possível amplificar loci em *Antilophia galeata* usando primers de outras espécies. O material amplificado apresentou um reduzido número de alelos com elevada heterogozidade observada. O reduzido número de alelos pode ter ocorrido pelo grau evolutivo dos mesmos, uma vez que estes microssatélites podem evoluir, diversificando o número de alelos, acompanhando a escala evolutiva. Todos os loci avaliados são de espécies são mais evoluídas filogeneticamente que *A. galeata*.

As análises envolvendo estatística multivariada não diferenciaram as populações quanto aos loci amplificados, podendo todas elas, serem consideradas como pertencentes a um único conjunto populacional o que leva a crer que ou as modificações da matriz ambiental não interferiram no perfil genético de *A. galeata* ou o tempo transcorrido deste estas modificações não foi ainda suficiente para que tais modificações possam ser observadas.

Os dados de correlação e covariância entre distância genética e distância física entre fragmentos apresentaram tanto correlação quanto covariância significativas e positivas, podendo ser um indicativo de que esteja ocorrendo modificações na estrutura genética das populações de *Antilophia galeata* analisadas, ou em algumas delas, embora estas modificações não se façam expressar, ainda, no perfil genético das mesmas

Conclusões gerais

Antilophia galeata, e muito certamente outras espécies que têm suas áreas de distribuição dentro dos limites Cerrado, podem estar sendo afetadas pelas alterações ambientais. Estas alterações têm sido refletidas tanto na estrutura das comunidades de fragmentos de matas de galeria quanto, como podem também estar se refletindo na estrutura das populações nestas manchas de habitat, bem como na composição genética da espécie analisada. Estes fatos podem ser demonstrados através dos dados de sistemas de informações geográficas associados a dados sobre a biologia da espécie analisada bem como através de informações sobre índice de endogamia das populações. Para evitar que futuramente *Antilophia galeata* e outras espécies associadas a ambientes naturais, e que tenham biologia similar venham a estar comprometidas por estas alterações ambientais, é necessário que seja mantido tanto o fluxo de espécies quanto de indivíduos entre manchas de ambientes naturais para permitir a manutenção da composição da comunidade de aves bem como o fluxo gênico impedindo o isolamento das várias populações existentes na matriz ambiental atual. Esta possibilidade de deslocamento permitirá também que ocorram recolonizações em manchas onde eventualmente tenham ocorrido extinções, permitindo a persistência de várias espécies que, em decorrência das alterações ambientais possam estar persistindo, local ou regionalmente, em um modelo metapopulacional. Desta forma, não só é importante a manutenção de áreas de ambientes naturais, bem como do seu entorno, permitindo deslocamentos, aumento do tamanho efetivo destas áreas preservadas pois muitas espécies típicas de mata usam o entorno como fonte de alimento e permitindo também um efeito tamponador minimizando as influências do meio externo sobre estas áreas de ambientes naturais.

Bibliografia

- Aissani, B. e Bernardi, G. 1991. CpG islands: features and distribution in the genome of vertebrates. *Gene*, 106:173-183.
- Bird, A. P. 1987. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends in Genetics*, 3:342-347.
- Cheng, H. H. e Crittenden, L. B. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* 73:539-546.
- Cheng, J. J., Levin, I., Vallejo, R. L., Khatib, H., Dodgson, J. B., Crittenden, L. B. e Hillel, J. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science*, 74:1855-1874.
- Crooijmans, R. P. M. A., van Kampen, A. J. A., van der Poel, J. J. E Groener, M. A. M. 1996a. Highly polymorphic microsatellite markers in poultry. *Animal Genetics*, 24:441-443.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A. e Yezerinac, S. M. 1997. Isolation of microsatellite DNA marker from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79:506-514.
- Ellegren, H. 1992. Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites – a new approach do studies of genetic relationships in birds. *Auk*, 109(4):886-895.
- Ellegren, H., Andersson, L., Hohansson, M. e Sandberg, K. 1992. DNA fingerprinting in horses using a simple (TG)_n probe and its application to population comparisons. *Animal Genetics*, 23:1-9.
- Epplen, J. T. 1988. On simple repeated GAT/CA sequences in animal genomes: a critical reappraisal. *The Journal of Heridity*, 79:409-417.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignag, M. e Cornuet, J-M. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140:679-695.
- Fridolfsson, A-K., Gyllesten, U. B e Jakobsson, S. 1997. Microsatellite marker form paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair young in an island population. *Hereditas*, 126:127-132.

- Gibbs, H. L., Tabak, L. J. e Hobson, K. 1999. Characterization of microsatellite DNA loci for a neotropical migrant songbird, the Swainson's thrush (*Catharus ustulatus*). *Molecular Ecology*, 8:1551-1561.
- Gill, P. e Evett, I. 1995. Population genetics of short tandem repeat (STR) loci. *Genetica* 96: 69-87.
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L. E Feldman, M. W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139:463-471.
- Hamada, H. e Kakunaga, T. 1982. Potential Z/DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature*, 298:396.
- Hoelzel, A. R. e Dover, G. A. 1991. **Molecular Genetic Ecology**. New York. Oxford University Press. 75p.
- Holmes, N. G., Mellersh, C. S., Humphreys, S. J., Binns, M. M., Holliman, A., Curtis, R. e Sampson, J. 1993. Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics*, 24:289-292.
- Jamieson, A. 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*, 25:37-44.
- Joshi, A. K., Baichwal, V. e Ames, G. F. L. 1991. Rapid polymerase chain reaction amplification using intact bacterial cells. *BioTechniques*, 10(1):42-44.
- Kelly, A. J. e Willis, J. H. 1998. Polymorphic microsatellite loci in *Mimulus guttatus* and related species. *Molecular Ecology*, 7,769-774.
- Kirkpatrick, B. W., Huff, B. M. e Casas-Carillo, E. 1993. Double-strand DNA conformation polymorphisms as a source of highly polymorphic genetic marker. *Animal Genetics*, 24:155-161.
- Litt, M. e Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44:397-401.
- Love, J. M., Knight, A. M., McAleer, M. A. e Todd, J. A. 1990. Towards construction of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. *Nucleic Acid Research*, 18:4123-4130.

- Maestrini, E., Rivella, S., Tribioli, C., Purtilo, D. Rocchi, M., Archidiacono, N. e Toniolo, D. 1990. Probes form CpGs islands on the distal arm of the human X chromosome are clustered in Xq24 and Xq28. *Genomics*, 8:664-670.
- Mecl  cz, E. e Solignac, M. 1998. Microsatellite loci for *Parnassius mnemosyne* (Lepdotera). *Hereditas*, 128:179-180.
- Miesfeld, R, Krystal, M. e Arnheim, N. 1981. A member of a new repetead sequence family which is conserved trthroughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. *Nuc. Acid. Res*, 9:5931-5947.
- Mumme, R. L., Koenig, W. D., Zink, R. M. e Marten, J. A. 1985. Genetic variation and parentage in a California population of Acorn Woodpecker. *Auk*, 102:305-312.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetica*, 89:583-590.
- Neumann, K. e Wetton, J. H. 1996. Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow *Passer domesticus*. *Molecular Ecology*, 5:307-309.
- Oudet, C., Heiling, R., Hanauer, A. e Mandel, J-L. 1991. Non-radioactive assay for new microsatellite polymosphisms at the 5' end of tshe dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *American Journal of Human Genetics*, 49:311-319.
- Pena, S. D. J., Chakraborty, R. 1994. Paternity testing in the DNA era. *TIG*, 10(6):204-209.
- Primmer, C. R. e Ellegren, H. 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 15(8):997-1008.
- Primmer, C. R., M  ller, A. P. e Ellegren, H. 1995. Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology*, 4:493-498.
- Rabenold, P. P., Rabenold, K. N., Piper, W. H., Haydock, J. e Zack, S. W. 1990a. Shared parternity revealed by genetic analysis in cooperatively breeding tropical wrens. *Nature*, 348:538-540.
- Raleigh, E. A., Trimarchi, R. Revel, H. 1989. Genetic and physical mapping of the MCRA(RGLA) and MCRB(RCRB) loci of *Escherichia coli*. *Genetics*, 122(2):279-296.
- Rassmann, K., Schl  tterer, C. e Tautz, D. 1991. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprintig. *Electrophoresis*, 12:113-118.
- Rogers, J. 1983. CACA sequences – the ends and the means? *Nature*, 305:101-102.

- Rubertis, F., Comincini, S., Leone, P. e Ferretti, L. 1993. Construction of a library of bovine genomic fragments enriched in CpG islands. *Anim. Genetics*, 24:1-7.
- Ruiz, A. e Barbadilla, A. 1995. The contribution of quantitative trait loci and neutral marker loci to the genetic variances and covariances among quantitative traits in random mating populations. *Genetics*, 139:445-455.
- Ruyter-Spira, C. R., Gu, Z. L., van der Poel, J. J. e Groener, M. A. M. 1996. Bulked segregant analysis using microsatellites: mapping of the dominant white locus in the chicken. *Poultry Science*, 76:386-391.
- Sambrook, J., Fritsch, E. P. e Maniatis, T. 1986. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Stallings, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E. e Moysis, R. K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807-815.
- Tautz, D. e Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research*, 12:4127-4138.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. e Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4):506-512.
- Weber, J. L. e May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 44:388-396.

Апехо

134

Construção da biblioteca genômica

- 1 - Coletar em vacutainer 4 a 5 amostras (5 μ L cada) de sangue total (aproximadamente 10 a 20 μ L) de aves de diferentes procedências;
- 2 - Adicionar 400 μ L de Mistura de Lise de Madsen, 20 μ L de Proteinase K (10mg/ml) e incubar a 55°C em banho-maria por quatro horas ou O.N. a 37°C;
- 3 - Adicionar 1,5 ml de tampão TE e 1,5 ml de clorofane e agitar por 5 min;
- 4 - Centrifugar a 5 min., 3000rpm, T.A. e remover a fase aquosa;
- 5 - Repetir os passos 3 e 4;
- 6 - Adicionar 500 μ L de TE e 1,5 ml de clorofil e misturar por 5 min.;
- 7 - Centrifugar a 5 min., 3000 rpm e transferir a fase aquosa;
- 8 - Adicionar 0,8% (V/V) de NaCl 4M e 2 volumes de Etanol 95% -20°C;
- 9 - Misturar suavemente e centrifugar o tubo a 3000rpm, 5 min;
- 10 - Decantar o etanol e lavar o pellet de DNA com 1ml de etanol 70% gelado;
- 11 - Secar o DNA e ressuspender o pellet em 350 μ L de tampão TE;
- 12 - Quantificar o DNA e verificar integridade em gel de agarose 0,8%.

teste da técnica de clonagem

Para testar a simplificação da técnica de clonagem, foram construídas novas bibliotecas genômicas, com alterações de algumas etapas desta nova metodologia de clonagem como descrito a seguir:

Digestão com *Hind III*

- 1 - Coletar em tubo eppendorf 10 a 25 μ g do pool de DNA de cada ave isoladamente;
- 2 - Adicionar 20 μ L de tampão React-2, completar para 200 μ L com água e adicionar 5 μ L de enzima *Hind III* (20u/ μ L);
- 3 - Incubar a 37°C, overnight (O. N.);
- 4 - Remover 10 μ L da mistura e verificar a digestão em gel de agarose 0,8%;
- 5 - Adicionar 200 μ L de TE e extrair o DNA com 1 volume de fenol, clorofane e clorofil, uma vez

cada. Centrifugar a 5min, 10.000rpm a 4°C;

- 6 - Precipitar o DNA com 10% volume de 4M NaCl e 1,5 volume de etanol (-20°C);
- 7 - Lavar o DNA com Etanol 70% gelado, secar, ressuspender em 20µL de TE e quantificar em gel de agarose 0,8%.

Defosforilação

- 1 - Misturar em um novo tubo eppendorf: 16µL da digestão com **Hind III** (+/- 25ng); 5 µL tampão CIP 10X; 4µL da enzima CIP a 0,4U/µL; 26µL de água;
- 2 - Incubar a 37°C por 30 a 60 min.;
- 3 - Resfriar no gelo e adicionar 0,5µL 0,5M EDTA; 2,5µL 10% SDS. Incubar a 75°C por 10 min.;
- 4 - Adicionar 50µL de água e extrair o DNA 1 vez com 100µL de clorofane e clorofil;
- 5 - Precipitar o DNA com 10% volume de 4M NaCl e 1,5 volume de etanol (-20°C);
- 6 - Lavar o DNA com Etanol 70% gelado, secar, ressuspender em 30µL de TE e quantificar em gel de agarose 0,8%.

Digestão do DNA Aves/ *Hind III* Phos - com *Eco RI*

- 1 - Separar em um tubo 3µL do DNA ressuspensão;
- 2 - Preparar a seguinte mistura de digestão: 30µL DNA digerido; 150µL água; 20µL Tampão 10X para *Eco RI*; 4µL de enzima *Eco RI* (20U/µL);
- 3 - Incubar O.N. a 37°C;
- 4 - Verificar a digestão por eletroforese de 10µL da mistura de digestão;
- 5 - Purificar o DNA com 100µL de clorofane e clorofil e precipitar o DNA com 10% volume de 4M NaCl e etanol como acima;
- 6 - Adicionar 800µL de etanol 70% gelado, centrifugar 10 min a 10.000rpm a 4°C. Secar o pellet e ressuspender em 20µL de água;
- 7 - Quantificar.

Digestão do vetor p-Bluscript com Hind/Eco RI

- 1 - Preparar a seguinte mistura de digestão: 5 μ L (5 ng) do vetor; 175 μ L de água; 20 μ L tampão NEB2 e 5 μ L de **Hind III**;
- 2 - Incubar a 27°C, O.N. – verificar a digestão completa em gel de agarose 1%;
- 3 - Precipitar o DNA com 500 μ L de etanol 100% (-20°C) e 20 μ L de 4M NaCl;
- 4 - Centrifugar 15 min, 4°C, 10.000 rpm;
- 5 - Decantar o etanol e adicionar 800 μ L de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 min;
- 6 - Secar o DNA e ressuspender de 90 μ L de TE;
- 7 - Proceder a segunda digestão com adição de 10 μ L de tampão 10X para **Eco RI**; 5 μ L de enzima **Eco RI** (20U/ μ L). Incubar a 37°C O.N.;
- 8 - Adicionar 2 μ L de CIP (0,4U/ μ L) e incubar a 37°C por 45 min;
- 9 - Parar a reação com 1 μ L 0,5 M EDTA, 5 μ L 10% SDS – incubar a 75°C por 10 min;
- 10 - Extrair uma vez com 1 volume de clorofane e clorofil;
- 11 - Precipitar o DNA com 500 μ L de etanol 100% (-20°C) e 20 μ L de 4M NaCl;
- 12 - Ressuspender o DNA com 20 μ L de água. Quantificar em agarose 1%

Ligação, Plaqueamento e Screening da Livraria Genômica

As ligações foram feitas de acordo com Sambrook *et al.* (1986). Para a livraria de pássaros foi utilizado 0,6 μ g de vetor e um excesso molar do DNA genômico de: 3:1 a 5:1 para as bibliotecas de **EcoRI/Hind III**. 48ng do DNA da livraria de pássaros foi utilizado para eletroporar *E. coli* XL1 blue (Cell-Porator - Gibco BRL), de acordo com instruções do fabricante.

Ligação

- 1 - Misturar num tubo eppendorf de 500 μ L: 3 μ L do DNA genômico (\pm 1,5 μ g); 3 μ L do vetor (\pm 0,8 μ g), 2,5 μ L do tampão de ligação 10X;
- 2 - Remover 10 μ L da amostra e conservar a -20°C ;
- 3 - Incubar a mistura de ligação a 16°C , O.N;
- 4 - Remover 3 μ L da ligação e analisar em gel de agarose 1%;
- 5 - Conservar o sistema a -20°C .

Transformação

- 1 - Preparar as células de *E. coli* XL1-blue para transformação pelo método de eletroporação, segundo especificações do fabricante (Gibco-BRL);
- 2 - Adicionar em um tubo eppendorf de 500 μ L, 20 μ L de células competentes e 2 μ L do sistema de ligação. Incubar no gelo por 30 min.

Amostra	DNA ng	Vetor ng
<i>A. galeata</i>	120	48
<i>T. rufus</i>	192	48
<i>T. rufiventris</i>	240	48

- 3 - Transferir as células para uma cubeta de eletroporação e dar um pulso de 2,44KV;
- 4 - Remover as células transformadas e inocular em 1 ml de meio SOC (Sambrook et al 1986). Incubar as células a 37°C por 1 hora com agitação;
- 5 - Transferir a cultura para o gelo e plaquear em meio seletivo LB-ampicilina/X-gal de 50 a 100 μ L da cultura. Incubar em estufa a 37°C até crescimento. Quantificar os clones crescidos;
- 6 - Adicionar ao restante das células 500 μ L de glicerol estéril e conservar a -20°C ou -80°C .

Repique dos clones transformantes e lise das colônias

- 1 - Cortar discos de membrana de nylon (N+ Hybond) do tamanho da placa de cultura, quadricular, registrar e numerar devidamente. Depositar cuidadosamente sob o ágar em metade das placas;
- 2 - Transferir os clones brancos obtidos com auxílio de palito estéril (técnica de repicagem) ou pela técnica do replic plate para uma placa contendo meio LB-ampicilina (placa master) e para outra contendo a membrana de nylon, na mesma posição;
- 3 - Incubar em estufa a 37°C, O.N. e conservar a 4°C;
- 4 - Remover as membranas de nylon cuidadosamente com pinça e proceder a lise das colônias de acordo com Sambrook *et al* (1986).

Screening das livrarias genômicas

- 1 - Acomodar as membranas em redes de nylon, e inserir em garrafas do forno (Biorad) para hibridização;
- 2 - Imergir as membranas em solução 2xSSC por 5 minutos;
- 3 - Decantar a solução e bloquear as membranas com 50 ml de solução DNA Block para oligos e incubar até 3h a 65°C sob agitação suave;
- 4 - Marcar 200ng de sonda segundo tabela abaixo:

Reagente	Volume - μ L
Oligonucleotídeo sintético (100ng/ μ L)	2
Água	12.5
Tampão 10X	2
[γ ³² P]dATP	2
Enzima PNK (20U/ μ L)	1,5
Vol. Final	20 μ L

Incubar por 1h a 37°C.

- Ferver o sistema de marcação por 5 minutos em banho-maria. Conservar no gelo;
- Decantar a solução de bloqueio;
- Adicionar a sonda desnaturada na solução de hibridização, verter na garrafa e incubar a 37°C, O.N.
- Remover a solução de hibridização e proceder as seguintes lavagens:
 - 2x (5 min) 6XSSC, 0.1% SDS, 0.05% pipi, T.A., agitação;
 - 2x (10min) 3XSSC, 0.1% SDS, 0.05% pipi, 40°C, agitação;
 - 2x (5 min) 6XSSC, 0.1% SDS, T.A., agitação;
- Remover as membranas da garrafa e deixar secar 5 min a T.A.;
- 0 - Acomodar em cassete e expor por 12 a 24 horas;
- 1 - Selecionar os clones positivos correspondentes da placa master e extrair o plasmídeo pela técnica do mini-prep alcalina (Sambrook *et al* 1986) ou em colunas Quiagen.

Extração do DNA

Extração com guanidina

5 µL de sangue ← 1 µL de SDS 10%
 ↓
 50 µL de TE ← 3 µL de proteinase K 10mg/ml
 ↓
 Incubar a 65°C por 2 horas
 ↓
 Volume final = 200 µL TE
 ↓
 300 µL de guanidina
 ↓
 Vórtex
 ↓
 banho-maria por 15 min a 60° C
 ↓
 Vórtex
 ↓
 18 µL ACNH₄ 7,5 M
 ↓
 300 µL de clorofil
 ↓

Mix por 5 minutos
↓
Gelo
↓
Centrifugar a 10000 rpm por 10 min
↓
Retirar fase aquosa
↓
½ a 1 volume de isopropanol
↓
Mix
↓
Centrifugar a 10000 rpm por 5 min
↓
Verter o líquido preservando o pellet
↓
500µL de etanol 70% gelado
↓
Centrifugar a 10000 rpm por 5 min
↓
Verter o líquido preservando o pellet
↓
Secar à temperatura ambiente
↓
Ressuspender com 50 µL água Milli-Q

Extração com clorofane

5 µL de sangue ← 1 µL de SDS 10%
↓
50 µL de TE ← 3 µL de proteinase K 10mg/ml
↓
Incubar a 65°C por 2 horas
↓
300 µL de TE
↓
200 µL de clorofane
↓
Mix por 5 min
↓
Centrifugar a 10000 rpm por 10 min
↓
Retirar fase aquosa
↓
200 µL de clorofil

↓
Mix por 5 min
↓
Centrifugar a 10000 rpm por 10 min
↓
Retirar fase aquosa
↓
50 µL ACNH₄
↓
Mix
↓
½ a 1 vol de isopropanol
↓
Mix
↓
Centrifugar a 10000 rpm por 5 min
↓
Verter o líquido preservando o pellet
↓
500 µL de etanol 70% gelado
↓
Verter o líquido preservando o pellet
↓
Secar à temperatura ambiente
↓
Ressuspender com 50 µL de água Milli-Q

Extração com Quelex

Adicionar 2 a 10 µL de sangue em tubo eppendorf de 1,5ml
↓
Adicionar 200 µL chelex 100 (10%) e mix
↓
Ferver em banho-maria por 5-10min
↓
Resfriar à temperatura ambiente
↓
Centrifugar por 10000 rpm por 10 minutos
↓
Recolocar o sobrenadante para outro tubo eppendorf
↓
Utilizar 1 a 10 µL da solução para PCR

Lista dos primers sintetizados

AGC 127 F

Peso molecular: 6790,9
Picomoles total: 151453,50
Tm (°C): 50
Número de bases: 21

Dpu05 F

Peso molecular: 5825,19
Picomoles total: 102560,40
Tm (°C): 50
Número de bases: 18

Dpu16 F

Peso molecular: 6473,71
Picomoles total: 97740,72
Tm (°C): 46
Número de bases: 20

AG 23 F

Peso molecular: 6599,81
Picomoles total: 137197,48
Tm (°C): 50
Número de bases: 21

STG4 F

Peso molecular: 7923,7
Picomoles total: 121440,00
Tm (°C): 57
Número de bases: 24

HrU 6 F

Peso molecular: 6750,88
Picomoles total: 118281,92

AGC 127 R

Peso molecular: 6446,68
Picomoles total: 112041,38
Tm (°C): 46
Número de bases: 20

Dpu05 R

Peso molecular: 6406,66
Picomoles total: 99256,56
Tm (°C): 46
Número de bases: 20

Dpu16 R

Peso molecular: 6099,41
Picomoles total: 93126,54
Tm (°C): 49
Número de bases: 19

AG 23 R

Peso molecular: 6748,92
Picomoles total: 91892,82
Tm (°C): 49
Número de bases: 21

STG4 R

Peso molecular: 7642,55
Picomoles total: 124498,08
Tm (°C): 49
Número de bases: 24

HrU6 R

Peso molecular: 6454,66
Picomoles total: 140924,20

Tm (°C): 50

Número de bases: 21

AGA2 F

Peso molecular: 6412,68

Picomoles total: 123737,74

Tm (°C): 50

Número de bases: 20

Cuu 28 R

Peso molecular: 7179,18

Picomoles total: 135858,08

Tm (°C): 51

Número de bases: 22

Cuu 4 F

Peso molecular: 6736,9

Picomoles total: 130122,42

Tm (°C): 47

Número de bases: 21

Tm (°C): 52

Número de bases: 20

AGA2 R

Peso molecular: 6455,65

Picomoles total: 179110,98

Tm (°C): 56

Número de bases: 20

Cuu 28 F

Peso molecular: 6520,72

Picomoles total: 104652,18

Tm (°C): 48

Número de bases: 20

Cuu 4 R

Peso molecular: 7147,18

Picomoles total: 92512,68

Tm (°C): 47

Número de bases: 22

Diluição dos primers

AGC 127 F

Primer: 3,5 µL
Água (*): 46,5µL
(* Mili-Q)

AGC 127 R

Primer: 5 µL
Água: 45 µL

Cuu 28 F

Primer: 5,5 µL
Água: 44,5 µL

Dpu05 F

Primer: 5 µL
Água: 45 µL

Dpu05 R

Primer: 6 µL
Água: 44 µL

Cuu 28 R

Primer: 4,5 µL
Água: 44,5 µL

Dpu16 F

Primer: 6 µL
Água: 44 µL

Dpu16 R

Primer: 6 µL
Água: 44 µL

AG 23 F

Primer: 4,5 µL
Água: 44,5

AG 23 R

Primer: 6,5 µL
Água: 43,5 µL

HrU 6 F

Primer: 5 µL
Água: 45 µL

HrU 6 R

Primer: 4 µL
Água: 46 µL

AGA2 F

Primer: 5,5 µL
Água: 44,5 µL

AGA2 R

Primer: 3,5 µL
Água: 46,5 µL

Cuu 4 F

Primer: 4,5 µL
Água: 45,5 µL

Cuu 4 R

Primer: 6 µL
Água: 44 µL

Primers amplificados

Tabela 17 - Primers amplificados nas amostras de DNA nas várias populações de *Antilophia galeata*.

Amostra	Área	HrU6	AGA2	Primer		
				AGC127	DPU16	AG23
4C	OD			AGC127	DPU16	
4G						
5C	OD	HrU6		AGC127	DPU16	
5G						
14C	OD	HrU6			DPU16	
14G						
16G	OD		AGA2R			AG23
24"	OD	HrU6	AGA2		DPU16	AG23
24C						
24G						
36	OD	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	
36G						
36C						
42G	OD					AG23
73	OD	HrU6			DPU16	
73G						
73C						
73"						
75C	OD					
75G						
76R	OD				DPU16	
76G						
76C						
76"						
76'''						
77C	OD					AG23

		Primer			
7C	OD				AG23
7G					
8G	OD				
8C					
6C	OD			DPU16	
6G					
6					
86C	OD			DPU16	
86G					
28	OD	AGA2	AGC127	DPU16	AG23
28'					
28V					
30C	OD	HrU6			
30M					
30'					
51G	OD			DPU16	
51C					
52	OD	AGA2R	AGC127	DPU16	AG23
52'					
52"					
52'G					
52G	OD			DPU16	
10C	Bananal			DPU16R	
10G					
13	Bananal			DPU16	
13'					
13NE					
14M	Bananal	HrU6	AGC127	DPU16	AG23
14G					
14C					

Primer

315G	Bananal				
315C					
324	Bananal		AGA2	AGC127	DPU16 AG23
324'					
324G					
324C					
326	Bananal	HrU6		AGC127	DPU16 AG23
326G					
336C	Bananal				DPU16
346	Bananal	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16
346'					
346C					
346G					
352C	FAL			AGC127	DPU16 AG23
352V					
392C	FAL				DPU16
392G					
406G	FAL				DPU16
410	FAL		AGA2		DPU16 AG23
410G					
410C					
416"V	FAL		AGA2	AGC127	DPU16
416'					
416NE					
416					
424	FAL		AGA2	AGC127	DPU16
424'					
424G					
424G					
440	FAL				
440C					
440G					

				Primer			
454	FAL		AGA2	AGC127		DPU16	
461C	FAL			AGC127		DPU16	
461G							
465C	FAL					DPU16	
469C	FAL		AGA2R	AGC127		DPU16	
469G							
478	FAL	HrU6R	AGA2R	AGC127		DPU16	AG23
478G							
484C	FAL			AGC127		DPU16	
484G							
492	FAL		AGA2	AGC127		DPU16	
492G							
492C							
498	FAL					DPU16	AG23
498G							
500	FAL	HrU6	AGA2	AGC127			AG23
500'							
500"							
500C							
500G							
503G	FAL						
512G	FAL		AGA2R	AGC127			AG23
512C							
519	VB	HrU6	AGA2	AGC127		DPU16	AG23
519'							
523'	VB			AGC127			
523"							
523G							
523C							
528G	VB		AGA2R			DPU16	
528C							

		Primer				
537C	VB		AGA2R		DPU16	
537G						
538	VB					
538'						
538G						
540G	VB					
540C						
541'	VB	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23
541						
542C	VB			AGC127	DPU16R	
542G						
544C	VB					
544G						
545'	VB					AG23
559	VB					
564C	VB		AGA2R		DPU16	
564G						
565	VB	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23
565''						
565C						
565G						
566	VB			AGC127	DPU16	AG23
566V						
578	VB	HrU6R		AGC127	DPU16	AG23
578'						
578C						
578G						
579	VB				DPU16	
579C						
579G						
604C	VB	HrU6R	AGA2R		DPU16R	
604G						

				Primer		
621C	Bananal			AGC127		
621G						
634C	Bananal			AGC127R	DPU16	
634G						
635'	Bananal				DPU16	AG23
635C						
635G						
639	Bananal	HrU6R	AGA2R	AGC127	DPU16	AG23
639'						
643	Bananal					AG23
643V						
644NE	Bananal			AGC127	DPU16	AG23
648	Bananal					
650	Bananal	HrU6R	AGA2R	AGC127R	DPU16	
652	Bananal		AGA2R	AGC127R	DPU16	
655	Bananal			AGC127R	DPU16	
660	Bananal		AGA2R	AGC127	DPU16	
664NE	RF	HrU6R	AGA2R	AGC127	DPU16	
669	RF					
684	RF					
685	RF					
691	RF			AGC127		
695	RF		AGA2R	AGC127R		
702	RF					
704	RF		AGA2	AGC127	DPU16	AG23
705	RF			AGC127R		
712	RF					
715	RF		AGA2R	AGC127R		
716	RF		AGA2	AGC127	DPU16	AG23
717'	RF		AGA2	AGC127	DPU16	AG23
718V	RF		AGA2R	AGC127	DPU16	AG23
718G						
730	RF					
742	RF		AGA2	AGC127	DPU16	AG23
756"	RF		AGA2R	AGC127R	DPU16	
756G						

							Primer
759C	RF		AGA2R	AGC127		AG23	
759G							
760	RF						
761	RF				DPU16		
761'							
762	RF		AGA2R	AGC127	DPU16		
765	RF						
767	RF						
768	RF		AGA2	AGC127	DPU16		
793	RF						
795	RF				DPU16		
795G							
809R	RF		AGA2R	AGC127		AG23	
809G							
822	Sobradinho						
826	Sobradinho		AGA2				
828R	Sobradinho		AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
828'							
828'''							
828''''							
833	Sobradinho						
836	Sobradinho	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
836G							
841G	Sobradinho	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
843C	Sobradinho	HrU6	AGA2		DPU16		
843G							
859	Sobradinho						
860	Sobradinho	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
860'							
860''''							
860''''''							
860''''''''							

							Primer
863	Sobradinho	HrU6	AGA2	AGC127R	DPU16		
863"							
863'''							
878	Sobradinho			AGC127R			
888	Sobradinho		AGA2	AGC127	DPU16		
893	Sobradinho	HrU6	AGA2R			AG23	
893'''							
907C	Sobradinho						
907G							
908C	Sobradinho						
908"							
916	Sobradinho						
917C	Sobradinho						
917G							
1000'	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	PDU16	AG23	
1002	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1002M							
1010'	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1010M							
1010V							
1013	Silvânia	HrU6	AGA2				
1017V	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1018	Silvânia	HrU6	AGA2				
1026	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1026M							
1033	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1033'							
1034	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1034M							
1034'							
1040	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23	
1040M							

				Primer		
1085	Silvânia	HrU6		AGC127	DPU16	AG23
1085M						
1085V						
1086M	Silvânia	HrU6		AGC127	DPU16	AG23
1086V						
1102V	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	
1102G						
1121'	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23
1121V						
1121M						
1122	Silvânia			AGC127		
1123V	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	
1130'	Silvânia	HrU6	AGA2	AGC127	DPU16	AG23
1130V						
1130M						
1132V	Silvânia	HrU6	AGA2		DPU16	
1132G						
1134	Silvânia		AGA2			
1134G						
1CM	FAL					
50CM	VB			AGC127		
81CM	VB		AGA2R			
129CM	FAL		AGA2R			
325CM	FAL		AGA2R			
805CM	VB		AGA2R	AGC127R		
1010CM	VB			AGC127R		
1105CM	VB		AGA2R	AGC127R		

C = Extração com clorofane

G = Extração com guanidina

' = 2ª tentativa de extração para minisatélite

" = 3ª Tentativa de extração para minisatélite

R = ressuspensão em água Mili-Q

NE = nova extração

OD = Olho d'Água

RF = Riacho Fundo

V = reextração cujo número do tubo foi escrito em verde

M = reextração cujo número do tubo foi escrito em verde

Primer seguido da letra R = primer a ser reamplificado por ter apresentado banda fraca no gel de agarose

M = reextração cujo número foi escrito em marron

Número da amostra seguido da letra R = amostra precipitada e ressuspensa em água Mili-Q

CM = material coletado durante coletas para a dissertação de mestrado em 1994