

DNA-based identification applied to *Thamnophilidae* (Passeriformes) species: the first barcodes of Neotropical birds

Sibelle T. Vilaça¹ Daniela R. Lacerda¹, Eloisa H. R. Sari¹, and Fabrício R. Santos^{1,2}

¹ Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: fsantos@icb.ufmg.br

² Corresponding author

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 25 de janeiro de 2006

RESUMO. Identificação baseada em DNA aplicada a espécies de *Thamnophilidae* (Passeriformes): primeiros *barcodes* de pássaros Neotropicais. O Consórcio “Barcode of Life” é uma iniciativa mundial dedicada a produzir um inventário molecular da biodiversidade da Terra. A subunidade I do gene Citocromo Oxidase *c* (COI) do DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido utilizada com sucesso na identificação de espécies de aves norte-americanas. No entanto, esta técnica não foi previamente empregada na identificação de pássaros Neotropicais. Os *Thamnophilidae* habitam florestas Neotropicais e mais de 200 espécies pertencem a essa família. Desde 1990, 19 novas espécies foram reconhecidas nesta família. Nesse estudo, mostramos que é possível discriminar as 16 espécies de *Thamnophilidae* analisadas usando uma pequena seqüência do gene COI. As divergências obtidas entre espécies, mesmo as congênicas, são muito maiores do que as observadas dentro de espécies. Apesar de se acreditar que pássaros tropicais possam apresentar alta diversidade genética intra-específica, concluímos que uma pequena seqüência do gene COI tem o potencial de ser usada como “barcode”, identificando com confiança as diferentes espécies. Isto torna possível a distinção de espécies que exibem poucos caracteres morfológicos informativos, bem como a implementação de inventários rápidos, em larga escala, da pouco conhecida avifauna Neotropical.

PALAVRAS-CHAVE: *Barcode*, *Thamnophilidae*, DNA mitocondrial, pássaros Neotropicais.

ABSTRACT. The “Barcode of Life” Consortium is a worldwide initiative devoted to perform a molecular inventory of Earth’s biodiversity. The Cytochrome Oxidase *c* subunit I (COI) gene of the mitochondrial DNA (mtDNA) has been successfully used for identification of North American bird species. However, this technique has not been previously employed to Neotropical birds’ identification. Typical antbirds (*Thamnophilidae*) inhabit Neotropical forests and comprise over 200 species. Since 1990, 19 new species have been recognized in the *Thamnophilidae* family, thus making it a good candidate for taxonomic studies. In this study, we showed that it is possible to discriminate 16 *Thamnophilidae* species using a small COI gene region. Divergences obtained between species, even congeneric ones, were much higher than the observed within species. Although it is generally believed that tropical birds tend to show high intraspecific genetic diversity, we concluded that the COI barcodes have the potential to identify accurately Neotropical birds. It makes possible the discrimination of species that exhibit few informative morphological characters and the implementation of fast large-scale inventories of the barely known Neotropical avifauna.

KEY WORDS: Barcode, *Thamnophilidae*, mitochondrial DNA, Neotropical birds.

Reliable species identification is fundamental for research in the fields of systematic, zoogeography, ecology, and conservation (Isler *et al.* 1998), particularly for endemic taxa from endangered biomes. The accurate discrimination of species can only be achieved with an adequate methodology for taxonomic identification considering intra and inter-species variation. It is known that in some cases morphological analysis *per se* has not enough resolution to allow a correct identification of organisms (Hebert *et al.* 2004a). Furthermore, since classical taxonomy is frequently based on the work of specialized researchers, there are occasions when they are not easily accessible. Because of these issues, molecular markers have been used as a complementary tool for taxonomic identification (Hebert *et al.* 2003a). Molecular strategies should help and accelerate the taxonomy process, which has been so far strongly centered in morphology. Recently, molecular approaches applied to taxonomy have gained more attention with the proposal of a new initiative named the DNA Barcoding (Hebert *et al.* 2003a, Blaxter 2004).

The Consortium for the Barcode of Life (<http://barcoding.si.edu>) is a worldwide initiative devoted to develop an accurate and reliable tool for scientific research on the identification of plant and animal species. A broad scale molecular inventory of biodiversity was first suggested by Paul Hebert and

collaborators in 2003. They successfully demonstrated that a 648 bp sequence of the 5’ portion of the mitochondrial gene Cytochrome *c* Oxidase subunit I (COI) can be a reliable tool to identify animal species (Hebert *et al.* 2003b). Other initiatives have shown that COI displays a high resolution to identify species of several animal groups (Hebert *et al.* 2003a, 2004a, b), including extinct birds from New Zealand (Lambert *et al.* 2005). A previous study with 260 birds from North America revealed that most species could be properly discriminated by COI sequences (Hebert *et al.* 2004a). Another research (Hebert *et al.* 2004b) showed that the COI gene was also efficient to identify a complex of 10 species within the skipper butterfly *Astrartes fulgurator*.

Many criticisms have been raised against the barcode initiative (Mallet and Willmott 2003, Lipscomb *et al.* 2003, Seberg *et al.* 2003). However, it is noticeable that most of these criticisms are due to a misunderstanding of the main goals of this project. The barcode technique does not aim to replace the traditional taxonomy, instead it has to be used as an auxiliary tool. Since DNA sequencing is a fast, reliable and relatively cheap tool, “large-scale DNA barcoding can be used to identify and discriminate known species. Furthermore, it could be used to indicate probable new species within previously unstudied taxa”, as recently pointed by Gregory (2005). He also

pointed out that new species suggested after DNA barcode analysis “would not be named solely with a DNA barcode: they would be given Linnaean names based on the study of curated voucher specimens, high-resolution digital images, collection locality data and other information”. Several other applications for barcodes could be envisaged in forensics, animal ecology and behavior, parasitology, environment protection against exotic species etc. (Baker *et al.* 1996, Stoeckle 2003). Moreover, like any other DNA analysis, the barcode technique has the advantage of being performed using blood or small portions of animal tissue without the sacrifice of individuals. Furthermore, the barcode approach can independently assist the classic taxonomy, since it is not influenced by anatomical variations (genetic or environmental), or the individuals’ age or sex. Hence, the DNA barcode initiative is a useful complementary tool to elucidate the taxonomic status of species that have no clearly distinguishable phenotypical characters to be used as taxonomic markers.

Although there is no specific reason to choose the mtDNA COI gene as the target region for DNA barcodes, this molecule shows some interesting advantages to be used in these analyses. The animal mtDNA is a small circular molecule, maternally inherited without recombination, existing in several copies within the cells (Avise *et al.* 1987). The COI gene is ~1500 bp long and occurs in all eukaryotes. Although this gene possesses a slow rate of amino acid change if compared to other mitochondrial genes (Lynch and Jarrell 1993), it exhibits an evolutionary nucleotide rate that can be three times greater than ribosomal mtDNA genes and can be successfully used to distinguish individuals between and sometimes within species (Hebert *et al.* 2003b).

The typical antbirds (Passeriformes: Suboscines: Thamnophilidae) represent a group of approximately 200 species, being one of the most numerically important families in the Neotropics (Isler *et al.* 1998, Irestedt *et al.* 2004). These birds are arboreal or undergrowth inhabitants of Neotropical forests, such as the Amazon and the Brazilian Atlantic Forest. They are known as sedentary birds, well adapted to the flight on densely vegetated areas, rarely crossing long distances through open areas (Zimmer and Isler 2003). Genetic studies suggested that their sedentary characteristics would explain the high levels of divergence observed between populations within species (Hackett 1993, Bates *et al.* 1999). These results reinforce the general view that Neotropical birds would exhibit higher levels of genetic structure if compared to temperate ones (Hackett and Rosenberg 1990, Bates 2000, Winker *et al.* 2000). Although the monophyly of Thamnophilidae is a consensus interpretation (Irestedt *et al.* 2004), many relationships between genera and species remain unclear (Zimmer and Isler 2003). To resolve these phylogenetic issues, many different markers, such as morphological, molecular and behavioral, including vocalizations or nest architecture, have been employed (Isler *et al.* 1997, 1998, Zimmer and Isler 2003). Furthermore, it is believed that some species recognized as distinct ones could be variations of a single species, while others would have to

be divided in several ones after a more careful study (Zimmer and Isler, 2003). Since 1990, 19 new Thamnophilidae species have been recognized: ten of them resulted from taxonomic reviews and nine were recently recognized species (Zimmer and Isler, 2003). As depicted by the recent taxonomic changes, as well as the possibility of many undescribed taxa in Thamnophilidae, this group seems to be a good candidate for taxonomic studies in all levels, including taxonomy based on DNA sequence analysis.

In this study, we sequenced a fragment of the mtDNA COI gene of 46 individuals from 16 Thamnophilidae species that occur in the Brazilian Atlantic Forest. Our aim was to show that the COI gene can be an efficient marker for a DNA-based identification system focusing on a Neotropical bird family. In this study we do not intend to clarify relationships above the species level, which would require larger DNA sequences, a more complete sampling and other phylogenetic analyses. We aim to show that the barcode technique can be a useful tool to discriminate species within Thamnophilidae, including some recently suggested species by classic taxonomy. This is the first study using the DNA barcode methodology to identify species from an endemic Neotropical bird family.

MATERIAL AND METHODS

Forty six birds from 16 Thamnophilidae species (see Table 1) were sampled in different areas of the Brazilian Atlantic Forest in the Minas Gerais State, Southeastern Brazil. Two to four individuals of each species were selected for this study. Several individuals were also included in a previous study (Lacerda 2004) that generated Cytochrome b and control region sequences ($n = 160$), what allowed us to select the most divergent individuals ($n = 23$) within each species for the present research. For those species whose previous genetic information were not available, individuals ($n = 23$) from more distant sampling areas were selected.

Blood samples were obtained by venipuncture of captured birds, that were released after tissue collection. Total DNA was extracted using phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol (Sambrook *et al.* 1989) after digestion with proteinase K. DNA concentration was estimated through visual evaluation of the band resulting from electrophoresis of 5 μ L of DNA solution in 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. The COI mitochondrial gene was entirely amplified using the specific primers L6615 and H8121, designed by M. D. Sorenson (<http://people.bu.edu/msoren/Bird.mt.Primers.pdf>). PCR reaction mixes of 12.5 μ L included 2 μ L of genomic DNA (~40 ng), 1 U of *Taq* polymerase (Phonetría®), 200 μ M of dNTPs, 1X Tris-KCl buffer with 1.5 mM MgCl₂ (Phonetría®) and 0.5 μ M of each primer. The amplification program consisted of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 40 s at 94°C, 40 s at 58°C, 2 min at 72°C and a final extension step of 10 min at 72°C. After amplification, PCR products were run in 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. Negative controls, where template DNA was omitted, were used in all am-

Table 1. Mean sequence divergence (K2P) within (bold number on diagonal) and among (below diagonal) the 16 Thamnophilidae species.

	Drf	Dro	Drs	Dsm	Dsp	Fos	Hea	Myl	Pyl	Rha	Sac	Tam	Tha	The	Thd	Thp
Drf	0,0016															
Dro	0,0739	0,0032														
Drs	0,1177	0,0966	0,0000													
Dsm	0,1331	0,1094	0,1454	0,0073												
Dsp	0,1001	0,1151	0,1483	0,1114	0,0016											
Fos	0,1270	0,1110	0,1279	0,1216	0,0989	0,0032										
Hea	0,1219	0,1129	0,1394	0,1210	0,1217	0,1346	0,0097									
Myl	0,1141	0,1101	0,1279	0,1266	0,1164	0,1211	0,1316	0,0032								
Pyl	0,1144	0,1167	0,1286	0,1396	0,1181	0,1319	0,1333	0,1239	0,0040							
Rha	0,0855	0,0792	0,1228	0,1342	0,1098	0,1067	0,1219	0,1141	0,1069	0,0016						
Sac	0,1307	0,1168	0,1238	0,1196	0,1378	0,1368	0,1027	0,1155	0,1268	0,1234	0,0012					
Tam	0,1108	0,1014	0,1340	0,1332	0,1329	0,1063	0,1306	0,1128	0,1187	0,1112	0,1230	0,0048				
Tha	0,1349	0,1272	0,1393	0,1355	0,1477	0,1350	0,1369	0,1345	0,1368	0,1344	0,0912	0,1279	0,0000			
The	0,1517	0,1447	0,1557	0,1256	0,1234	0,1162	0,1300	0,1393	0,1422	0,1337	0,1121	0,1393	0,0730	0,0110		
Thd	0,1420	0,1290	0,1321	0,1468	0,1382	0,1515	0,1202	0,1384	0,1296	0,1272	0,1132	0,1446	0,0865	0,1001	0,0024	
Thp	0,1369	0,1332	0,1302	0,1355	0,1383	0,1380	0,1308	0,1254	0,1368	0,1467	0,1084	0,1279	0,0479	0,0758	0,0922	0,0000

Drf = *Drymophila ferruginea*; Dro = *Drymophila ochropyga*; Drs = *Drymophila squamata*; Dsm = *Drymophila mentalis*; Dsp = *Drythamnus plumbeus*; Fos = *Formicivora serrana*; Hea = *Hepsilochmus atricapillus*; Myl = *Myrmeciza loricata*; Pyl = *Pyrrhoptera leucoptera*; Rha = *Rhopornis ardesiaca*; Sac = *Sakesphorus cristatus*; Tam = *Taraba major*; Tha = *Thamnophilus ambiguus*; The = *Thamnophilus caerulescens*; Thd = *Thamnophilus doliatius*; Thp = *Thamnophilus pelzelni*.

plification runs. Only products with a single and well-defined 1500 bp band were used in the sequencing reactions. Before sequencing, PCR products were cleaned by precipitation using 20% polyethyleneglicol + 2.5 M NaCl. Sequencing reactions were performed using only the primer L6615, and were conducted in a final volume of 10 µL containing: 2-4 µL of purified PCR product, 1-3 µL of ultrapure water, 1 µL of primer (5 µM) and 4 µL of sequencing kit (ET DYE Terminator Kit, Amersham Biosciences). The sequencing program consisted of 35 cycles of 95°C for 25 s, 55°C for 15 s, 60°C for 3 min. Then, sequencing products were precipitated with ammonium acetate and ethanol, dried at room temperature, dissolved with formamide-EDTA and run in the automatic sequencer MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

To avoid the amplification of nuclear sequences of mitochondrial origin, i.e. *numts* (Sorenson and Quinn 1998), the following measures were undertaken: *i*) amplification of sequences longer than 1000 bp; *ii*) amplification primers had degenerate sites and/or had annealing sites in tRNA genes; *iii*) for each individual, at least two different PCR products were used in the sequencing reactions until, at least, two high quality and independent sequences could be obtained; *iv*) for each species, at least two individuals were used in the analysis; *v*) chromatograms were carefully checked for ambiguities; *vi*) COI sequences produced in the present study were aligned and compared with others obtained from the GenBank, including a sequence of *Gallus gallus* (Desjardins and Morais 1990), to check for the presence of any start, stop or nonsense codons, as well as alignment gaps.

Consensus sequences (available upon request) were obtained and checked through the programs Phred v. 0.20425 (Ewing *et al.* 1998), Phrap v. 0.990319 (<http://www.phrap.org/>) and Consed 12.0 (Gordon *et al.* 1998). Alignments were done using Clustal X (Thompson *et al.* 1997), with manual edition whenever it was necessary. Sequence divergence among different haplotypes was estimated through the program MEGA 3.0 (Kumar *et al.* 2004) using Kimura 2-parameter (K2p) distance model (Nei and Kumar 2000). MEGA 3.0 was also used to construct a Neighbor Joining (NJ) tree based on the K2p model with 10,000 bootstrap replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

A 418 bp COI fragment was analyzed in this study. The sequences obtained were aligned and compared with other avian GenBank COI sequences from passerine species and *Gallus gallus* (Desjardins and Morais 1990). These comparisons revealed neither stop or nonsense codons, nor alignment gaps. Furthermore, while analyzing the chromatograms, no high quality ambiguities that could suggest the presence of *numts* were identified. Different haplotypes were found for some species, and the maximum divergence between them was 1.1% (Table 1). Nucleotide divergence between species ranged from 4.8% to 15.6% (Table 1), with an average of 12.3%. Herbert *et al.* (2004a) found a similar value of 12.7% for mean sequence divergence within families of North American birds. Besides, levels of sequence divergence observed among the 16 analyzed species of typical antbirds were similar to those previously observed for eight of these species (5.1-14.6%, Lacerda 2004) and also for species within Cotingidae family (4.3-25.7%, Prum *et al.* 2000) using cytochrome *b* sequences.

Intraspecific sequence divergence could be estimated for three of the 10 analyzed genera (*Thamnophilus*, *Dysithamnus* and *Drymophila*) and ranged from 7.9 to 11.1%, with a mean of 9.6%. This mean value is much higher (27-fold higher) than the mean divergence observed within species (0.34%) and also the maximum within-species difference obtained in this study (1.1%). Thus, a high sequence similarity within species was observed in spite of using in this study a selected group of samples with the most divergent mtDNA (see Material and Methods).

The NJ tree (Figure 1) showed that all intraspecific haplotypes grouped together forming cohesive and strongly supported groups (99% of bootstrap support). Although this study has used only 418 bp of the COI gene, what makes difficult to infer relationships above species level, there is some phylogenetic signal. It is possible to note that the genus *Thamnophilus* formed a monophyletic and well supported group (90% of bootstrap support). Furthermore, there is a strongly supported clade (91% of bootstrap support) formed by the two closely related *T. pelzelni* and *T. ambiguus*. Indeed, until very recently those two species were part of *Thamnophilus punctatus* complex, which was divided in six different species based on morphology, geographical distribution and vocalizations (Isler *et al.* 1997). Besides, *T. pelzelni* and *T. ambiguus* appear in figure 2 as a single point detached from the others, a finding that can be easily explained by the low sequence divergence observed between them (4.8%). This value, although is the lowest one observed among the 16 species, is high enough to be considered another evidence for the species status of *T. ambiguus* and *T. pelzelni*. Other evidences include the lack of clinal intermediacy in their contact zone and some distinguishable features in their plumage patterns, in spite of the fact that the two species are very similar in morphology and exhibit overlapping but identifiable loudsongs (Naumburg 1937, Isler *et al.* 1997). Furthermore, other studies have shown good, well-defined

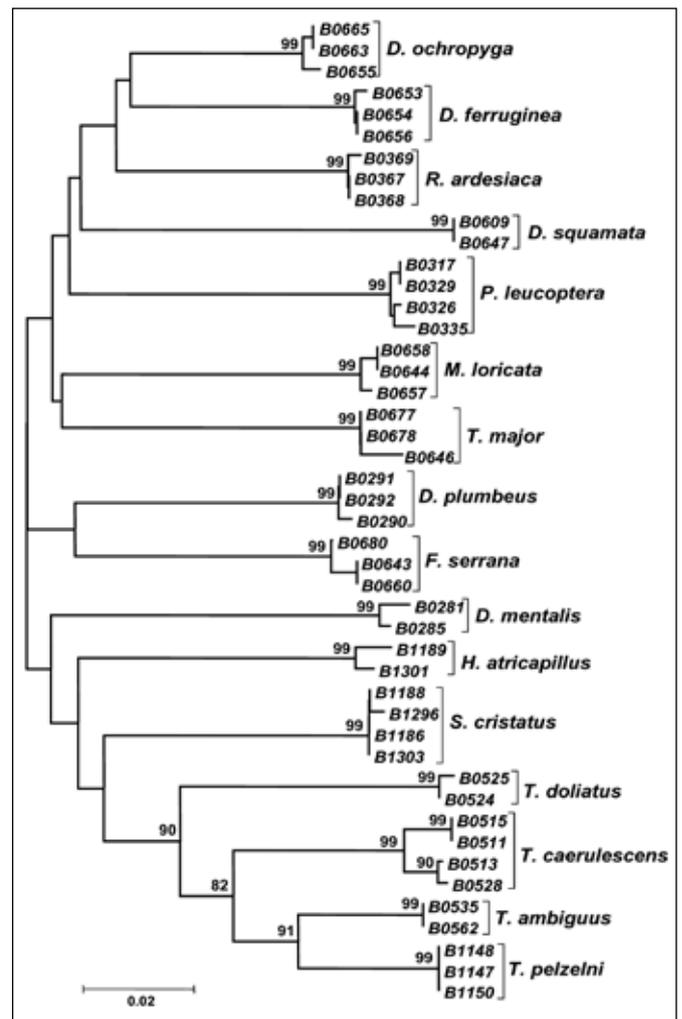


Figure 1. Unrooted NJ tree of 46 COI sequences for 16 Thamnophilidae species. Bootstrap support values are indicated on the branches, but values below 50 or within species were omitted.

Neotropical avian species exhibiting relatively low levels of mtDNA sequence divergence, *e.g.* García-Moreno and Silva (1997) for two *Lepidocolaptes* species, and Ribas and Miyaki (2004) for two *Aratinga* species.

The only intraspecific divergence higher than 1% was found for the variable antshrike (*Thamnophilus caerulescens*, 1.1%, Table 1 and Figure 2). Lacerda (2004) showed that two very divergent lineages are present within this species in the Minas Gerais State of Brazil. For this study, we selected two representatives of each lineage that probably belong to different subspecies. If we apply the threshold suggested by Herbert *et al.* (2004a) of 10X the mean intraspecific divergence for the group under study, we conclude that for the Thamnophilidae species analyzed here, any divergence below 3.4% characterize a single well-defined species. Hence, even though there is a considerable amount of divergence among *T. caerulescens* sequences, the present study made possible a consistent identification not only of the variable antshrike individuals but also of every other individuals from the 15 antbird species. Moreover, this identification method was also supported by

the presence of at least one synapomorphic character for each species (Table 2). Nevertheless, these synapomorphies should be seen with caution since they were based on few individuals from few species of the *Thamnophilidae* family. Some of these characters may not appear as synapomorphies in a broader sampling of individuals, species or geographical range.

The finding that each species has a characteristic COI sequence offers the prospect to identify typical antbirds using the DNA barcode technique as an auxiliary tool for taxonomy. Many *Thamnophilidae* species can be misidentified by non-specialists that very frequently are involved in fieldwork, when blood samples can be readily collected without collecting the individual. The perspective of using a DNA marker that can ensure the correct sample identification within a DNA bank collection is very exciting. This proposal has already been applied in our case. During the preparation of this study, one individual tagged as *Herpsilochmus atricapillus* exhibited a very unusual COI sequence if compared to the other two *H. atricapillus* analyzed (B1189 and B1301, Figure 1). When the three sequences were searched against the GenBank database, the best hits for the unusual one were COI sequences of phylogenetically distant birds, not even passerines. Based on that, only the other two individuals were used in this work and considered as *H. atricapillus*. Future studies need to be done in order to correctly identify the other individual that probably had its identification tag switched. This is just one example of the many utilities of the DNA barcode. Hopefully, more and more COI sequences of Neotropical bird species will be pro-

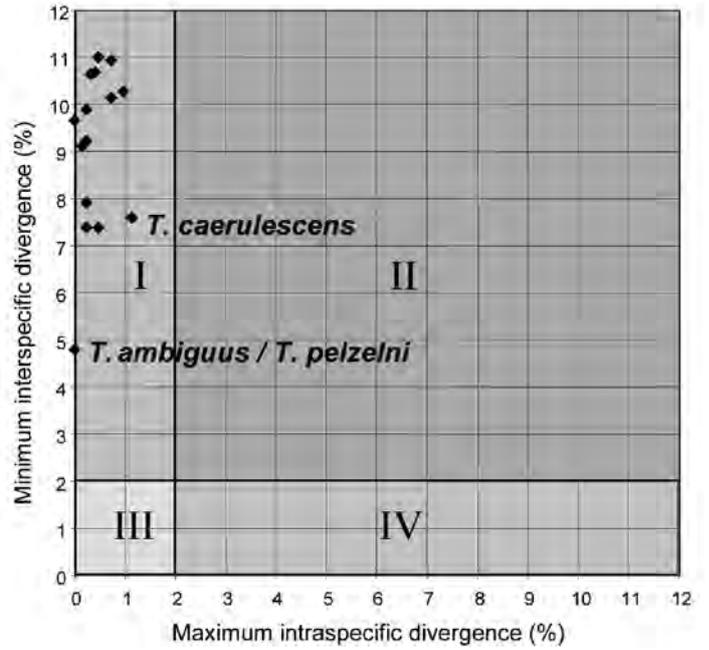


Figure 2. Maximum intraspecific sequence divergence (X axis) compared to minimum interspecific divergence (Y axis) using K2P distance for the 16 *Thamnophilidae* species. Following Hebert *et al.* (2004a), the cutoff of 2% of sequence divergence was used to divide the table in four quadrants, and each one represents a different category of species: I – Intraspecific distance < 2%, interspecific distance > 2%: species concordant with actual taxonomy; II – intraspecific and interspecific distance > 2%: species that require a taxonomic review; III – intraspecific and interspecific distance < 2%: recent divergence, hybridization or synonymy; IV – intraspecific distance > 2%, interspecific distance < 2%, probable misidentification of specimen.

Table 2. Synapomorphic characters (highlighted in black) for all individuals within each of the 16 analyzed *Thamnophilidae* species. Synapomorphic site numbers are indicated above COI variable characters.

Species	COI variable characters
	0000001111112222222222223333334444
	001123500344801345566779001569011
	581495647106502451769253681928436
<i>Thamnophilus caerulescens</i> (n=4)	CACAAAACAACAAACCCAA C AAA G CCCATAAAA
<i>Thamnophilus ambiguus</i> (n=2) G .T...A.....
<i>Thamnophilus pelzelni</i> (n=2) GT...A... C
<i>Thamnophilus doliatus</i> (n=2) G G T...A. T . C
<i>Herpsilochmus atricapillus</i> (n=2)	.. T T T ...A. C .A.A.. C
<i>Sakesphorus cristatus</i> (n=4)	T A G ...A T A.....
<i>Dsythamnus mentalis</i> (n=2) G GA...A.A..... G
<i>Dsythamnus plumbeus</i> (n=3)	.. G G ..T...A.. G A.A.....
<i>Drymophila ochropyga</i> (n=3) AA...A.A.....
<i>Drymophila ferruginea</i> (n=3)T.. C .A...A.A A
<i>Drymophila squamata</i> (n=2) G G ...A.A T
<i>Myrmeciza loricata</i> (n=3) CA...A.A.....
<i>Rhopornis ardesiaca</i> (n=3)T...A...T.A T .. T
<i>Pyriglena leucoptera</i> (n=4) GA...T.A... G
<i>Formicivora serrana</i> (n=3) T G T...A...A.A T
<i>Taraba major</i> (n=3)	.. G T .. T ...A...A.A.....

duced and made available in open access databases. Although the 16 species analyzed here are not well representative of the huge diversity of *Thamnophilidae* family, and we used only 418 bp of the COI gene, this study demonstrated that species identification through DNA sequences is readily applicable to typical antbirds and probably to other Neotropical bird families as previously showed for North American birds.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Miguel Ângelo Marini, Marcos Rodrigues, and their respective students for helping with tissue sample collection and Rodrigo Redondo for technical help and comments on the manuscript. We also thank the reviewers for helpful suggestions. This work received grants from CNPq and FAPEMIG from Brazil, S.T.V., D.R.L. and F.R.S. were supported by CNPq, and E.H.R.S. by CAPES. All samples were collected with the Brazilian government permits of CMA/IBAMA (numbers 011/2000, 053/2001, 070/2002, 207/2003) and deposited in our DNA collection recognized by CGEN/MMA. This work was also performed according to the special authorization for access to genetic resources in Brazil # 03/2004, issued by IBAMA/MMA.

REFERENCES

- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb and N. C. Saunders (1987) Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Baker, C. S., F. Cipriano and S. R. Palumbi. (1996) Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Mol. Ecol.* 5:671-685.
- Bates, J. M. (2000) Allozyme genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *Condor* 102:770-783.
- _____, S. J. Hackett and J. Goerck (1999) High levels of mitochondrial differentiation in two lineages of antbirds (*Drymophila* and *Hypocnemis*). *Auk* 116:1093-1106.
- Blaxter, M. L. (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359:669-679.
- Desjardins, P. and R. Morais (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.* 212:599-634.
- Ewing B., L. Hillier, M. Wendi and P. Green (1998) Basecalling of automated sequencer traces using Phred I: accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175-185.
- García-Moreno, J. and J. M. Silva (1997) An interplay between forest and non-forest South American avifaunas suggested by a phylogeny of *Lepidocolaptes* woodcreepers (Dendrocolaptinae). *Stud. Neotrop. Environ.* 32:164-173.
- Gordon D., C. Abajian and P. Green (1998) Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8:195-202.
- Gregory, T.R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434: 1067.
- Hackett, S. J. (1993) Phylogenetic and biogeographic relationships in the Neotropical genus *Gymnopithys* (Formicariidae). *Wilson Bull.* 105:301-315.
- _____, and K. V. Rosenberg (1990) Evolution of Amazonian antwrens: Comparison of genetic and phenotypic differentiation. *Auk* 107:473-489.
- Hebert P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 270:313-321.
- _____, S. Ratnasingham and J. R. deWaard (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences amongst closely related species. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. (Suppl.)* 270:S96-S99.
- _____, M. Y. Stoeckle, T. S. Zemplak and C. Francis (2004a) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 10:1657-1663.
- _____, E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen. and W. Hallwachs (2004b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:14812-14817.
- Irestedt, M., J. Fjeldsa, J. A. A. Nylander and P. G. P. Ericson (2004) Phylogenetic relationships of typical antbirds (*Thamnophilidae*) and test of congruence based on Bayes factors *BMC Evol. Biol.* 4:23 doi:10.1186/1471-2148-4-23.
- Isler, M. L., P. R. Isler and B. M. Whitney (1997) Biogeography and systematics of the *Thamnophilus punctatus* (*Thamnophilidae*) complex. *Ornithol. Monogr.* 48:355-381.
- _____, _____, _____ (1998) Use of vocalizations to establish species limits in antbirds (Passeriformes: *Thamnophilidae*). *Auk* 115:577-590.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5:150-163.
- Lacerda, D. R. (2004) *Filogeografia comparada e filogenia de espécies de Thamnophilidae (Aves: Passeriformes) de Mata Atlântica de Minas Gerais*. PhD thesis. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

- Lambert, D. M., A. Baker, L. Huynen, O. Haddrath, P. D. N. Hebert and C. D. Millar (2005) Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? *J. Hered.* 96:279-284.
- Lipscomb, D., N. Platnick and Q. Wheeler (2003) The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *TREE* 18:65-66.
- Lynch, M. and P. E. Jarrell (1993) A Method for Calibrating Molecular Clocks and Its Application to Animal Mitochondrial DNA. *Genetics* 135:1197-1208.
- Mallet, J. and K. Willmott (2003) Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *TREE* 18:57-59.
- Naumburg, E. M. B. (1937) Studies of birds from eastern Brazil and Paraguay, based on a collection by Emil Kaempfer. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 74:139-205.
- Nei, M. and S. Kumar (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Prum, R. O., N. H. Rice, J. A. Mobley and W. W. Dimmick (2000) A preliminary phylogenetic hypothesis for the cotingas (Cotingidae) based on mitochondrial DNA. *Auk* 117:236-241.
- Ribas, C. C. and C. Y. Miyaki (2004) Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: species limits and historical biogeography in the 'solstitialis' group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30:663-675.
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: CSHL Press.
- Seberg, O., C. J. Humphries, S. Knapp, D. W. Stevenson, G. Petersen, N. Scharffm and N. M. Andersen (2003) Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *TREE* 18:63-65.
- Sorenson, M. D. and T. W. Quinn (1998) Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *Auk* 115:214-221.
- Stoeckle, M. (2003) Taxonomy, DNA and the Bar Code of Life. *BioScience* 53:796.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Winker, K., G. R. Graves and M. M. Braun (2000) Genetic differentiation among populations of a migratory songbird: *Limnothlypis swainsonii*. *J. Avian Biol.* 31:319-328.
- Zimmer, K. J. and M. L. Isler (2003) Family Thamnophilidae, p. 448-681. Em: J. Del Hoyo, A. Elliot, and D. A. Christie (eds.) *Handbook of the birds of the world: broadbills to tapaculos v.8*. Barcelona: Lynx Edicions.

Genetic variability in the Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*, Psittaciformes) assessed by DNA fingerprinting

Renato Caparroz¹, Paulo Martuscelli², Pedro Scherer-Neto³, Cristina Yumi Miyaki⁴, and Anita Wajntal⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Ciências Genômicas, Universidade Católica de Brasília, Campus II, SGAN 916 Norte, Av. W5, 70790-160, Brasília, DF, Brazil. E-mail: renatocz@yahoo.com.br

²Rua Gravatá, 387, Quinta da Boa Vista, 07600-000, Mairiporã, SP, Brazil. E-mail: insularis@uol.com.br

³Museu de História Natural Capão da Imbuía, Rua Professor Benedito Conceição, 407, Capão da Imbuía, 82810-080, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: schernereto@bbs2.sul.com.br

⁴Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, Cidade Universitária, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: cymiyaki@ib.usp.br, aniwa@usp.br

Recebido em 21 de janeiro de 2005; aceito em 06 de março de 2006

RESUMO. Variabilidade genética do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*, Psittaciformes) avaliada pela técnica de DNA fingerprinting. O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é uma espécie de psitacédeo ameaçada de extinção e endêmica de uma estreita faixa litorânea da Floresta Atlântica do sudeste do Brasil. No presente trabalho, utilizamos a técnica de DNA fingerprinting para estimar a variabilidade genética dentro e entre dois grupos de papagaios de localidades diferentes: 15 aves de Ilha Comprida (sudeste do Estado de São Paulo) e seis de Guaraqueçaba (nordeste do Paraná). Os resultados obtidos revelaram que as aves de Ilha Comprida e Guaraqueçaba apresentam níveis de variabilidade genética estatisticamente similares, sugerindo que as aves destes dois grupos podem constituir uma única população. Os índices de similaridade observados entre todas as aves ($x = 0,223 \pm 0,091$ e $0,335 \pm 0,088$ com as sondas 33.6 e 33.15, respectivamente) indicam que esta espécie apresenta níveis moderados de variabilidade genética e baixo endocruzamento. Do ponto de vista da conservação, os resultados obtidos indicam que esta espécie está mais ameaçada pela perda de habitat e pelo tráfico ilegal do que pelo endocruzamento. Portanto, as estratégias de conservação devem ser direcionadas para minimizar os efeitos das atuais ameaças a esta espécie, preservando assim a variabilidade genética existente.

PALAVRAS-CHAVE: *Amazona brasiliensis*, DNA fingerprinting, variabilidade genética, conservação, Psittacidae

ABSTRACT. The Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*) is a threatened parrot endemic to the Atlantic Forest in the narrow coastal plain of southeastern Brazil. In the present study, we used multilocus DNA fingerprinting to assess the genetic variability both within and between two red-tailed amazon groups from different localities: 15 birds from Ilha Comprida (southeastern São Paulo State) and six birds from Guaraqueçaba (northeastern Paraná). The results revealed that birds from Ilha Comprida and Guaraqueçaba have statistically similar levels of genetic variability, suggesting that birds of these two groups should be represent only one population. The similarity index observed among all birds ($x = 0.223 \pm 0.091$ and 0.335 ± 0.088 for 33.6 and 33.15 probes, respectively) indicate that species has moderate levels of genetic variability and low levels of inbreeding. For conservation purposes, the results presented here indicate that this species is more threatened by habitat destruction and poaching to illegal traffic than by inbreeding. Thus, efforts should be directed to lessen these current threats, preserving its present genetic variability

KEY WORDS: *Amazona brasiliensis*, DNA fingerprinting, genetic variability, conservation, Psittacidae

The Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*) is a parrot endemic to the Atlantic Forest in southeastern Brazil. It occurs from southeastern São Paulo State to northeastern Santa Catarina (Scherer-Neto 1989, Martuscelli 1995) in a narrow area localized between the Serra do Mar and the Atlantic coast which totals 4,760 km² (Figure 1, Stattersfield and Capper 2000). This species occurs in forests from lowland up to 700 m elevation, using habitats below 200 m for feeding and breeding (Scherer-Neto 1989, Martuscelli 1995). Breeding areas are mostly located on small estuarine islands rarely on the mainland (Stattersfield and Capper 2000). A complex mosaic of vegetation characterizes its habitat: mangrove, flooded, seasonally flooded, sand-plain, and transitional forests (Martuscelli 1995).

This species is considered vulnerable by the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources

(IUCN, Baillie *et al.* 2004) and is included in the official list of threatened species in Brazil (IBAMA 2004, <http://www.mma.gov.br/port/sbffauna/index.cfm>). Habitat loss (more intense in São Paulo state) and trapping are the most important threats to this species (Scherer-Neto 1989, Martuscelli 1995). Its population was estimated as 3,500 to 4,500 birds in the 1980s and it declined to fewer than 2,000 individuals by 1991-1992 (Martuscelli and Scherer-Neto 1993). Recent estimates suggest that there are approximately 5,600 individuals, 3,600 in Paraná (P. S. N., pers. comm.) and 2,000 in São Paulo state (F. Schunck, pers. comm.), and that its population size is either stable or has suffered a small decline in the last years.

The extinction of small-sized populations becomes a matter of chance even if the causes of the original decline are prevented. There are five main factors of threat in small populations subject to stochastic variation: demographic fluctuation,

environmental variation, catastrophic events, genetic drift, and inbreeding depression (Mace and Lande 1991). There is a positive feed back among these factors leading small populations into an “extinction vortex” (the smaller the population gets, the more inbred it becomes, leading to further decline in numbers, and accelerating the extinction process) (Gilpin and Soulé 1986). Low genetic diversity may both affect individual fitness (Ralls and Ballou 1983, Templeton and Read 1983) and the evolutionary adaptation potential of populations (Frankel and Soulé 1981). Thus, information about the levels of genetic variability and inbreeding should be considered in the conservation of endangered species (Soulé 1980, Templeton *et al.* 1990, Hedrick and Miller 1992).

Despite a number of ecological and demographic studies (Scherer-Neto 1989, Martuscelli and Scherer-Neto 1993, Martuscelli 1995, Martuscelli 1997, Padua *et al.* 2001, Carrillo *et al.* 2002), there is no analysis of genetic diversity in red-tailed amazon populations.

The DNA fingerprinting technique has proven successful in measuring genetic diversity because it can provide a large amount of data per unit effort as it assays the variation across many loci simultaneously (Call *et al.* 1998). In addition, this technique can be easily applied for several species and is considered useful for biologists who seek to set management strategies for small wild populations (Rave 1995).

In the present study, we have assessed the levels of genetic variability both within and between *A. brasiliensis* from Ilha Comprida (southeastern São Paulo State) and Guaraqueçaba (northeastern Paraná) by using multilocus DNA fingerprinting to provide data on the genetic variability status of the extant population.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples (0.1 ml) were collected from the brachial vein of 21 individuals captured in the wild (but currently kept in captivity) in two localities that are around 100 km apart (Figure 1): 15 birds from Ilha Comprida (southeastern São Paulo State) and six from Guaraqueçaba (northeastern Paraná). The origin of the birds was confirmed by the personnel responsible for the captive breeding centers. The blood samples were stored at -20°C in 100% ethanol. Total DNA was



Figure 1. Distribution area of *Amazona brasiliensis* in southeastern Brazil (Stattersfield and Capper 2000). Localities where individuals were sampled are shown (Ilha Comprida and Guaraqueçaba).

isolated using proteinase K and phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Bruford *et al.* 1992).

The DNA fingerprinting methodology used is described in detail by Bruford *et al.* (1992). Approximately six micrograms of genomic DNA from each bird were digested overnight with the restriction enzyme *Mbo* I at 37°C. Two agarose gels were made using different individuals from each locality. DNA fragments were transferred onto nylon membranes by Southern blotting (Sambrook *et al.* 1989). Each membrane was hybridized with either of the human multilocus minisatellite probes 33.6 and 33.15 (Jeffreys *et al.* 1985). The membranes were washed in 0.25 M Na₂HPO₄, 1% SDS, 2x SSC, 0.1% SDS, and 1x SSC, 0.1% SDS at 65°C. The filters were then

Table 1. Estimates of the genetic similarity obtained using the 33.6 and 33.15 human multilocus minisatellite probes in *Amazona brasiliensis* from two localities.

Locality	Probe	<i>N</i>	<i>n</i> ±sd	<i>x</i> ±sd	<i>x</i> ⁿ
Ilha Comprida, SP	33.15	8	23.75±3.92	0.334±0.107	4.9 x 10 ⁻¹²
	33.6	10	25.90±2.81	0.226±0.102	1.9 x 10 ⁻¹⁷
Guaraqueçaba, PR	33.15	5	26.60±2.07	0.383±0.091	8.2 x 10 ⁻¹²
	33.6	5	24.40±4.34	0.208±0.051	2.3 x 10 ⁻¹⁷

N = number of individuals analyzed; *n*±sd = mean number of bands scored ± standard deviation; *x* = mean band sharing coefficient, *x*ⁿ = probability of unrelated individuals sharing the same DNA band profile by chance.

autoradiographed at -70°C using Kodak RX film with two intensifying screens.

Only the bands between 4.0 and 23.0 kb were analyzed as described by Westneat (1990). The band sharing coefficient between the individuals (index of similarity, x) was estimated using the formula: $x = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$; where N_{AB} is the number of bands shared between the individuals A and B, and N_A and N_B are the number of bands present in individuals A and B, respectively (Wetton *et al.* 1987, Bruford *et al.* 1992). The significance of the difference in band sharing coefficients was examined by the Mann-Whitney U-Test. Assuming that each band scored is an independent marker, the mean probability that all bands in an individual's profile are present in another unrelated individual chosen at random was estimated as x^n , where x corresponds to the mean band sharing coefficient and n the mean number of bands scored (Jeffreys *et al.* 1985, Bruford *et al.* 1992).

RESULTS

The mean number of bands detected, the mean band-sharing coefficients (x), and other data estimated with the

minisatellite probes are shown in table 1. The values of x obtained with the probe 33.6 were lower than the ones obtained with the probe 33.15. For both probes, the mean band-sharing coefficients estimated among the individuals from Ilha Comprida and Guaraqueçaba were not statistically different ($\alpha < 0.05$, Mann-Whitney test). The mean band-sharing coefficients found between individuals from these two localities, 0.224 ± 0.087 for probe 33.6 and 0.325 ± 0.067 for probe 33.15, are very similar to those observed within each locality (Table 1). In addition, none of the DNA bands was exclusive to any of the two groups studied.

DISCUSSION

The analysis of the results suggests that the two amazon groups studied do not present significant genetic differences and could be considered as a single population. The mean band-sharing coefficients between all individuals were 0.223 ± 0.091 and 0.335 ± 0.088 for probes 33.6 and 33.15, respectively. These values are intermediate between those observed in non-endangered and in endangered bird species (Table 2). In general, the estimates of mean genetic similarity

Table 2. Mean band sharing coefficients (x) obtained using multilocus minisatellite probes in some bird species.

Species	IUCN	Probe	x	Reference
<i>Branta sandvicensis</i>	VU	M13/33.6/33.15*	0.63 to 0.77	Rave 1995
<i>Cyanopsitta spixii</i>	EW	33.6	0.64	Caparroz <i>et al.</i> 2001b
		33.15	0.62	
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	VU	33.6	0.45	C. Y. Miyaki and N. M. R. Guedes, unpublished
		33.15	0.46	
<i>Coturnix coturnix japonica</i> [#]	--	33.6	0.46	Burke and Bruford 1987
<i>Amazona brasiliensis</i>	VU	33.6	0.34	Present study
		33.15	0.22	
<i>Propyrrhura maracana</i>	NT	33.6	0.26	Craveiro and Miyaki 2000
		33.15	0.24	
<i>Ara chloroptera</i>	--	33.6	0.27	Caparroz <i>et al.</i> 2001a
		33.15	0.20	
<i>Passer domesticus</i>	--	33.6	0.28	Burke and Bruford 1987
		33.15	0.17	
<i>Ficedula hypoleuca</i>	LC	33.6	0.13	Burke and Bruford 1987
		33.15	0.27	
<i>Branta leucopsis</i>	LC	33.15	0.36	Tegelström and Sjöberg 1995
<i>Branta canadensis maxima</i>	LC	33.15	0.17	Tegelström and Sjöberg 1995

*Mean similarity coefficients obtained by combining the data for all probes; VU – Vulnerable; EW – Extinct in the wild; EN – Endangered; -- – Not threatened; NT – Near threatened; LC – Least concern; [#]Inbred laboratory population.

obtained by the same probes in non-endangered bird species are usually below 0.27 (Burke and Bruford 1987, Hanotte *et al.* 1992, Fleischer *et al.* 1994, Tegelström and Sjöberg 1995, Rave 1995, Caparroz *et al.* 2001a). However, the technique used in the present study has some shortcomings such as the impossibility of identification of specific alleles and also fragments of the same mobility may not represent necessarily the same allele (Hills 1987). Thus, our estimates, as well as data from other populations studied by the same technique, may represent an overestimate of the fraction of alleles shared between the individuals and the actual genetic variability might be higher than our data suggests.

In populations that present low effective size for a long time interval, which is usually the case of endangered species, the mean band-sharing coefficient is expected to increase with the increase of inbreeding (Lynch 1991). This correlation was inferred for the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*, Faulkes *et al.* 1990; Reeve *et al.* 1990), in a small, endangered island population of gray wolves (*Canis lupus*, Wayne *et al.* 1991), and in populations of blue ducks (*Hymenolaimus malacorrhynchos*) confined to single-river catchment areas (Triggs *et al.* 1992). In all these studies, the mean band-sharing coefficients were higher than 0.4. In an extreme case, some individuals of the California Channel Islands fox (*Urocyon littoralis*) found within the same islands present up to 100% of similarity at minisatellite loci, and show fixed band differences between the island populations (Gilbert *et al.* 1990).

Even though the number of samples available at this time is small, our results, together with those of other researchers who have been studying this species, are compatible with the following scenario for *A. brasiliensis*: (1) the current population size is a matter of preoccupation as small sized populations are sensitive to stochastic factors; (2) the immediate main threats on this species are habitat loss and poaching; (3) the genetic variability seems to be moderate and there are no evidences of increased levels of inbreeding; and (4) the birds sampled in two different localities, 100 km apart, probably constitute a single population.

Concluding, for conservation purposes, it seems that in short-term the *Amazona brasiliensis* population is more vulnerable to habitat loss (more intense in São Paulo state) and poaching than to inbreeding. Thus, efforts should be directed to lessen these current threats, preserving its present genetic variability.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. L. Cavalheiro and M. Wasilewski for providing some of the samples; R. Craveiro for suggestions; Paulo A. Otto for helping in statistic analyses; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support; and

three anonymous reviewers and the Editor M. Pizo for their comments. The Jeffreys' probes 33.6 and 33.15 are the subjects of patent number GBA 2166445 and worldwide patents for commercial diagnostic use.

REFERENCES

- Baillie, J. E. M., C. Hilton-Taylor and S. N. Stuart (2004) *2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment*. Switzerland and Cambridge: IUCN, Gland.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brokfield and T. Burke (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting, p. 225-269. In: A. R. Hoelzel (ed.) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. New York: Oxford University Press.
- Burke, T. and M. W. Bruford (1987) DNA fingerprinting in birds. *Nature* 327:149-152.
- Call, D. R., J. G. Hallett, S. G. Mech and M. Evans (1998) Considerations for measuring genetic variation and population structure with multilocus fingerprinting. *Mol. Ecol.* 7:1337-1346.
- Caparroz, R., N. M. R. Guedes, C. A. Bianchi and A. Wajntal (2001a) Analysis of the genetic variability and breeding behaviour of wild populations of two macaw species (Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. *Ararajuba* 9:43-49.
- _____, C. Y. Miyaki, M. I. Bampi and A. Wajntal (2001b) Analysis of the genetic variability in a sample of the remaining group of Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. *Biol. Cons.* 99:307-311.
- Carrillo, A. C., E. A. B. Sipinski, M. L. Cavalheiro and K. L. Oliveira (2002) Conservação do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no estado do Paraná, p 193-213. In: M. Galetti and M. A. Pizo (eds.) *Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil*. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas.
- Craveiro, R. B. and C. Y. Miyaki (2000) Analysis of the genetic variability of *Propyrrhura maracana* (Psittacidae, Aves) using DNA fingerprinting. *Ararajuba* 8:79-84.
- Faulkes, C. G., D. H. Abbott and A. L. Mellor (1990) Investigation of genetic diversity in wild colonies of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) by DNA fingerprinting. *J. Zool. Lond.* 221:87-97.
- Fleischer, R. C., C. L. Tarr and T. K. Pratt (1994) Genetic structure and mating system in the palila, an endangered Hawaiian honeycreeper, as assessed by DNA fingerprinting. *Mol. Ecol.* 3:383-392.

- Frankel, O. H. and M. E. Soulé (1981) *Conservation and evolution*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gilbert, D. A., N. Lehman, S. J. O'Brien and R. K. Wayne (1990) Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel island fox. *Nature* 344:764-766.
- Gilpin, M. E. and M. E. Soulé (1986) Minimum viable populations: processes of species extinction, p. 19-34. *In*: M. E. Soulé (ed.) *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Hanotte, O., M. W. Bruford and T. Burke (1992) Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. *Heredity* 68:481-494.
- Hedrick, P. W. and P. S. Miller (1992) Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol. Appl.* 2:30-46.
- Hill, W. G. (1987) DNA fingerprints applied to animal and bird populations. *Nature* 327:98-99.
- Jeffreys, A. J., J. F. Y. Brookfield and R. Semeonoff (1985) Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317:818-817.
- Lynch, M. (1991) Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting, p. 113-126. *In*: T. Burke, G. Dolf, A. J. Jeffreys and R. Wolff (eds.) *DNA fingerprinting: approaches and applications*. Switzerland: Birkhauser, Basel.
- Mace, G. M. and R. Lande (1991) Assessing extinction threats: toward a re-evaluation of IUCN threatened species categories. *Cons. Biol.* 5:148-157.
- Martuscelli, P. (1995) Ecology and conservation of the Red-tailed Amazon *Amazona brasiliensis* in south-eastern Brazil. *Bird Cons. Int.* 5:225-240.
- _____ (1997) Nest predation on the Red-tailed Amazon *Amazona brasiliensis* in Southeastern Brazil. *Papageienkunde* 1:183-188.
- _____ and P. Scherer-Neto (1993) Conservation of the Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*) in Southeastern Brazil. *Pitirre* 6:7-8.
- Padua, S. M., S. Navas, K. Oliveira and A. C. Carrillio (2001) Saving the Red-tailed Amazon, flagship of the Atlantic rainforest in Brazil. *Cyanopsitta* 61:12-17.
- Ralls, K. and J. Ballou (1983) Extinction: lessons from zoos, p. 164-184. *In*: C. M Schonewald-Cox, S. Chambers, B. MacBryde and W. L. Thomas (eds.) *Genetics and Conservation*. London: Benjamin/Cummings.
- Rave, E. H. (1995) Genetic analyses of wild populations of Hawaiian geese using DNA fingerprinting. *Condor* 97:82-90.
- Reeve, H. K., D. F. Westneat, W. A. Noon, P. W. Sherman and C. F. Aquadro (1990) DNA fingerprinting reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2496-2500.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scherer-Neto, P. N. (1989) *Contribuição à biologia do papagaio-de-cara-roxa Amazona brasiliensis*. M.Sc. Dissertation, Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- Soulé, M. E. (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential, p. 151-170. *In*: M. E. Soulé and B. A. Wilcox (eds.) *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Stattersfield, A. and D. Capper (2000) *Threatened birds of the World*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Tegelström, H. and G. Sjöberg (1995) Introduced Swedish Canada geese (*Branta canadensis*) have low levels of genetic variation as revealed by DNA fingerprinting. *J. Evol. Biol.* 8:195-207.
- Templeton, A. R. and B. Read (1983) The elimination of inbreeding depression in a captive herd of Speke's gazelle, p. 241-261. *In*: C. M Schonewald-Cox, S. M. Chambers, B. MacBryde and L. Thomas (eds.) *Genetics and Conservation*. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings Publ.
- _____, K. Shaw, E. Routman and S. K. Davis (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77:13-27.

Atlantic forest fragmentation and genetic diversity of an isolated population of the Blue-manakin, *Chiroxiphia caudata* (Pipridae), assessed by microsatellite analyses

Mercival R. Francisco^{1,3}, Mauro Galetti² and Pedro Manoel Galetti Junior¹

¹ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis, km 235, CEP 13565-905, P.O. Box 676, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: mercivalfrancisco@uol.com.br

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Plant Phenology and Seed Dispersal Research Group, Departamento de Ecologia, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil and Instituto de Biologia da Conservação (IBC), Av. P-13, 293, Rio Claro, SP, Brasil

³ Autor para correspondência

Recebido em 28 de agosto de 2005; aceito em 07 de março de 2006

RESUMO. Fragmentação da mata Atlântica e variabilidade genética de uma população isolada do Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata* (Pipridae), verificada através de análise de microssatélites. A fragmentação dos habitats restringe o fluxo gênico, resultando na perda de variação genética e depressão por endocruzamento. A Mata Atlântica tem passado por extensas perdas de habitat desde a colonização européia a cinco séculos atrás, e muitas populações de aves estão sendo extintas. Análises de variabilidade genética podem ser importantes para a determinação da viabilidade das populações a longo prazo e para direcionar planos de manejo. Neste trabalho, foi analisada a variabilidade genética do Tangará-dançarino, *Chiroxiphia caudata* (Pipridae), em um fragmento de 112 ha, isolado há 73 anos, e em uma área controle de 10.000 ha, utilizando-se *loci* ortólogos de microssatélites. Três dos nove *loci* testados foram polimórficos. A população do fragmento não apresentou déficit significativo de heterozigose. Embora a diversidade genética, estimada através da heterozigose esperada e riqueza alélica, tenha sido menor no fragmento, as diferenças não foram significativas. Isto sugere que um fragmento com este tamanho possa ser suficiente para manter a variabilidade da população, ou então, 73 anos não foi tempo suficiente para haver perda significativa de variabilidade genética. No entanto, alelos mais raros podem ter sido perdidos, o que é esperado em populações pequenas e isoladas. Uma grande divergência genética foi encontrada entre as duas populações. Apenas estudos futuros dentro de áreas contínuas permitirão verificar se esta diferenciação foi causada pela fragmentação ou se é um resultado da estruturação populacional natural da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, fragmentação florestal, variabilidade genética.

ABSTRACT. Habitat fragmentation is predicted to restrict gene flow, which can result in the loss of genetic variation and inbreeding depression. The Brazilian Atlantic forest has experienced extensive loss of habitats since European settlement five centuries ago, and many bird populations and species are vanishing. Genetic variability analysis in fragmented populations could be important in determining their long-term viability and for guiding management plans. Here we analyzed genetic diversity of a small understory bird, the Blue-manakins *Chiroxiphia caudata* (Pipridae), from an Atlantic forest fragment (112 ha) isolated 73 years ago, and from a 10,000 ha continuous forest tract (control), using orthologous microsatellite loci. Three of the nine loci tested were polymorphic. No statistically significant heterozygote loss was detected for the fragment population. Although genetic diversity, which was estimated by expected heterozygosity and allelic richness, has been lower in the fragment population in relation to the control, it was not statistically significant, suggesting that this 112 ha fragment can be sufficient to maintain a blue-manakin population large enough to avoid stochastic effects, such as inbreeding and/or genetic drift. Alternatively, it is possible that 73 years of isolation did not accumulate sufficient generations for these effects to be detected. However, some alleles have been likely lost, specially the rare ones, what is expected from genetic drift for such a small and isolated population. A high genetic differentiation was detected between populations by comparing both allelic and genotypic distributions. Only future studies in continuous areas are likely to answer if such a structure was caused by the isolation resulted from the forest fragmentation or by natural population structure.

KEY WORDS: Birds, forest fragmentation, genetic variability, manakins.

Habitat fragmentation is predicted to restrict gene flow, which can result in the loss of genetic variation and inbreeding depression (Storfer 1999). These effects can be minimized by immigration, which may reduce inbreeding and introduce well-adapted individuals with high fitness (Lande and Barrowclough 1987, Slatkin 1987, Storfer 1999). However, species differ in their dispersal ability and will therefore react differently to isolation (Ouborg 1993, Paradis *et al.* 1998). The available data suggest that birds inhabiting Neotropical forest undergrowth present limited ability to colonize patches separated by open areas when compared to birds of temperate and open habitats (Willis 1974, Stouffer and Bierregaard Jr. 1995, Bates 2000), in the manner that for some species, populations with reduced number of individuals remain trapped

by isolation in small forest fragments, being more exposed to chance events (Stouffer and Bierregaard Jr. 1995, Devey and Stouffer 2001).

Although forest fragmentation has been pointed out as one of the most important causes of local extinction of Neotropical birds (Willis 1974, 1979, Terborgh and Winter 1980, Willis and Oniki 1992, Stouffer and Bierregaard Jr. 1995, Robinson 1999), studies have focused primarily on environmental and demographic aspects, being restrict to reports on what species persist or disappear under different conditions of fragmentation (Willis 1974, 1979, Karr 1982, Stouffer and Bierregaard Jr. 1995, Robinson 1999). However, extinction in the Atlantic forest avifauna has been considered time-lagged (Brooks and Balmford 1996), and genetic variability in fragmented popu-

lations could be important in determine their long-term viability (Shaffer 1981, 1987, Gilpin and Soulé 1986, Storer 1999, Hudson *et al.* 2000).

The Brazilian Atlantic forest is one of the five most important hotspots in the planet, presenting not only an exceptional biodiversity and endemism concentration, but also an exceptional loss of habitats (Myers *et al.* 2000). This ecosystem has been extensively exploited since European settlements five centuries ago. Most of the forest was logged for sugar cane and coffee plantations (Willis 1979, Willis and Oniki 1992, Aleixo and Galetti 1997) and currently, only 7.5% of its original 1 million km² area remains (Myers *et al.* 2000) distributed in several small disconnected fragments and a few large forest tracts (SOS Mata Atlântica and INPE 1992).

Although some of these fragments are able to maintain a significant number of small-sized species (Willis 1979, Aleixo and Vielliard 1995, Cândido Jr. 2000), nothing is known about insularization effects on genetic variability of remaining populations, and how prone these populations are to suffer inbreeding depression and disappear in the future.

Manakins (Pipridae) are small frugivorous non-migratory birds found exclusively in the Neotropics. They are widely distributed in tropical and subtropical forests and woodlands undergrowth, and are rarely seen in open areas. They are well known for their lek-mating behavior and striking males sexual plumage, while females are green dull-colored (Snow 1976, Ridgely and Tudor 1994, Sick 1997, Brumfield and Braun 2001).

The Blue-manakin, *Chiroxiphia caudata*, is a small species (23.4g) distributed in southeast Brazil (south Bahia, Minas Gerais and south Goiás to Rio Grande do Sul), eastern Paraguay (west to Canendiyu and Paraguari) and northeastern Argentina (Misiones and Corrientes). Like the other representatives within the genus, it is known by perform a highly specialized cooperative courtship display, in which two to six males exhibit to only one female (Foster 1981, Willis and Oniki 1988, Ridgely and Tudor 1994, McDonald and Potts 1994). This species is one of the most common understory birds found in highly disturbed fragments in the Atlantic forest of Brazil (Willis 1979, Aleixo and Vielliard 1995) and may have an ecological advantage upon more specialized bird species.

The purpose of this paper was to assess the effects of forest fragmentation on the genetic variability of Blue-manakin, using orthologous microsatellite loci. We hypothesized that genetic variability would be lower in a 112 ha fragment, rather than in a 10,000 ha area.

MATERIAL AND METHODS

Study areas. The genetic variability of Blue-manakins from a 112 ha semideciduous Atlantic forest fragment located in São Carlos, southeast Brazil (21° 58' S, 47° 51' W), was analyzed. This patch is surrounded by pasture and sugar-cane plantations, and the region is completely disturbed, remaining only a few small cerrado and Atlantic forest disconnected

fragments. The deforestation in the region and the establishment of the current boundaries occurred in 1929, when local farmers had in the logging their principal economic activity (Primavesi *et al.* 1999). The exact historical record of isolation process and the large distance in relation to source areas (tens of kilometers) make of this fragment suitable for studies regarding to isolation and heterozygosity.

In order to compare, we also analyzed the genetic variability of Blue-manakins from Morro Grande reserve, which was adopted as a control area. This is a 10,000 ha continuous Atlantic forest tract, located in Cotia (23° 30' S, 46° 50' W), western from the metropolitan region of São Paulo, south-east Brazil. These study areas are about 185 km apart.

Sample collection and DNA isolation. Birds were captured using mist nets (12 x 2.5 m) in 1999 and 2000, and marked with metal rings before release. A 10µL blood sample was collected from each animal by cutting nail tip. A volume of EDTA, approximately three times the blood volume, was added to the samples, which were stored in freezer at -20°C. DNA extraction was according to Lahiri and Nurnberger (1992).

Cross-specific microsatellite loci and PCR amplification. We used the Dpµ01, Dpµ03, Dpµ05, Dpµ15 and Dpµ16 primers described for Yellow warbler, *Dendroica petechia* (Emberizidae, Parulinae) (Dawson *et al.* 1997), and LTMR6, LTMR8, LTMR15 and SJR133 described for Long-tailed manakin, *Chiroxiphia linearis* (Pipridae) (MacDonald and Potts 1994) (Table 1). PCR reactions were performed in PTC-100™ MJ-Research thermocycler in 10µL volume, containing 150 ng DNA, 0.2 mM dNTPs, 1x thermo buffer, 50 ng of each primer, 3mM MgCl₂ and 1U Taq polymerase. Thermocycler was programmed for 30 cycles, following an initial denaturing step at 94°C for 3 min. First 10 cycles consisted of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. The remaining 20 cycles consisted of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C.

Amplification products were resolved on 12% polyacrylamide denaturing gels containing 8 M urea. Gels were run at 47 W for 4.5–7 h. Results were visualized by silver staining (Comincini *et al.* 1995). Success of orthologous loci amplification was determined by the visualization of one product about the same size as the observed for the original species (see Dawson *et al.* 1997). Alleles sizing was visually performed using 10 bp ladder.

Data analysis. Within-population, deficiency and/or excess of heterozygotes were calculated by comparing the expected (H_e) and observed (H_o) levels of heterozygosity, using score test (U test) (Rousset and Raymond 1995), as implemented in the software GENEPOP v. 3.3 (Raymond and Rousset 1995a); and by calculating inbreeding coefficient (F_{is}) (Weir and Cockerham 1984), using the software FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 1995). Departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were calculated using exact test (Raymond and Rousset 1995b).

Table 1. Characterization of nine orthologous microsatellite loci used to assess genetic structure of a fragmented and a continuous population of Blue manakin, *Chiroxiphia caudata*. Product size in base pairs (bp), number of alleles and mean allele frequency for polymorphic loci (mean \pm SD) are presented.

Locus	Primer sequence	Product size (bp)	N° alleles (n°. individuals)	Mean frequency
<i>Dpμ01</i>	F-TGGATTACACCCCAAAATT R-AGAAGTATATAGTGCCGCTTGC	160	1 (15)	-
<i>Dpμ03</i>	F-GAATTACCCATTATTGGATCC R-AGCAGCAAAACAAACCAG	170	1 (17)	-
<i>Dpμ05</i>	F-GGTCTGTGCTCTGTATGG R-TCTGAATATTGAACAGCCTA	118	1 (15)	-
<i>Dpμ15</i>	F-GGCTGCAAACCTCATTATCTC R-ATTGAGTCTGTCAGGTCCAG	162	1 (10)	-
<i>Dpμ16</i>	F-ACAGCAAGGTCAGAATTA R-AACTGTTGTGTCTGAGCCT	158	1 (20)	-
LTMR6	F-GCCATGCCACAGGAGTGAGTC R-AGTCATCTCCATCAAGGGCAT	202	1 (17)	-
LTMR8	F-AATGACACCCACATTCCTG R-TGCCCAAATAGCAAAGGAACC	144-154	6 (38)	0.166 \pm 0.197
LTMR15	F-CATTATTCCATAGTGCAAAGC R-AACAGGTGCATCACTAAGCAG	182-216	13 (36)	0.076 \pm 0.089
SJR133	F-CATGCTTCATGGCTCAGTTCA R-TGTGGGCAAGTGTGGGTGTAT	134-150	5 (22)	0.199 \pm 0.170

The prediction that genetic diversity is lower in the fragment population was tested by comparing its expected heterozygosity and allelic richness (EI Mousadik and Petit 1996) to the values obtained for the control population. Allelic richness is a measure of the number of alleles independent of the sample sizes, which was calculated using FSTAT. These values were obtained for each locus separately and the value means were compared using non-parametric Mann-Whitney U test, according to the software BioEstat 2.0 (Ayres *et al.* 2000).

Genetic differentiation between the pair of populations was estimated by calculating fixation index (F_{ST}) (Weir and Cockerham 1984), in FSTAT. The significance of F_{ST} was obtained by testing: if allelic distribution is identical across populations, using Fisher exact test (Probability-test) (Raymond and Rousset 1995b), as implemented in GENEPOP;

Table 2. Probability values for significance of departure for Hardy-Weinberg equilibrium, using Probability-test.

Locus	Population	
	Fragment	Control
LTMR8	0.233	0.059
LTMR15	0.702	0.013
SJR133	0.738	0.220
All loci	0.646	0.008

and if genotypic distribution is identical across populations, using the log-likelihood (G) based exact test (Goudet *et al.* 1996), performed in FSTAT. Values were obtained for each locus separately and overall.

RESULTS

Although all of the primers here tested have successfully amplified a product presenting the expected size, only loci LTMR8, LTMR15 and SJR133 were polymorphic (Table 1). These three loci presented dinucleotidic repetitive arrays and seem to be reliable markers for population studies on Blue-manakin.

Hardy-Weinberg equilibrium and Genetic variability. There were no evidences for deficiency of heterozygotes in the fragment population, since all of the polymorphic loci were in HWE equilibrium (Table 2) and no deficit or excess of heterozygotes was detected by F_{IS} . Although locus LTMR8 has presented a significant value for score test, which compared deficit of H_o in relation to H_e , it was very close to significance, and the overall value, pooled across all loci was not statistically significant (Table 3). Although fragment sample size is small, it seems to be representative of this population. This assumption become evident when the number of captured birds is plotted against the capture efforts (time of net exposure) (Figure 1).

For the control population, locus LTMR15 was not in HWE equilibrium (Table 2), and presented an extremely significant deficit of heterozygotes, detected by comparing expected and observed levels of heterozygosity. F_{IS} was positive and have also differed significantly from zero for locus LTMR15. Significant departure from HWE equilibrium and loss of heterozygotes (comparing H_O and H_E) was also detected for control population when all of the loci were pooled, probably because of the influence of locus LTMR15 (Table 3).

Genetic diversity estimated by H_E and allelic richness (Table 3) was not significantly lower in the fragment in relation to the control population (Man-Whitney test: $U = 2.0$; $P = 0.275$ and $U = 2.0$; $P = 0.275$, respectively).

Population differentiation. The two populations analyzed were genetically differentiated. Exact test used to compare allelic distribution indicated significant differentiation between populations when the loci were separately analyzed and when results across all loci were pooled (Table 4). When genotypic distribution was considered, only locus SJR133 did not present significant differentiation. Nevertheless, the value obtained was very close to significance, and the overall value was also significant. Furthermore, some specific alleles for each population have been found for all of the three loci analyzed.

DISCUSSION

Orthologous loci amplification. The success of cross-species microsatellite loci amplification obtained here suggests that primer-binding sites can be conserved even in distantly related species, as elsewhere reported (Rico *et al.* 1996, Dawson *et al.* 1997, Primmer and Ellegren 1998).

However, it has been argued that levels of polymorphism in orthologous loci seem to decay with increasing phyloge-

netic distance (Rico *et al.* 1996, Harr *et al.* 2000). The main mechanism leading to microsatellite loci decay is the accumulation of point mutations in the repetitive array, which may decrease slippage rate, resulting in monomorphic loci (Primmer and Ellegren 1998, Harr *et al.* 2000, Kruglyak *et al.* 2000). On the other hand, some loci are recognized to maintain variation even in distantly related species (Primmer and Ellegren 1998).

Available data indicate high probabilities of polymorphism when cross-species primers are applied in closely related species (Rico *et al.* 1996, Bouzat *et al.* 1998, Petren *et al.* 1999). In the present study, polymorphism was only obtained when cross-specific loci were applied within the same genus (*Chiroxiphia*). However, locus SJR133, presented by *C. linearis*, has been previously isolated from a genomic library of Florida scrub jay (MacDonald and Potts 1994). Furthermore, locus *Dpμ03*, which were monomorphic for *C. caudata*, was highly polymorphic when applied for Rufous gnateater, *Conopophaga lineata* (Conopophagidae) (pers. obs.). Although the relationship between phylogenetic distance and orthologous microsatellite loci variation remains controversial, our results support the hypothesis that microsatellite evolution may differ substantially between particular loci (Primmer and Ellegren 1998).

Genetic difference. Both allelic and genotypic frequencies indicated that fragment and control populations were genetically differentiated. Geographic patterns of genetic diversity can be generated by various mechanisms, such as (1) clinal variations of neutral or adaptive traits; (2) historical isolation of subdivided populations; (3) secondary contacts among formerly isolated and divergent populations or (4) divergent selective pressures along species distribution. In the case of new founded or small isolated populations genetic drift and

Table 3. Number of individuals analyzed for each orthologous microsatellite locus (N), allelic richness (AR), expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity, and inbreeding coefficient (F_{IS}) for a fragmented and a continuous Blue-manakin population.

Locus	N	AR	H_E	H_O	P_d	P_e	F_{IS}	P_1	P_s
Fragment									
LTMR8	16	4.117	0.558	0.375	0.044	0.965	0.336	0.066	0.975
LTMR15	16	5.483	0.771	0.875	0.754	0.281	-0.141	0.941	0.216
SJR133	10	3.0	0.570	0.500	0.433	0.784	0.135	0.441	0.750
All loci					0.277	0.759	0.083	0.275	0.758
Control									
LTMR8	22	4.223	0.640	0.772	0.943	0.104	-0.212	0.983	0.083
LTMR15	20	8.411	0.870	0.650	0.000	1.000	0.258	0.008	1.000
SJR133	12	4.833	0.757	0.666	0.127	0.881	0.124	0.291	0.925
All loci					0.012	0.976	0.082	0.083	0.925

P_d is the value for significance of difference between H_O and H_E (heterozygotes deficit) and P_e the value for significance for heterozygotes excess. The probability that F_{IS} value differ significantly from zero was calculated by randomization method (based on 3,000 randomizations and level of significance at 5%). P_1 is the proportion of randomizations that gave a larger F_{IS} than the observed, and P_s is the proportion of randomizations that gave a smaller F_{IS} than observed.

Table 4. Genetic differentiation between a fragmented and a continuous population of Blue-manakin, detected by fixation index (F_{ST}).

Locus	F_{ST}	P_a	P_g	S. A.	U. A.
LTMR8	0.117	0.009	0.044	4	1/1
LTMR15	0.026	0.004	0.022	4	2/7
SJR133	0.069	0.026	0.058	3	0/2
All loci	0.068	0.0001	0.001		

P_a is the value of significance for population differentiation tested using Probability test (allelic distribution), and P_g is the value of significance for population differentiation using log-likelihood G test (genotypic distribution) (based on 1,000 randomizations). S. A. is the number of shared alleles between the two populations and U. A. are the number of unique alleles of each population (Fragment/Control).

inbreeding may be the principal mechanisms leading to genetic divergence (Simberloff and Cox 1987, Slatkin 1987, Smith *et al.* 1997, Barton and Hewitt 1999, Kark *et al.* 1999).

The fact that the fragment population is in HWE equilibrium, not presenting a statistically significant deficiency of heterozygotes, suggests that inbreeding is not the main mechanism responsible for such genetic differentiation. However, founding events and drift may not be excluded. Alleles could be arisen or lost independently in isolated and divergent populations, although the presence of alleles unique to each population could occur because of the small sample sizes. Different authors have found higher genetic differences among populations of Neotropical forest species than in temperate ones, which have been attributed to sedentariness (Brawn *et al.* 1996, Brumfield and Capparella 1996, Bates 2000). However, only large geographical-scale studies could answer whether the divergence found is due to natural population structuring along Blue-manakin distribution and whether interruption of gene flow, caused by forest fragmentation, can be leading to additional genetic differentiation.

Genetic variability and conservation. The absence of heterozygote deficits, the maintenance of HWE equilibrium, as well as the not significant loss of genetic diversity compared to the control population, suggest that the studied fragment presents sufficient area to maintain a Blue-manakin population large enough to avoid drastic stochastic effects, such as inbreeding, or 73 years of isolation was not sufficient time for genetic stochastic effects to be statistically detected (although basic data on longevity are not available for most of Neotropical birds).

Manakins and other small-sized understory fruit-eating birds have usually high abundances in small forest patches (Snow 1976, Aleixo and Vielliard 1995, Cândido Jr. 2000), which may reflect high adaptation to local disturbance, and can also contribute to the maintenance of the within-population genetic variability even in small isolated fragments.

Most of the Neotropical understory birds are not able to colonize isolated forest patches and dispersal is assumed to be low (Willis 1974, 1979, Stouffer and Bierregaard Jr. 1995, Greenberg and Gradwohl 1997, Bates 2000). Sugar cane and other crops are a true barrier for manakins and other small forest dweller birds. The Blue-manakin is restricted to forest habitats, and has low propensity to cover open areas (Sick

1997). The study site is completely disturbed and the few small Atlantic forest remnants are tens of kilometers apart one another. Furthermore, this area is at least 150 km away from the remaining large forested areas, which are well preserved in the mountain ranges along Atlantic coastal regions. Then, if some immigration occurs, it is an improbable factor contributing to additional genetic variability.

Although not statistically significant, values obtained for both H_E and allelic richness were lower in the fragment population. Given that the obtained sample must be representative of the population (see Figure 1), some alleles have been likely lost, specially the rare ones, what is expected from genetic drift for such a small and isolated population (Fuerst and Maruyama 1986, Leberg 1992).

The unexpected loss of heterozygotes detected for locus LTMR15 in the control population was probably caused by null allele and/or allele dropout effects in this locus specifically for this population, since loci LTMR8 and SJR133 were in Hardy-Weinberg equilibrium and did not present heterozygote deficit.

One of the major objective in analyze genetic variability in disturbed ecosystems is to determine minimum area requirements to maintain long-term viable populations (Haig 1998). The genetic variability of fragmented populations has been rarely assessed in Neotropical birds (Bates 2000), and this is the first study to report data on Atlantic forest species. Forest fragmentation has been considered the main cause of bird population decline in Atlantic forest (Willis 1979, Aleixo and Galetti 1997). In a near future a large number of species and populations are expected to disappear if not submitted to management (Brooks and Balmford 1996, Aleixo and Galletti 1997). Genetic variability analysis will be pivotal in determining minimum viable populations and minimum area requirements, as well as providing information on genetic distance of populations, which could be important to guide possible translocation plans and corridors establishment (Gilpin and Soulé 1986, Storfer 1999). By now, however, it is not possible to conclude that other fragments even about the same size of the studied area could maintain significant levels of genetic variability in Blue-manakin populations, since populations inhabiting different fragments can experience bottlenecks and/or founder events with variable intensities (Bouzat *et al.* 1998, Tarr *et al.* 1998).

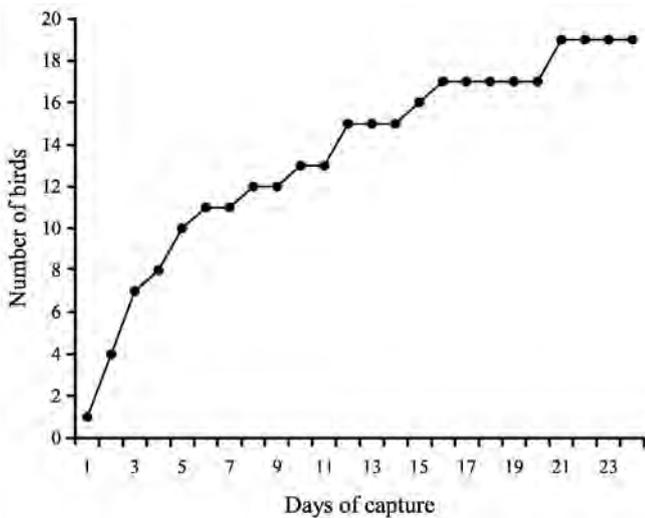


Figure 1. Cumulative number of Blue-manakins captured in a 112 ha Atlantic forest fragment. Each capture day sums eight hours of capture using eight 12 x 2.5 m mist nets. The capture rate significantly changed after 16 days of capture.

The Blue-manakin is not currently endangered in the Atlantic forest, but this species is a component of the important guild of Atlantic forest understory seed dispersers bird, and its absence in some forest fragments could contribute to reduced habitat resilience and affect the population of some plants which they disperse (Foster 1987, Galetti and Pizo 1996, Pizo 1997).

The magnitude of the habitat fragmentation effects on the genetic diversity of Atlantic forest birds may be better understood only when the genetic variability and structuring of non-fragmented populations to be known, which will be achieved with studies on a more broad geographical scale, including populations distributed within the remaining continuous areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to CEMAVE (Centro de Estudos Para Conservação das Aves Silvestres) for authorize birds capture and for supplying numbered metal rings. Blood samples collection was authorized by IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis). EMBRAPA Pecuária Sudeste authorized field work in the studied fragment and SABESP Alto Cotia authorized field work in Morro Grande Reserve. Dr. Luciana C. A. Regitano, Dr. Silvia N. Del Lama, Dr. H. Lisle Gibbs, and two anonymous referees contributed with important suggestions that improved the final version of this manuscript. We also thank Vítor O. Lunardi for helping in the fieldwork. This research was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Capacitação de Profissionais de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

- Aleixo, A. and J. Vielliard (1995) Composição e dinâmica da avifauna da mata de Santa Genebra, Campinas, São Paulo, Brasil. *Revta. bras. Zool.* 12:493-511.
- _____ and M. Galetti (1997) The conservation of the avifauna in a lowland Atlantic forest in South-east Brazil. *Bird Conserv. Intern.* 7:235-261.
- Ayres, M., M. Ayres Jr., D. L. Ayres and A. S. Santos (2000) *Bio-Estat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá e CNPq.
- Barton, N. H. and G. M. Hewitt (1999) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341:497-502.
- Bates, J. M. (2000) Allozymic genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *Condor* 102:770-783.
- Bouzat, J. L., H. H. Cheng, H. A. Lewin, R. L. Westemeier, J. D. Brawn and A. K. N. Paige (1998) Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the Greater prairie chicken. *Conserv. Biol.* 12:836-843.
- Brawn, J. D., T. M. Collins, M. Medina and E. Bermingham (1996) Associations between physical isolation and geographical variation within three species of Neotropical birds. *Mol. Ecol.* 5:33-46.
- Brooks, T. and A. Balmford (1996) Atlantic forest extinctions. *Nature* 380:115.
- Brumfield, R. T. and A. P. Capparella (1996) Historical diversification of birds in Northwestern South America: a molecular perspective on the role of vicariant events. *Evolution* 50:1607-1624.
- _____ and M. J. Braun (2001) Phylogenetic relationships in Bearded manakins (Pipridae: *Manacus*) indicate that male plumage color is a misleading taxonomic marker. *Condor* 103:248-258.
- Cândido Jr., J. F. (2000) The edge effect in a forest bird community in Rio Claro, São Paulo State, Brazil. *Ararajuba* 8:9-16.
- Comincini, S., P. Leone, L. Redaelli, L. De Giuli, Y. Zhang and L. Ferreti (1995) Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *J. Anim. Breed. Genet.* 112:415-420.
- Dawson, R. J. G., H. L. Gibbs, K. A. Hobson and S. M. Yezzerinac (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79:506-514.

- Develey, P. F. and P. Stouffer (2001) Effect of roads on movements by understory birds in mixed-species flocks in Central Amazonian Brazil. *Conserv. Biol.* 15(3):1416-1422.
- EI Mousadik, A. and R. J. Petit (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92:832-839.
- Foster, M. S. (1981) Cooperative behavior and social organization of the Swallow-tailed manakin (*Chiroxiphia caudata*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 9:167-177.
- _____ (1987) Feeding methods and efficiencies of selected frugivorous birds. *Condor* 89:566-580.
- Fuerst, P. A. and T. Maruyama (1986) Considerations on the conservation of alleles and of genic heterozygosity in small managed populations. *Zoo. Biology* 5:171-179.
- Galetti, M. and M. A. Pizo (1996) Fruit eating birds in a forest fragment in Southeastern Brazil. *Ararajuba* 4:71-79.
- Gilpin, M. E. and M. E. Soulé (1986) Minimum viable populations: processes of species extinction, p. 19-34. In: M. E. Soulé (ed.) *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Goudet, J. (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86:485-486.
- _____, M. Raymond, T. Demeus and F. Rousset (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144:1933-1940.
- Greenberg, R. and J. Gradwohl (1997) Territoriality, adult survival, and dispersal in the Cheker-throated Antwren in Panama. *J. Avian Biol.* 28:103-110.
- Haig, S. M. (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79:413-425.
- Harr, B., B. Zangerl and C. Schlotterer (2000) Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 17:1001-1009.
- Hudson, Q. J., R. J. Wilkins, J. R. Waas and I. D. Hogg (2000) Low genetic variability in small populations of New Zealand kakako *Callaeas cinerea wilsoni*. *Biol. Conserv.* 96:105-112.
- Kark, S., P. U. Alkon, U. N. Safriel and E. Randi (1999) Conservation priorities for Chukar partridge in Israel based on genetic diversity across an ecological gradient. *Conserv. Biol.* 13:542-552.
- Karr, J. R. (1982) Population variability and extinction in the avifauna of a tropical land bridge island. *Ecology* 63:1975-1978.
- Kruglyak, S., R. Durrett, M. D. Schug and C. F. Aquadro (2000) Distribution and abundance of yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. *Mol. Biol. Evol.* 17:1210-1219.
- Lahiri, D. K. and J. I. Nurnberger Jr. (1992) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19:5444.
- Lande, R. and G. Barrowclough (1987) Effective population size, genetic variation, and their use in population management, p. 87-123. In: M. E. Soulé (ed.) *Viable Populations for Conservation*. New York: Cambridge University Press.
- Leberg, P. L. (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46:477-494.
- McDonald, D. B. and W. K. Potts (1994) Cooperative display and relatedness among males in a lek-mating bird. *Science* 266:1030-1032.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca and J. Kent (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Ouborg, N. J. (1993) Isolation, population size and extinction: the classical and metapopulation approaches applied to vascular plants along the Dutch Rhine-system. *Oikos* 66:298-308.
- Paradis, E., S. R. Baillie, W. J. Sutherland and R. D. Gregory (1998) Patterns of natal and breeding dispersal in birds. *J. Anim. Ecol.* 67:518-536.
- Petren, K., B. R. Grant and P. R. Grant (1999) Low extrapair paternity in the Cactus finch (*Geospiza scandens*). *Auk* 116:252-256.
- Pizo, M. A. (1997) Seed dispersal and predation in two populations of *Cabralea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic forest of Southeastern Brazil. *J. Trop. Ecol.* 13:559-578.
- Primavesi, O., A. C. P. A. Primavesi, A. F. Pedroso, A. C. Camargo, J. B. Rassini, R. J. Filho, G. P. Oliveira, L. A. Correa, M. J. A. Armelin, S. R. Vieira and S. C. F. Dechen (1999) *Microbacia hidrográfica do ribeirão Canchim: um modelo real de laboratório ambiental*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste.
- Primmer, C. R. and H. Ellegren (1998) Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 15:997-1008.
- Raymond, M. and F. Rousset (1995a) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.

- _____ (1995b) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Rico, C., I. Rico and G. Hewitt (1996) 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. B.* 263:549-557.
- Ridgely, R. S. and G. Tudor (1994) *The Birds of South America*, v. 1. Austin: University of Texas Press.
- Robinson, W. D. (1999) Long-term changes in the avifauna of Barro Colorado Island, Panama, a tropical forest isolate. *Conserv. Biol.* 13:85-97.
- Rousset, F. and M. Raymond (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413-1419.
- Shaffer, M. L. (1981) Minimum population sizes for species conservation. *BioScience* 31:131-134.
- _____ (1987) Minimum viable populations: coping with uncertainty, p. 69-86. In: M. E. Soulé (ed.) *Viable Populations for Conservation*. New York: Cambridge University Press.
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.
- Simberloff, D. and J. Cox (1987) Consequences and costs of corridors. *Conserv. Biol.* 1:63-71.
- Slatkin, M. (1987) Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Smith, T. B., R. K. Wayne, D. J. Girman and M. W. Bruford (1997) A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* 276:1855-1857.
- Snow, D. W. (1976) *The Web of Adaptation: Birds Studies in the American Tropics*. Cornell University Press.
- SOS Mata Atlântica e INPE (1992) *Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da mata Atlântica no período de 1985-1990*. São Paulo: Fundação SOS mata Atlântica.
- Storfer, A. (1999) Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biol. Conserv.* 87:173-180.
- Stouffer, P. C. and R.O. Bierregaard Jr. (1995) Use of amazonian forest by understory insectivorous birds. *Ecology* 76:2429-2445.
- Tarr, C. L., S. Conant and R. C. Fleisher (1998) Founder events and variation at microsatellite loci in an insular Passerine bird, the Laysan finch (*Telespiza cantans*). *Mol. Ecol.* 7:719-731.
- Terborgh, J. and B. Winter (1980) Some causes of extinction, p. 119-134. In: M. E. Soulé and B. A. Wilcox (eds.) *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sunderland: Sinauer Associates Inc..
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Willis, E. O. (1974) Populations and local extinctions of birds on Barro Colorado island, Panamá. *Ecol. Monogr.* 44:153-169.
- _____ (1979) The composition of avian communities in remanescent woodlots in Southern Brazil. *Papéis Avul. de Zool.* 33:1-25.
- _____ and Y. Oniki (1988) Bright crowns of female and young males Swallow-tailed manakin, *Chiroxiphia caudata* (Shaw and Nodder 1973) (Aves, Pipridae). *Rev. Brasil. Biol.* 48:439-441.
- _____ and _____ (1992) Losses of São Paulo birds are worse in the interior than in the Atlantic forests. *Ciência e Cultura* 44:326-328.

Caracterização da variabilidade genética em indivíduos cativos de *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae) mediante o uso de RAPD como marcador molecular

Vincent Louis Viala^{1,2}, Edislane Barreiros de Souza¹, Leandro Fagundes da Silva Tarosso¹ e Fábila Prates de Oliveira¹

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Molecular de Animais Silvestres, FCL – UNESP, Avenida Dom Antônio nº 2100, Jd. Universitário, 19800-000, Assis, SP, Brasil. E-mail: vviala@ibb.unesp.br

² Autor para correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 28 de janeiro de 2006

ABSTRACT. Genetic variability of captive individuals of *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae) using RAPD molecular markers. Molecular markers are very useful for biodiversity management. However, standardized markers are not available for most Neotropical birds. In this study a set of RAPD markers were evaluated for their potential use in *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae). Furthermore, a PCR reaction was developed to sex type the studied individuals. Nine RAPD primers were selected and the genetic variability of 16 captive individuals was examined. Five females and 11 males had their sexes successfully identified. The SIMPLE MATCHING index values of genetic differentiation varied from 12% to 51.5%, with an average of 33.6% (SD = 9.3). Compared to other bird species analyzed under similar methods, such as *Amazona vinacea* and *Triclaria malachitacea*, *R. toco* presented relatively high levels of genetic variability. The RAPD markers here presented proved to be potentially useful for future conservation and management plans.

KEY WORDS: *Ramphastos toco*, RAPD, sex typing, DNA extraction, feathers.

RESUMO. As técnicas de genética molecular podem contribuir consideravelmente para a conservação da biodiversidade. No presente trabalho foram estudados 16 indivíduos cativos de *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae), com os objetivos de (1) padronizar marcadores de RAPD capazes de gerar informações sobre a variabilidade genética e (2) identificar o sexo dos indivíduos estudados por meio da técnica de PCR. O DNA genômico foi extraído da polpa de penas jovens e de raque de penas desenvolvidas. O sexo de todos os indivíduos foi identificado, totalizando cinco fêmeas e 11 machos. Os valores de diferenciação genética do índice SIMPLE MATCHING, obtidos com nove primers de RAPD, variaram de 12% a 51,5%, e uma diferenciação genética média de 33,6% (DP = 9,3) foi encontrada. Estudos prévios, realizados com metodologias similares, nas espécies *Amazona vinacea* e *Triclaria malachitacea*, apontam que a variabilidade genética apresentada pelos indivíduos de *R. toco* analisados é relativamente alta. Além disso, os marcadores de RAPD aqui padronizados poderão ser utilizados em estudos futuros de populações naturais da espécie, contribuindo para programas de conservação e manejo.

PALAVRAS-CHAVE: *Ramphastos toco*, RAPD, sexagem, extração de DNA, penas.

A destruição dos habitats naturais é a principal causa da extinção de espécies. A preservação *in situ* tem sido a melhor estratégia para proteção da biodiversidade em longo prazo, pois busca manter as comunidades e populações nos seus ambientes originais. Para o manejo adequado dos recursos naturais é necessário entender como a variação genética é distribuída e quais as características do meio ambiente, ou das espécies, que influenciam na sua distribuição (Foose 1983). Os esforços de conservação *ex situ* também podem ser parte importante de uma estratégia de conservação integrada (Primack e Rodrigues 2001). Os zoológicos e criadouros conservacionistas têm um papel significativo na conservação de animais silvestres, pois frequentemente detêm exemplares de espécies que se encontram em perigo de extinção. Por isto, a legislação do IBAMA (Portaria IBDF nº 130-p de 06/04/1978 e nº 132-p de 05/05/1988) forçou uma mudança de postura por parte destas instituições mantenedoras com relação ao manejo e exposição de fauna silvestre, ampliando suas atividades. Estas mudanças incluem o incremento e o estudo da variabilidade genética, bem como a formação de casais visando a reprodução para a manutenção das coleções e reintrodução de espécimes na natureza. As análises de DNA oferecem a oportunidade de acesso direto à variabilidade genética, permitindo refinar

ou corrigir “pedigrees” de populações selvagens ou cativas (Mace *et al.* 1996).

Contudo, um problema para a implementação de programas que visam acessar a variabilidade genética de certas populações cativas é a ausência de marcadores moleculares padronizados para as aves brasileiras. Um outro agravante seria a dificuldade na formação dos casais, dado que muitas espécies não apresentam dimorfismo sexual aparente.

A técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) baseia-se na amplificação *in vitro* (por PCR; Reação em Cadeia da Polimerase) de fragmentos de DNA de tamanhos variados, e tem a vantagem de permitir a detecção de polimorfismos genéticos nas espécies em estudo sem necessidade do conhecimento prévio de seqüências do genoma (Williams *et al.* 1990, Fritsch e Rieseberg 1996, Ferreira e Grattapaglia 1998). Técnicas de sexagem também baseadas em PCR são mais rápidas e seguras, quando comparadas com a identificação cromossômica ou a endoscopia cirúrgica.

O Tucano-toco, ou Tucanuçu (*Ramphastos toco*) não está ameaçado de extinção segundo a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, publicada pelo IBAMA (Instrução Normativa nº 3 de 27/05/2003, publicada no Diário Oficial da União nº 101 de 28/05/2003, Seção 1,

p. 88-97), mas já está se tornando raro em algumas regiões (Chiarello 2000). Habitam matas de galeria, cerrado e capões, sendo os únicos ranfastídeos brasileiros que não vivem exclusivamente em áreas florestadas (Sick 1997, Peña e Rumboll 1998). Eles podem ser observados aos pares ou em grupos familiares, e têm uma ampla distribuição no interior do Brasil, da Amazônia ao Paraguai, Bolívia e Argentina. Também podem ser encontrados do litoral do Amapá às Guianas e médio rio Branco, porém não atingem o litoral oriental brasileiro (Sick 1997).

O presente trabalho teve como objetivos: (1) padronizar uma série de marcadores de RAPD para *R. toco*, que permitirão a realização de análises de variabilidade genética nesta espécie em cativeiro ou na natureza, bem como aconselhamentos genéticos para a formação de casais em cativeiro, (2) padronizar o método de sexagem molecular para a espécie em estudo, utilizando-se os *primers* apresentados por (Griffiths *et al.* 1998). Além disso, a variabilidade genética de um grupo de indivíduos encontrados em cativeiro foi avaliada.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se amostras de penas de 16 exemplares cativos de *Ramphastos toco*. As amostras foram provenientes de zoológicos brasileiros e criadouros conservacionistas dos Estados de São Paulo, Paraná e Distrito Federal, e foram armazenadas em etanol absoluto a temperatura ambiente até o momento da extração do DNA. O DNA genômico foi extraído de um a dois bulbos de penas jovens (14 indivíduos) e de raque e cálamo de penas desenvolvidas (dois indivíduos), seguindo-se Bruford *et al.* (1992).

Análises de RAPD. Para as análises de variabilidade genética, 42 *primers* de RAPD (Tabela 1) foram testados utilizando-se três amostras de DNA escolhidas ao acaso. As reações de PCR seguiram basicamente o protocolo desenvolvido por Williams *et al.* (1990). Foram adicionados 30 ng de DNA genômico, 1 µl de tampão de PCR 10X, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 8 pmol de *primer* e água pura (todos os reagentes da Invitrogen), completando um volume final de 10 µl. O termociclador (Biometra - Uniscience) foi programado com: três ciclos iniciais a 95°C por 30 s, 30°C por 2 min e 72°C por 1 min; e 31 ciclos a 95°C por 30 s, 40°C por 2 min e 72°C por 1 min. Após estes ciclos, foi realizado um passo final de extensão de 5 min a 72°C. Com o objetivo de se verificar se os resultados apresentaram reprodutibilidade, foi escolhida uma amostra para teste. O padrão eletroforético apresentado por esta amostra foi comparado, para todos os *primers* analisados, com o padrão eletroforético de sua réplica. Uma amostra controle (sem DNA) foi também utilizada para cada *primer*, evitando assim que eventuais artefatos fossem considerados como bandas de RAPD. Nos casos em que a amplificação das bandas de RAPD não foi bem sucedida, novos testes foram realizados utilizando-se 2,5 mM de MgCl₂ nas reações (Sambrook e Russel 2001).

Tabela 1. Número e seqüência dos *primers* de RAPD (Invitrogen) testados e selecionados (B10, D01, D02, D05, F04, 01, OPC05, OPM02 e OPP05) para a análise de variabilidade genética entre 16 indivíduos cativos de *Ramphastos toco*.

Table 1. Number and sequence of the RAPD primers (Invitrogen) tested and selected (B10, D01, D02, D05, F04, 01, OPC05, OPM02 and OPP05) for the genetic variability analysis of 16 *Ramphastos toco* captive individuals.

Primer	Seqüência (5' → 3')
B03	TCC ACT GGC A
B04	TGG TCC CCG T
B05	GGA GGA GTA G
B10	AGC GGC GTT T
C12	CAC TAG CGT C
D01	CCA CTG CGT C
D02	AGG TGA CCG T
D03	GTT GCG ATC C
D04	TTC CCC CGC T
D05	GAA CCT GCC G
D07	CTC CTG CCA A
D08	AGG CCC GAT G
D09	ACA GGT GCT G
D11	TCT CCC TCA G
D12	TCC ACT GGC A
E02	AAG GGG GCG A
E04	ACG GGC AGC A
E05	GAG GAC GGT T
E12a	CAC TAG CGT C
E12b	AGA GGG AGT C
F04	CAC GTT GCA C
F08	GTC CCC ACC T
01	GGA CCC TTA C
02	CAC CTT TCC C
OPC-05	GAT GAA CCG CC
OPC-07	GTC CCG ACG A
OPC-17	TTC CCC CCA G
OPM-02	ACA ACG CCT C
OPM-07	CCG TGA CTC A
OPP-05	CCC CGC TAA C
OPP-09	GTG GTC GCG CA
OPP-17	TGA CCC GCC T
OPW-02	ACC CCG CCA A
PRIMER1	CCA CTG CGT C
PRIMER2	CAC GGA TTG G
PRIMER3	ACC GGG AGT G
PRIMER4	GAC TGC AGT G
PRIMER5	CAA AGC GAG G
PRIMER6	ACG GCT CGA C
PRIMER7	TGT CCA CGA C
PRIMER8	AGA GGG AGT C
PRIMER9	AGC GGC GTT T

Os resultados das ampliações de cada *primer* foram visualizados em géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, após uma corrida de 140 V por duas horas, e fotodocumentados (KODAK POLAROID 667) sob luz ultravioleta.

Análises estatísticas. As bandas de RAPD foram analisadas visualmente e ordenadas em uma matriz binária de dados, caracterizada pela presença (1) e ausência (0) de bandas. Esta matriz binária foi analisada no programa TREECON FOR WINDOWS (versão 1.3b) (Van de Peer e de Wachter 1994), produzindo uma matriz de diferenciação genética entre os pares de indivíduos utilizando-se do coeficiente SIMPLE MATCHING, segundo a fórmula:

$$GD_{xy} = \left(1 - \frac{N_{AB}}{NT}\right) \times 100,$$

onde N_{AB} é o número de bandas compartilhadas pelos indivíduos A e B, e NT é o número total de bandas.

A matriz de diferenciação genética obtida foi agrupada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*) (Michener e Sokal 1957) para a construção de um dendrograma.

Sexagem por PCR. A técnica de sexagem descrita por Griffiths *et al.* (1998) é baseada na amplificação, por PCR, de um *intron* do gene CHD (Cromo-helicase-DNA), localizado nos cromossomos sexuais (Z e W) de todas as aves, com possível

exceção nos Struthioniformes. O par de *primers* P2 (5' - TC-TGCATCGCTAAATCCTTT - 3') e P8 (5' - CTCCCAAG-GATGAGRAAYTG - 3') utilizados para a sexagem se anela a duas regiões exônicas externas ao *intron* do gene CHD. Devido ao tamanho variável do *intron* existente entre os dois genes CHD-Z (localizado no cromossomo Z) e CHD-W (localizado no cromossomo W), é possível visualizar a presença de duas bandas em indivíduos fêmeas (ZW) e uma banda em machos (ZZ) em géis de agarose ou poliacrilamida. Para cada reação de PCR foram adicionados 1 µl de DNA genômico (50 a 250 ng/µl), 0,5 U de Taq DNA polimerase, 1 µl de dNTPs (2,5 mM de cada), 1 µl de tampão de PCR 10X (contendo 2 mM de MgCl₂), 0,9 µl de cada *primer* (1 nmol/µl) e 5,1 µl de água pura (Todos os reagentes da Invitrogen), totalizando 10 µl. A amplificação no termociclador (Biometra - Uniscience) foi realizada com um ciclo a 94°C por 1 min e 30 s e 29 ciclos a 48°C por 45 s, 72°C por 45 s e 94°C por 30 s, seguidos por uma extensão final de 50°C por 1 min e 72°C por 5 min. Os resultados foram visualizados em géis de agarose 3% corados com brometo de etídio após a separação dos fragmentos por eletroforese.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA utilizado permitiu a obtenção de materiais de qualidade satisfatória tanto com as amostras de bulbo de penas jovens como com as de penas desenvolvidas. Onze machos (indivíduos SP1, SP2, SP4, C2,

Tabela 2. Matriz das porcentagens de diferenciação genética entre pares de indivíduos gerada pelo índice SIMPLE MATCHING pelo programa computacional TREECON FOR WINDOWS (v.1.3.b).

Table 2. Matrix of genetic differentiation percentage among pairs of individuals generated by the SIMPLE MATCHING index, using the TREECON FOR WINDOWS (v. 1.3b) computer program.

Ba1	0																
Ba2	50,00	0															
C1	42,42	34,84	0														
C2	36,36	25,75	27,27	0													
Le	36,36	40,90	18,18	36,36	0												
Br1	28,78	51,51	37,87	43,93	34,84	0											
Br2	30,30	40,90	33,33	39,39	24,24	13,63	0										
Br3	42,42	34,84	27,27	33,33	18,18	28,78	18,18	0									
Br4	34,84	42,42	40,90	46,97	31,81	24,24	22,72	28,78	0								
SP1	45,45	37,87	36,36	45,45	30,30	22,72	15,15	27,27	22,72	0							
SP2	37,87	45,45	28,78	40,90	25,75	24,24	16,66	25,75	24,24	19,69	0						
SP3	39,39	43,93	33,3	39,39	24,24	31,81	18,18	27,27	25,75	21,21	16,66	0					
SP4	43,93	33,33	22,72	28,78	22,72	33,33	25,75	28,78	33,33	28,78	21,21	19,69	0				
Itu	27,27	43,93	45,45	42,42	42,42	37,87	39,39	45,45	37,87	51,51	43,93	51,51	46,97	0			
PR	27,27	43,93	36,36	33,33	36,36	37,87	39,39	30,30	37,87	48,48	40,90	45,45	37,87	24,24	0		
Foz	24,24	50,00	33,33	33,33	36,36	34,84	36,36	36,36	37,87	48,48	31,81	39,39	37,87	24,24	12,12	0	
Ba1	Ba2	C1	C2	Le	Br1	Br2	Br3	Br4	SP1	SP2	SP3	SP4	Itu	PR	Foz		

Br1, Br2, Br4, Ba1, Ba2, Itu e PR) e cinco fêmeas (indivíduos SP3, Le, Foz, C1 e Br3) foram identificados com sucesso.

Dos 42 *primers* de RAPD testados, nove foram selecionados (Tabela 1) segundo os seguintes critérios: padrão de amplificação nítido, ausência de bandas na reação controle (reação sem amostra de DNA) e, resultado positivo no teste de reprodutibilidade.

De acordo com o índice SIMPLE MATCHING, os indivíduos PR e Foz (Tabela 2) apresentaram a menor porcentagem de diferenciação genética (aproximadamente 12%). Os pares de indivíduos que apresentaram as maiores porcentagens de diferenciação genética foram SP3-Itu, SP1-Itu e Br1-Ba2 (Tabela 2), com aproximadamente 51,5%. A diferenciação genética média foi de 33,6% (DP = 9,3).

DISCUSSÃO

Obtenção de DNA a partir de penas. Um dos objetivos do presente trabalho foi a utilização de material biológico de fácil acesso, como as penas desenvolvidas, para a obtenção de DNA. Vários tipos de tecidos podem ser utilizados para esta finalidade, como músculos (e.g. Payne e Sorenson 2003), vísceras ou tecido adiposo subcutâneo (Houde e Braun 1998) e sangue (e.g. Haig et al. 1997, Paterson e Snyder 1999, Bouzat 2001). No entanto, o uso de penas já desenvolvidas pode facilitar os estudos genéticos de populações naturais, uma vez que podem ser encontradas nos ninhos, ou até mesmo no chão. Além disso, seu transporte e armazenamento podem ser feitos em envelopes de papel, à temperatura ambiente. Assim, os resultados aqui obtidos indicam que uma maneira de se viabilizar as pesquisas genéticas com populações de aves, principalmente daquelas mais difíceis de serem capturadas, pode ser a coleta sistemática de penas no ambiente.

Níveis de variação genética. Por muito tempo o enfoque da genética da conservação limitou-se à preservação de variabilidade genética, porém, nem sempre baixos níveis de variabilidade genética refletem uma ameaça à sobrevivência das populações, podendo ser uma característica natural da própria espécie (Awise 1994). Embora muitos estudos tenham dado ênfase a *taxa* raros, as espécies não ameaçadas também podem fornecer informações relevantes para a conservação, permitindo a realização de análises comparativas. Os valores de diferenciação genética observados entre os indivíduos de *R. toco* aqui estudados são superiores aos encontrados em outras espécies de aves em pesquisas desenvolvidas sob as mesmas condições metodológicas. Num estudo de variabilidade genética de 31 indivíduos cativos de *Amazona vinacea* (Psittaciformes), utilizando-se seis *primers* de RAPD, Oliveira (2003) observou, pelo índice de diferenciação SIMPLE MATCHING, valores que variaram de 6,3% a 40,8%, e um valor médio de 25,4%. Matos (2001), ao analisar 20 indivíduos cativos de *Trichloria malachitacea* (Psittaciformes) utilizando nove *primers* de RAPD, observou uma variação genética situada entre 10% e 40% (o valor médio não foi calculado).

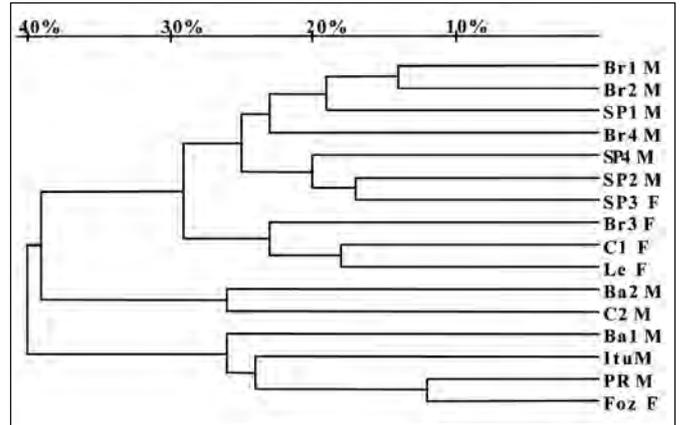


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA a partir dos valores da matriz de distâncias genéticas do índice SIMPLE MATCHING. Os valores da escala representam a porcentagem de diferenciação genética. M = machos e F = fêmeas.

Figure 1. Dendrogram obtained by the UPGMA grouping method using the genetic distance matrix values of the SIMPLE MATCHING index. The scale values represent the genetic differentiation percentage. M = males and F = females.

Dado que o indivíduo PR tem procedência conhecida (Estado do Paraná), o dendrograma gerado pela análise de agrupamento indica o Estado do Paraná como sendo a provável origem também do indivíduo Foz, o qual originalmente não apresentava procedência definida. Isso porque (1) os indivíduos Foz e PR apresentaram o mais baixo valor de diferenciação genética entre si ($GD_{xy} \cong 12\%$) (Tabela 2) e (2) os indivíduos PR e Foz estão agrupados em um ramo distinto do dendrograma (Figura 1).

Implicações para a conservação. Alguns acasalamentos podem ser sugeridos a partir dos resultados dos estudos de distância genética e de sexagem. Se o objetivo de um programa de reprodução for manter altos níveis de variabilidade, cruzamentos entre indivíduos mais distanciados geneticamente, como por exemplo a fêmea SP3 e o macho Itu ($GD_{xy} = 51,5\%$), ou entre a fêmea Foz e o macho Ba2 ($GD_{xy} = 50\%$) ou SP1 ($GD_{xy} \cong 48,5\%$), seriam preferíveis. Seria também de grande importância o cruzamento entre o macho PR e a fêmea Foz, com o objetivo de se manter a variabilidade local do estado do Paraná.

Além de auxiliar na reprodução em cativeiro, os marcadores genéticos aqui padronizados poderão ser utilizados em estudos de populações naturais, contribuindo para programas de conservação e manejo. Finalmente, os valores de variabilidade genética obtidos poderão servir como parâmetros de comparação em estudos futuros de populações naturais ou cativas desta ou de outras espécies de aves.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer: ao Dr. Edmundo José de Lucca, ao Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior e ao Dr.

Carlos Camargo Alberts pelas suas valiosas sugestões; a Dra. Mônica Rosa Bertão e ao Dr. João Tadeu Ribeiro Paes por disponibilizarem os seus laboratórios para o desenvolvimento de parte desta pesquisa; ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP/Assis, ao Departamento de Genética e ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, pela sua colaboração; aos zoológicos Fundação Parque Zoológico de São Paulo/SP, Parque Ecológico Mourão - Leme/SP; Parque das Aves Foz de Iguaçu/PR; Passeio Público de Curitiba/PR, Jardim Zoológico de Brasília/DF, Parque Zoológico de Bauru/SP e aos criadouros conservacionistas Sítio Arco Íris - Itu/SP e Albino Dybas - Cascavel/PR que participaram deste trabalho fornecendo gentilmente as amostras e as informações sobre os tucanos estudados; André Luis Dorini de Oliveira pelo apoio técnico no laboratório; e, finalmente, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Avise, J. C. (1994) *Molecular markers, natural history and evolutions*. New York: Chapman & Hall.
- Bouzat, J. L. (2001) The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea Americana*) in an agricultural landscape. *Biol. Conserv.* 99:277-284.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brookfield e T. Burke (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting, p. 225-269. Em: Hoezel, A. R. (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. New York: Oxford University Press.
- Chiarello, A. G. (2000) Conservation value of a native forest fragment in a region of extensive agriculture. *Braz. J. Biol.* 60:237-247.
- Ferreira, M. E. e D. Grattapaglia (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, 3ª ed. Brasília: Embrapa.
- Foose, T. J. (1983) The relevance of captive populations to the conservation of biotic diversity, p. 104-185. Em: C. M. Schonewald-Cox. (ed.) *Genetics and conservation*. Menlo Park: Benjamin/Cummings.
- Fritsch, P. e L. H. Rieseberg (1996) The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Conservation Genetics, p. 55-69. Em: T. B. Smith e R. K. Wayne (Eds.) *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford University Press.
- Griffiths, R., M. Double, K. C. Y. Orr e R. J. G. Dawson (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7:1071-1075.
- Haig, S. M., C. L. Gratto-Trevor, T. D. Mullins e M. A. Colwell (1997) Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Mol. Ecol.* 6:413-427.
- Houde, P. e M. J. Braun (1998) Museum collections as source of DNA for studies of avian phylogeny. *Auk* 105:773-776.
- Mace, G. M., T. B. Smith, M. W. Bruford e R. K. Wayne (1996) An overview of the issues, p.3-21. Em: Smith, T. B. e R. K. Wayne (eds.) *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford University Press.
- Matos, R. S. (2001) *Estudo da variabilidade genética em *Triclaria malachitacea* (Psittaciforme, Aves) através do uso do RAPD - random amplified polymorphic DNA*. Relatório de Iniciação Científica. UNESP/Assis: Faculdade de Ciências e Letras de Assis.
- Michener, C. D. e R. R. Sokal (1957) A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11:130-162.
- Oliveira, F. P. (2003) *Estudo da variabilidade genética em *Amazona brasiliensis*, *Amazona pretrei*, *Amazona vinacea*, *Amazona rhodocorytha*, *Triclaria malachitacea* e *Deroyptus accipitrinus* (Psittaciformes - Aves) mediante o uso de RAPD como marcador molecular*. Dissertação de mestrado. Botucatu: Universidade Estadual Paulista.
- Paterson, I. G. e M. Snyder (1999) Molecular genetic (RAPD) analysis of Leach's storm-petrels. *Auk* 116:338-344.
- Payne, R. B. e M. D. Sorenson (2003) Museum collections as sources of genetic data. *Bonn. Zool. Beitr.* 51:97-104.
- Peña, M. R. de la e M. Rumboll (1998) *Birds of southern South America and Antarctica*. New Jersey: Princeton University Press.
- Primack, R. B. e E. Rodrigues (2001) *Biologia da conservação*, 1ª ed. Londrina: Midiograf.
- Sambrook, J. e D. W. Russel (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. New York: CSHL Press.
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.
- Smith, T. B., P. P. Marra, M. S. Webster, I. Lovette, H. L. Gibbs, R. T. Holmes, K. A. Hobson e S. Rohwer (2003) A call for feather sampling. *Auk* 120:218-221.
- Van de Peer, Y e R. de Wachter (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10:569-570.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, L. A. Rafaski e S. V. Fingery (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira

Luana Pereira dos Santos¹ e Ricardo José Gunski^{1,2}

¹ Cs. Biológicas, Laboratório de Genética, Universidade Federal do Tocantins, Campus Porto Nacional, Rua 03, Q17, CEP 77 500-000, Jardim dos Ipês, Porto Nacional, TO, Brazil. E-mail: rgunski@uft.edu.br

² Autor para correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 02 de março de 2006

ABSTRACT. A revision on Brazilian bird cytogenetics. The Brazilian bird fauna, with more than 1700 species, represents one of the richest in the planet. However, the number of species analyzed cytogenetically is still low, with exception to domestic birds or those of economic interest. Currently, research groups working on bird chromosomes are also scarce if compared to other vertebrates. Different reasons can be pointed out to justify the lack of new researches on bird cytogenetics, such as the difficulty of sampling, large diploid numbers, the presence of only a few medium and large-sized chromosomes (macrochromosomes) and many small chromosomes (microchromosomes) in the complement. In the present study all the papers published from 1992 to 2006 reporting on Brazilian bird karyotypes were reviewed. The diploid numbers and the morphology of the sexual chromosomes are presented. Sixty-three new karyotypes were published during this time, which represents an increase of 38%. However, only 14% of the Brazilian birds have their karyotypes described. Three Orders and 38 Families remain completely unknown, representing a vast field of work for the future.

KEY WORDS: Brazil, birds, cytogenetics, karyotypes.

RESUMO. A avifauna brasileira, com mais de 1700 espécies, representa uma das maiores do planeta. Com exceção das aves domésticas ou de interesse econômico é escasso o número de espécies analisadas citogeneticamente. Atualmente existem poucos grupos de pesquisadores que se dedicam a esta área da ciência, quando comparados com outros grupos de vertebrados. Diferentes razões são apontadas para justificar este fato, dentre elas ressaltam-se a dificuldade na amostragem e obtenção do material de estudo, elevado número diplóide, presença de poucos cromossomos de tamanho médio a grande (macrocromossomos) e muitos cromossomos diminutos (microcromossomos), entre outras. No presente trabalho foram revisadas as pesquisas citogenéticas realizadas com aves que apresentam distribuição geográfica no Brasil no período de 1992 a 2006, destacando-se o número cromossômico e localização centromérica dos cromossomos sexuais. Os resultados indicam que foram publicados os cariótipos de 63 novas espécies, o que representa um aumento de 38%, porém, no total de aves brasileiras, essa percentagem não atinge 14%. Permanecem, portanto, três Ordens e 38 Famílias de aves sem que qualquer representante tenha seu cariótipo descrito até o momento, existindo um vasto campo para o desenvolvimento de pesquisas nesta área.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, Brasil, citogenética, cariótipo.

A fauna e flora silvestres vêm sendo constantemente ameaçadas de extinção, sendo as aves um dos grupos mais atingidos. Várias são as causas desta perda de espécies, mas certamente um dos fatores mais importantes é a destruição dos habitats, que leva ao isolamento de populações cada vez menores, aumentando as chances de desaparecimento (Paiva 1999, Miyaki 2001, Marini e Garcia 2005, Olmos 2005).

Guyer (1902) foi o primeiro a realizar estudos citogenéticos em aves, analisando a espermatogênese de pombos normais e híbridos. Nos anos posteriores, até a década de 50, o número de publicações foi muito reduzido, descrevendo-se os cariótipos de 107 espécies. Para isto, utilizou-se material proveniente de cortes histológicos de tecido gonadal, os quais não permitiam uma identificação acurada do número e morfologia dos cromossomos (Giannoni *et al.* 1986).

Posteriormente, com a introdução de novas técnicas (como a cultura de linfócitos, bulbo de penas em crescimento e cultura de medula óssea) e com o tratamento dos tecidos com soluções hipotônicas e colchicina, foi possível melhorar consideravelmente a qualidade das preparações citogenéticas (Giannoni *et al.* 1986, Lucca e Rocha 1992). Porém, algumas particularidades dos cariótipos das aves, como o pequeno volume do genoma, a presença de um grande número de microcromossomos e de poucos macrocromossomos, além da reduzida variabilidade do cariótipo, têm sido obstáculos para que um maior número de pesquisadores tenha interesse pelo estudo

citogenético deste grupo animal. Isto é válido principalmente para as análises que visam relacionar cariótipos para o estudo de aspectos evolutivos, e que, portanto, exigem a aplicação de técnicas de bandeamento cromossômico (Tegeslöröm e Rytzman 1981, Tegeslöröm *et al.* 1983, Lucca e Rocha 1992).

A determinação das características cromossômicas representa uma importante ferramenta para planos de conservação *in situ* e *ex situ*, sendo também capaz de prover valiosas informações sobre a filogenia de espécies dentro de um grupo. Sua utilização tem contribuído para que se entenda o papel dos rearranjos cromossômicos na especiação; tem trazido esclarecimentos acerca da diferenciação dos cromossomos sexuais; tem auxiliado na identificação e caracterização de espécies consideradas crípticas e possibilita a identificação do sexo em espécies que não apresentam dimorfismo sexual (Benirschke *et al.* 1980, Lucca e Rocha 1992, Bed'Hom *et al.* 2003). O conhecimento da biologia básica da Classe Aves, que na atualidade inclui mais de 9000 espécies, é bastante incompleto, em especial no que se refere à sua genética e evolução (Pigozzi e Solari 2000).

O primeiro trabalho de revisão que reuniu uma listagem das espécies conhecidas cariotipicamente foi realizado por Bloom (1969), com 91 espécies. Em 1973, uma nova revisão incluindo dados citogenéticos de 83 espécies foi publicada por Ray-Chaudhuri. O número de espécies de aves estudadas dobrou na década de 70 devido ao aprimoramento das técnicas

Tabela 1. Número diplóide (2n), morfologia dos cromossomos sexuais Z e W e referências bibliográficas das aves brasileiras estudadas citogeneticamente no período de 1992 até o presente. A nomenclatura científica segue Sick (1997).

Table 1. Diploid number (2n), morphology of the sexual chromosomes Z and W, and references of the Brazilian birds cytogenetically studied from 1992 until the current days. The scientific nomenclature follows Sick (1997).

Espécie^a	2n	Z^b	W^b	Fonte
TINAMIFORMES				
Tinamidae				
<i>Tinamus solitarius</i> *	80	a	a	Belterman e De Boer 1990, Garnero <i>et al.</i> 2006
<i>Crypturellus tataupa</i>	78	a	a	Garnero <i>et al.</i> 2006
<i>Rhynchotus rufescens</i> *	78	t		Garnero e Gunski 2000, Moro <i>et al.</i> 1994, Giannoni <i>et al.</i> 1991
<i>Nothura maculosa</i>	78	t	a	Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005
RHEIFORMES				
Rheidae				
<i>Rhea americana</i>	80	a	a	Gunski e Giannoni 1998
SPHENISCIFORMES				
Spheniscidae				
<i>Spheniscus magellanicus</i> *	68	sm	sm	Ledesma <i>et al.</i> 2003b
CICONIIFORMES				
Ardeidae				
<i>Ardea cocoi</i> *	64			Oliveira <i>et al.</i> 2001
<i>Bubulcus ibis coromandus</i>	60	m	m	Mohanty e Bhunya 1990
<i>Syrigma sibilatrix</i> *	62			Oliveira <i>et al.</i> 2001
<i>Nycticorax nycticorax</i> *	64	sm	sm	Mohanty e Bhunya 1990
<i>Tigrisoma lineatum</i> *	72			Oliveira <i>et al.</i> 2001
Therestiornithidae				
<i>Platalea ajaja</i> *	72	m	t	Francisco e Galetti 2000
Ciconiidae				
<i>Mycteria americana</i> *	72	sm	t	Francisco e Galetti 2000
<i>Jabiru mycteria</i> *	56			Belterman e De Boer 1990

Espécie^a	2n	Z^b	W^b	Fonte
ANSERIFORMES				
Anatidae				
<i>Cygnus melancoryphus</i> *	78			Oliveira <i>et al.</i> 2001
<i>Sarkidiornis melanotos</i> *	80			Oliveira <i>et al.</i> 2001
FALCONIFORMES				
Accipitridae				
<i>Buteo swainsoni</i> *	68			Schmutz <i>et al.</i> 1993
<i>Buteo platypterus</i> *	68			Schmutz <i>et al.</i> 1993
<i>Parabuteo unicinctus</i> *	68			Schmutz <i>et al.</i> 1993
<i>Harpia harpyja</i>	58	sm	sm	Oliveira <i>et al.</i> 2005
Pandionidae				
<i>Pandion haliaetus</i> *	74	m	sm	Ryttman <i>et al.</i> 1987
Falconidae				
<i>Falco peregrinus</i> *	48			Schmutz e Oliphant 1987
<i>Falco columbarius</i>	40			Longmire <i>et al.</i> 1988
GALLIFORMES				
Cracidae				
<i>Penelope obscura</i> *	78	sm	t	Ledesma <i>et al.</i> 2003a
<i>Crax fasciolata</i> *	88	sm	t	Ledesma <i>et al.</i> 2003a
<i>Nothocrax urumutum</i> *	92			Oliveira <i>et al.</i> 2001
CHARADRIIFORMES				
Charadriidae				
<i>Pluvialis squatarola</i>	72	t	m	Bhunya e Mohanty 1990
<i>Pluvialis dominica fulva</i> *	78	t	st	Bhunya e Mohanty 1990
Laridae				
<i>Larus dominicanus</i> *	68	sm	sm	Ledesma <i>et al.</i> 2005

Espécie ^a	2n	Z ^b	W ^b	Fonte
PSITTACIFORMES				
Psittacidae				
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> *	70	m	sm	Lunardi <i>et al.</i> 2003
<i>Ara ararauna</i>	70	m	m	Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Ara macao</i>	70	m	m	Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Ara chloroptera</i> *	70			Francisco e Galetti 2001
<i>Propyrrhura maracana</i> *	70			Francisco e Galetti 2001
<i>Aratinga acuticaudata</i> *	70	m	sm	Goldschmidt <i>et al.</i> 1997
<i>Aratinga aurea</i>	70	st		Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Nandayus nenday</i> *	70			Francisco e Galetti 2001
<i>Pyrrhura molinae</i>	70	m	sm	Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Forpus xanthopterygius</i>	86	m	m	Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Brotogeris versicolurus</i>	82	m	m	Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Brotogeris sanctithomae</i>	72	m	m	Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Pionites leucogaster</i> *	70	m	t	Francisco <i>et al.</i> 2001
<i>Pionopsitta pileata</i> *	70	m		Francisco <i>et al.</i> 2001
<i>Graydidascalus brachyurus</i> *	64	sm	sm	Caparroz e Duarte 2004
<i>Pionus menstruus</i>	72	st		Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Pionus maximiliani</i>	72	sm	sm	Lucca <i>et al.</i> 1991, Caparroz e Duarte 2004
<i>Amazona pretrei</i> *	68-70			Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona autumnalis</i>	68-72	m	m	Duarte e Caparroz 1995, Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Amazona brasiliensis</i> *	70	m	m	Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona rhodocorytha</i> *	68-70	m	m	Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona festiva</i> *	68-70	m		Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona xanthops</i> *	68-70	sm	sm	Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona aestiva</i>	68-70	m	m	Aquino e Ferrari 1990, Duarte e Caparroz 1995, Schmutz e Prus 1987
<i>Amazona ochrocephala</i>	68-70	m		Duarte e Caparroz 1995, Lucca <i>et al.</i> 1991
<i>Amazona amazonica</i>	68-70	m	m	Aquino e Ferrari 1990, Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona farinosa</i> *	68-70	m		Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona kawalli</i> *	68-70	m	m	Duarte e Caparroz 1995
<i>Amazona vinacea</i> *	68-70	m	m	Duarte e Caparroz 1995

Espécie^a	2n	Z^b	W^b	Fonte
<i>Deroptyus accipitrinus</i> *	70	m	t	Lunardi <i>et al.</i> 2003
STRIGIFORMES				
Tytonidae				
<i>Tyto alba</i>	90-92	m	sm	Rebholz <i>et al.</i> 1993, Hassan 1998
Strigidae				
<i>Pulsatrix perspicillata</i>	76			Rebholz <i>et al.</i> 1993
<i>Speotyto cunicularia</i>	86			Rebholz <i>et al.</i> 1993
<i>Strix hylophila</i> *	80			Rebholz <i>et al.</i> 1993
<i>Asio flammeus</i>	82			Sasaki <i>et al.</i> 1994
CAPRIMULGIFORMES				
Caprimulgidae				
<i>Lurocalis semitorquatus</i> *	82			Francisco <i>et al.</i> 2006
<i>Chordeiles pusillus</i> *	68	sm	t	Nieto e Gunski 1998
<i>Caprimulgus rufus</i> *	78	m	m	Nieto e Gunski 1998
<i>Caprimulgus parvulus</i> *	72	sm	t	Nieto e Gunski 1998
<i>Hydropsalis brasiliiana</i> *	74	a	m	Nieto e Gunski 1998
APODIFORMES				
Apodidae				
<i>Streptoprocne biscutata</i> *	64			Ribeiro <i>et al.</i> 2003
<i>Streptoprocne zonaris</i>	66			Ribeiro <i>et al.</i> 2003
PICIFORMES				
Ramphastidae				
<i>Pteroglossus castanotis</i> *	86	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Pteroglossus aracari</i> *	62	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Selenidera maculirostris</i> *	98	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Bailloniuss bailloni</i> *	92	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Ramphastos vitellinus</i> *	102	st		Castro <i>et al.</i> 2002

Espécie^a	2n	Z^b	W^b	Fonte
<i>Ramphastos dicolorus</i> *	98	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Ramphastos tucanus cuvieri</i> *	88	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Ramphastos toco</i>	106	st		Castro <i>et al.</i> 2002
<i>Ramphastos ariel</i> *	106	st		Castro <i>et al.</i> 2002
PASSERIFORMES				
Formicariidae				
<i>Dysithamnus mentalis</i> *	76	st		Ledesma <i>et al.</i> 2002
<i>Pyriglena leucoptera</i> *	82	st		Ledesma <i>et al.</i> 2002
Tyrannidae				
<i>Elaenia parvirostris</i> *	78	a	a	Gunski <i>et al.</i> 2000
<i>Platyrinchus mystaceus</i> *	60	a	a	Gunski <i>et al.</i> 2000
<i>Empidonax traillii</i>	74	sm		Shields <i>et al.</i> 1987
<i>Cnemotriccus fuscatus</i> *	84	sm	a	Gunski <i>et al.</i> 2000
<i>Myiarchus ferox</i> *	76	sm	sm	Gunski <i>et al.</i> 2000
<i>Pitangus sulphuratus</i>	78	sm	a	Gunski <i>et al.</i> 2000
<i>Tyrannus savana</i> *	78	a	a	Gunski <i>et al.</i> 2000
<i>Tyrannus melancholicus</i>	78	sm	a	Gunski <i>et al.</i> 2000
Emberizidae				
<i>Oryzoborus maximiliani</i> *	72	sm	m	Goldschmidt <i>et al.</i> 2000
<i>Pheucticus aureoventris</i> *	78	sm	st	Ledesma <i>et al.</i> 2006
Ploceidae				
<i>Passer domesticus</i>	76	m	a	Hassan 1998

* Espécies descritas pela primeira vez no período de 1992 a 2006.

m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; a = acrocêntrico; st = subtelocêntrico.

* Species studied for the first time in the period from 1992 to 2006.

m = metacentric; sm = submetacentric; a = acrocentric; st = subtelocentric.

citogenéticas (Shields 1982). De Boer (1984) publicou uma listagem com dados de 587 espécies, sendo 385 não Passeriformes e 202 Passeriformes, referentes a um total de 256 trabalhos. Capanna *et al.* (1987) relacionaram dados referentes a 484 espécies pertencentes a 28 Ordens.

No Brasil, o trabalho pioneiro sobre citogenética de Aves foi realizado em 1965 pela Dra. Margarida Lopes de Aguiar, intitulado “*Técnicas de cultura de tecidos para estudo dos cromossomos em aves*”. O Prof. Dr. Edmundo José De Lucca da UNESP de Botucatu, SP, realizou uma importante contri-

buição através de um número expressivo de publicações e, em co-autoria com o Prof. Dr. Guaracy T. Rocha, da mesma instituição, apresentaram em 1992 a primeira revisão sobre as espécies de aves brasileiras analisadas citogeneticamente. Este trabalho incluiu 165 espécies, pertencentes a 17 Ordens e 43 Famílias, o que representa 10% do total das espécies que ocorrem no país, número este pouco representativo diante da quantidade de espécies conhecidas.

O presente trabalho teve como objetivo relacionar as publicações sobre citogenética de aves, que apresentam distribuição geográfica no Brasil, realizadas posteriormente à revisão de Lucca e Rocha (1992), visando facilitar a escolha de grupos e espécies em posteriores estudos citogenéticos e enumerar a quantidade aproximada de espécies estudadas citogeneticamente até o momento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram reunidas as publicações sobre citogenética de aves brasileiras realizadas posteriormente ao trabalho de Lucca e Rocha (1992) até o presente momento, listando-se todas as espécies estudadas, tendo o cariótipo sido descrito pela primeira vez ou não. Foram ressaltados o número diplóide e a localização centromérica dos cromossomos sexuais. Resumos apresentados em congressos não foram considerados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 40 trabalhos publicados, 93 espécies foram estudadas, porém somente 63 tiveram seu cariótipo descrito pela primeira vez (Tabela 1), o que representa um aumento de 38% com relação aos dados de Lucca e Rocha (1992). Entretanto, o total de aves brasileiras cariotipadas não atinge 14%.

A ordem Psittaciformes foi a que apresentou o maior número de cariótipos descritos (17). As análises citogenéticas têm sido utilizadas para elucidar relações filogenéticas entre os Psittacidae com grau variável de sucesso (Lucca 1984, Aquino e Ferrari 1990, Belterman e De Boer 1990, Christidis *et al.* 1991, Lucca *et al.* 1991, Duarte e Caparroz 1995, Caparroz e Duarte 2004). Duarte e Caparroz (1995) estudaram os cariótipos de 12 espécies pertencentes ao gênero *Amazona* e puderam confirmar a não inclusão de *A. xanthops* neste gênero, sugerindo seu retorno para o gênero *Salvatoria*. Esta decisão pôde ser justificada pelo conservadorismo cromossômico observado no gênero *Amazona*, pelas diferenças no padrão cromossômico geral em relação aos outros Psittacidae e mudanças que podem ser explicadas por uma separação muito antecipada na árvore evolutiva da Família Psittacidae. Recentemente, Caparroz e Duarte (2004) encontraram similaridade cromossômica entre *Pionus maximiliani*, *Graydidascalus brachyurus* e *Salvatoria xanthops* e sugeriram que *G. brachyurus* e *S. xanthops* sejam espécies irmãs e possuam uma forte relação com o gênero *Pionus*.

Francisco *et al.* (2001), Francisco e Galetti (2001) e Lunardi *et al.* (2003), analisando representantes da tribo Arine

(que reúne todos os Psittacidae brasileiros), revelaram uma notável dicotomia na estrutura dos cariótipos, a qual sustenta a existência de dois grupos monofiléticos distintos dentro desta tribo, como previamente sugerido por análises de mtDNA (Miyaki *et al.* 1998). A manutenção de um número diplóide de $2n = 70$ em muitas espécies de psitacídeos Neotropicais parece apoiar a hipótese de que o principal mecanismo evolutivo que tem levado à diversificação cariotípica dentro do grupo tem sido inversões pericêntricas e/ou translocações, as quais não implicam em mudanças no número diplóide. Contudo, recentemente, Ledesma *et al.* apresentaram no II Simpósio de Genética de Aves (UFSCar-SBG 1 a 3/06/2005) dados referentes às espécies *Ara ararauna*, *A. macao*, *A. chloroptera*, *A. rubrogenys*, *A. glaucogularis* e um híbrido de *Ara* (*Ara macao* x *Ara Catalina*), todos com $2n = 64$ cromossomos, o que difere dos trabalhos previamente publicados que relataram $2n = 70$ para o gênero. As aves com $2n = 64$ pertencem a populações com distribuição na Bolívia, enquanto as que apresentaram $2n = 70$ são muito provavelmente provenientes de populações brasileiras. Portanto, estudos que incluam um número expressivo de indivíduos com procedência conhecida serão necessários para se determinar a natureza destas diferenças.

A Ordem Piciformes teve nove espécies analisadas, todas pertencentes à Família Ramphastidae, destacando-se neste grupo, o reduzido número diplóide de *Pteroglossus aracari* ($2n = 62$). Isto sugere as fusões em *tandem* como mecanismo evolutivo, com efeito na redução do número cromossômico (Castro *et al.* 2002).

Entre os Passeriformes, a Família Tyrannidae, uma das mais numerosas e complexas do ponto de vista taxonômico, apresentou cinco novas espécies estudadas, que evidenciaram uma grande variabilidade numérica e morfológica, tanto nos cromossomos sexuais quanto nos autossomos, representando assim um dos grupos de maior interesse para estudos citogenéticos futuros (Gunski *et al.* 2000).

Com base na análise sequencial Giemsa/Banda-C/NOR, Gunski e Giannoni (1998) propuseram um novo número diplóide para *Rhea americana* ($2n = 80$). Isto porque as Regiões Organizadoras de Nucléolo foram identificadas num par de microcromossomos que apresentou uma considerável constrição secundária, a qual pode ter induzido erros de contagem quando os cariótipos foram analisados apenas com coloração convencional. Trabalhos prévios apontaram $2n = 82$ para esta espécie (Takagi *et al.* 1972, Takagi e Sasaki 1974, Ansari *et al.* 1988), demonstrando a necessidade de se utilizar técnicas de coloração diferencial na análise cariotípica das aves, preferencialmente em forma sequencial, para uma correta identificação dos menores elementos do complemento.

A ordem Tinamiformes tem sido estudada por diversos autores. Garner e Gunski (2000) estudaram duas espécies da família Tinamidae (*Nothura maculosa*, 3♀ e 2♂ e *Rynchotus rufescens* 3♂) e observaram a presença de polimorfismo num exemplar de *N. maculosa*. Os cariótipos destas duas espécies apresentaram o mesmo número diplóide ($2n = 78$), diferenciando-se apenas pelos padrões de bandeamento C do primei-

ro e segundo pares. A análise seqüencial Giemsa–NOR, realizada por Moro *et al.* (1994), permitiu a identificação do par cromossômico nove de *R. rufescens* como o responsável pela organização do nucléolo.

Nos achados de Francisco e Galetti (2000), o cariótipo de *Mycteria americana* foi idêntico ao de *M. cinerea*, e a morfologia dos macrocromossomos mostrou-se similar à de outros Ciconiidae previamente estudados. Segundo Belterman e De Boer (1990), o complemento cromossômico de *M. cinerea* poderia representar um cariótipo ancestral dos ciconídeos. Neste grupo, a redução do número de microcromossomos não foi acompanhada por um aumento no número de macrocromossomos, e aparentemente foi resultante da perda de microcromossomos (Belterman e De Boer 1990).

De acordo com Francisco e Galetti (2000), *Platalea ajaja* (Threskiornithidae) apresenta um cariótipo similar a *Eudocimus ruber* e *Threskiornis aethiopica*, estudados por Takagi e Sasaki (1974). Rearranjos cromossômicos parecem ser muito mais freqüentes entre os Threskiornithidae do que entre os Ciconiidae. Desta forma, a evolução cromossômica destes dois grupos parece ser mediada por mecanismos distintos, muito embora ambas as famílias possam ser parte de um único grupo maior de Ciconiformes.

Ledesma *et al.* (2003b), ao estudar o cariótipo de *Spheniscus magellanicus*, comparou seus dados com os de três espécies de pingüins analisadas anteriormente e estabeleceu que a principal diferença entre eles é encontrada no número de microcromossomos. Variações na posição dos centrômeros foram também observadas nos macrocromossomos, sendo provavelmente resultantes de inversões pericêntricas. A partir do bandejamento C, foi possível observar para *S. magellanicus* a existência de uma elevada quantidade de heterocromatina no cromossomo W e nas regiões centroméricas dos autosomos, característica compartilhada com as espécies do gênero *Pygoscelis* (Delgado-Cañedo *et al.* 1999). Estudos que incluam espécies do gênero *Eudyptes* seriam de grande importância para se comprovar a elevada homologia cromossômica observada até o momento neste grupo de aves.

As cinco espécies analisadas pertencentes à ordem Caprimulgiformes mostraram em geral cariótipos com um predomínio de cromossomos acrocêntricos e telocêntricos nos pares maiores, enquanto que nos pares de menor tamanho foram observados cromossomos acrocêntricos e metacêntricos. Destaca-se nestas aves a morfologia metacêntrica do oitavo par nas cinco espécies analisadas, mostrando ser conservado ao longo do processo evolutivo. *Caprimulgus parvulus* não se ajusta a estas características por apresentar os dez pares de macrocromossomos metacêntricos ou submetacêntricos, o que pode sugerir uma maior freqüência de rearranjos, como inversões pericêntricas ou fusões cêntricas. Uma condição comum observada nas aves deste grupo é a ausência de heterocromatina constitutiva na grande maioria dos cromossomos do complemento (Nieto e Gunski 1998).

Os dados aqui apresentados contrapõem-se à visão tradicional de uma reduzida variabilidade no cariótipo das aves

(Tegelström e Rytman 1981, Srb 1985). No entanto, o pequeno incremento no número de aves cariotipadas na última década, a falta de estudos aprofundados com técnicas de bandejamento cromossômico, e de forma geral, o baixo número de exemplares utilizados nas pesquisas, incidem negativamente no crescimento desta área da ciência. Assim, no Brasil permanecem ainda três Ordens e 38 Famílias de aves sem que qualquer representante tenha seu cariótipo descrito.

Estudos futuros poderão contribuir para uma maior elucidação das relações citotaxonômicas dos diferentes grupos, bem como na identificação e preservação de populações ameaçadas ou geneticamente divergentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biologia e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, M. L. R. (1965) Técnicas de cultura de tecidos para estudo dos cromossomos em aves. *Cienc. Cult.* 17:587-590.
- Ansari, H. A., N. Takagi e M. Sasaki (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:185-188.
- Aquino, R. e I. Ferrari (1990) Chromosome study of *Amazona amazonica* and *A. aestiva* (Aves: Psittaciformes): determination of chromosome number and identification of sex chromosomes by C-banding method. *Genetica* 81:1-3.
- Bed'Hom, B., P. Coullin, Z. Guillier-Gencik, S. Moulin, A. Bernheim e V. Volobouev (2003) Characterization of the atypical karyotype of the black-winged kite *Elanus caerulus* (Falconiformes: Accipitridae) by means of classical and molecular techniques. *ChromosomeResearch* 11:335-343.
- Belterman, R. H. R. e L. E. M. De Boer (1990) A miscellaneous collection of bird karyotypes. *Genetica* 83:17-29.
- Benirschke, K., B. Lasley e O. Ryder (1980) The technology of captive propagation, p. 225-242. *Em: M. E. Soulé, B. A. Wilcox (eds.) Conservation Biology – An Evolutionary-Ecological Perspective.* Massachusetts: Sinauer Associates and INC Publisher.
- Bhunya, S. P. e M. K. Mohanty (1990) Chromosome evolution in two families of Charadriiform birds. *Caryologia* 43:79-85.

- Bloom, S. E. (1969) A current list of chromosome numbers and variations for species of the avian subclass Carinatae. *J. Hered.* 60:217-220.
- Capanna, E., M. Civitelli e E. I. Martinico (1987) I Cromosomi degli uccelli. Citotassonomia ed evoluzione cariotipica. *Avocetta* 11:101-143.
- Caparroz, R. e J. M. B. Duarte (2004) Chromosomal similarity between the Scaly-headed parrot (*Pionus maximiliani*), the short-tailed parrot (*Graydidascalus brachyurus*) and the yellow-faced parrot (*Salvatoria xanthops*) (Psittaciformes: Aves): A cytotaxonomic analysis. *Genetics and Mol. Biol.* 27:522-528.
- Castro, M. S., S. M. Recco-Pimentel e G. T. Rocha (2002) Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). *Genetics and Mol. Biol.* 25:147-150.
- Christidis, L., D. D. Shaw e R. Schodde (1991) Chromosomal evolution in parrots, lorikeets and cockatoos (Aves: Psittaciformes). *Hereditas* 114:47-56.
- De Boer, L. E. M. (1984) New developments in vertebrate cytotaxonomy. VIII. A current list of references on avian Karyology. *Genetica* 65:3-37.
- Delgado-Cañedo, A., R. J. Gunski, D. Montalti, G. Leotta e M. A. Ledesma (1999) Estudo Citogenético do gênero *Pygoscelis* (Aves: Spheniscidae). *Genetics and Mol. Biol.* v.22. 3:55. Supplement.
- Duarte, J. M. B. e R. Caparroz (1995) Cytotaxonomic analysis of Brazilian species of the genus *Amazona* (Psittacidae, Aves) and confirmation of the genus *Salvatoria* (Ribeiro, 1920). *Braz. J. Genet.* 18:623-628.
- Francisco, M. R. e P. M. Galetti Junior. (2000) First karyotypic description of two American Ciconiiform birds, *Mycteria americana* (Ciconiidae) and *Platalea ajaja* (Threskiornithidae) and its significance for the chromosome evolutionary and biological conservation approaches. *Genetics and Mol. Biol.* 23:799-801.
- ____ e ____ (2001) Cytotaxonomic considerations on Neotropical Psittacidae birds and description of three new Karyotypes. *Hereditas* 134:225-228.
- ____ V. O. Lunardi e P. M. Galetti Junior (2001) Chromosomal Evidences of Adaptive Convergence in the Tail Morphology of Neotropical Psittacidae (Aves, Psittaciformes). *Cytologia* 66:329-332.
- ____ V. O. Lunardi, C. Garcia e P. M. Galetti Junior (2006) Karyotype description of the Semicollared nighthawk, *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae), and cytotaxonomic considerations on Caprimulgiformes. *Rev. Bras. de Ornitol* 14:63-65.
- Garnero, A. Del. V. e R. J. Gunski (2000) Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *The nucleus* 43:64-70.
- ____, M. A. Ledesma e R. J. Gunski (2006) Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). *Rev. Bras. de Ornitol.* 14:53-58
- Giannoni, M. L., M. A. Giannoni e I. Ferrari (1986) *Citogenética aplicada às aves*. Piracicaba: FEALQ.
- ____, J. M. B. Duarte, M. E. G. Moro e J. Boer (1991) Cytogenetic research in wild animals at FCAVJ, Brazil. II. Birds. *Genet. Sel. Evol.* 23:123-125.
- Goldschmidt, B., D. M. Nogueira, D. W. Monsoreo e L. M. Souza (1997) Chromosome study in two *Aratinga* species (*A. guarouba* and *A. acuticaudata*) (Psittaciformes). *Braz. J. Genet.* 20:1-6.
- ____, D. M. Nogueira, K. P. A. Silva e L. M. Souza (2000) Study of the karyotype of *Oryzoborus maximiliani* (Passeriformes – Aves) using young feather pulp cultures. *Genetics and Mol. Biol.* 23:371-373.
- Gunski, R. J. e M. L. Giannoni (1998) Nucleolar organizer and a new chromosome number for *Rhea americana* (Aves: Rheiformes). *Genetics and Mol. Biol.* 21:207-210.
- ____, G. S. Cabanne, M. A. Ledesma e A. Del. V. Garnero (2000) Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). *Hornero* 15:103-109.
- Guyer, F. M. (1902) Spermatogenesis of normal and hybrid pigeons. *Bull. Univ. Cincinnati* 21 Ser. 2 Vol. 2.
- Hassan, H. A. (1998) Karyological studies on six species of birds. *Cytologia* 63:349-363.
- Ledesma, M. A., A. Del. V. Garnero e R. J. Gunski (2002) Análise do cariótipo de duas espécies da família Formicariidae (Aves, Passeriformes). *Ararajuba* 10:15-19.
- ____, ____ e ____ (2003a) Karyological description and comparison of *Crax fasciolata* and *Penelope obscura* (Aves: Cracidae). *Bulletin of the IUCN/Bird life* 17:18-24.
- ____, T. R. O. Freitas, J. Da Silva, F. Da Silva e R. J. Gunski (2003b) Descripción cariotípica de *Spheniscus magellanicus* (Spheniscidae). *Hornero* 18:61-64.
- ____, D. E. Cardozo, D. Montalti, G. A. Leotta e R. J. Gunski (2005) Estudios Citogenéticos en Tres Especies de Aves Antárticas. *Revista de Ciencia y Tecnologia* 7:68-72.
- ____, P. A. Martinez, P. L. Calderón, J. M. Boeris e J. M. Meriles (2006) Descrição do cariótipo e padrões de Nor em

- Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae). *Rev. Bras. de Ornitol.* 14:59-62.
- Longmire, J. L., A. K. Lewis, N. C. Brown, J. M. Buckingham, L. M. Clark, M. D. Jones, L. J. Meincke, J. Meyne, R. L. Ratliff, F. A. Ray, R. P. Wagner e R. R. Moyzis (1988) Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family falconidae. *Genomics* 2:14-24.
- Lucca, E. J. (1984) A comparative study of the chromosomes in 5 species of birds from the genus *Aratinga*. *Cytologia* 49:537-545.
- _____, e G. T. Rocha (1992) Citogenética de Aves. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi. ser. Zool.* 8:33-67.
- _____, L. R. Shirley e C. Lanier (1991) Karyotype studies in twenty-two species of parrots (Psittaciformes: Aves). *Rev. Brasil. Genet.* 14:73-98.
- Lunardi, V. O., M. R. Francisco, G. T. Rocha, B. Goldschmidt e P. M. Galetti Junior (2003) Karyotype description of two Neotropical Psittacidae species: the endangered Hyacinth macaw, *Anodorhynchus hyacinthinus*, and the Hawk-headed Parrot, *Derophtus accipitrinus* (Psittaciformes: Aves), and its significance for conservation plans. *Genetics and Mol. Biol.* 26:283-287.
- Marini, M. A. e F. I. Garcia (2005) Bird Conservation in Brazil. *Cons. Biol.* 19:665-671.
- Miyaki, C. Y. (2001) Genética e evolução aplicada à conservação, p. 239-246. In: J. L. B. Albuquerque; J. F. Cândido Jr.; F. C. Straube e A. L. Roos (eds) *Ornitologia e Conservação. Da Ciência às Estratégias*. Tubarão: Editora Unisul.
- _____, S. R. Matioli, T. Burke e A. Wajntal (1998) Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence. *Mol. Biol. Evol.* 15:544-551.
- Mohanty, M. K. e S. P. Bhunya (1990) Karyological studies in four species of ardeid birds (Ardeidae, Ciconiiformes). *Genetica* 81:211-214.
- Moro, M. E. G., M. L. Giannoni, J. A. Boer e P. A. Tosta (1994) Study of the *Rhynchotus rufescens* – Red-Winged Tinamou (Aves: Tinamiformes) Raised in captivity II. Cytogenetic. *ARS Veterinaria* 10:41-49.
- Nieto, L. M. e R. J. Gunski (1998) Estudios Cromosômicos en atajacaminos (Aves, Caprimulgidae). *Bol. Soc. Biol. Concepcion, Chile* 69:161-169.
- Oliveira, M. D., W. Jorge e C. P. Barezani (2001) Chromosome study in 6 Brazilian birds. *Caryologia* 3:235-244.
- Oliveira, E. H. C., F. A. Habermann, O. Lacerda, I. J. Sbalqueiro, J. Wienberg e S. Müller (2005) Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (*Harpy eagle, Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma* 114:338-343.
- Olmos, F. (2005) Aves ameaçadas, prioridades e políticas de conservação no Brasil. *Natureza e Conservação* 3:21-42.
- Paiva, M. P. (1999) *Conservação da fauna Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- Pigozzi, M. I. e A. J. Solari (2000) Los Cromosomas sexuales y la evolución de las Aves. *Ciencia Hoy* 10:42-50.
- _____, e _____ (2005) Meiotic recombination in the ZW pair of a tinamid bird shows a differential pattern compared with neognaths. *Genome* 48:286-290.
- Ray-Chaudhuri, R. (1973) Cytotaxonomy and chromosome evolution in birds, p. 425-483. Em: A. B. Chiarelli, E. Capanna (eds.) *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. London: Academic Press.
- Rebholz, W. E. R., L. E. M. De Boer, M. Sasaki, R. H. R. Belterman e C. Nishida-Umehara (1993) The Chromosomal Phylogeny of Owls (Strigiformes) and new karyotypes of seven species. *Cytologia* 58:403-416.
- Ribeiro, J., R. A. Torres, M. L. Adam e D. A. Cornélio (2003) Cytotaxonomic diagnoses of two Neotropical swift species: *Streptoprocne biscutata* and *Streptoprocne zonaris* (Aves: Apodidae). *Zootaxa* 224:1-7.
- Ryttman, H., H. Tegelstrom, K. Fredga e J. Sondell (1987) The karyotype of the osprey, *Pandion haliaetus* (Aves: Falconiformes). *Genetica* 74:143-147.
- Sasaki, M., C. Nishida-Umehara e K. Tsuchiya (1994) A Comparative Study of G – banded karyotypes in eight species of owls. *Cytologia* 59:183-185.
- Schmutz, S. M. e L. W. Oliphant (1987) Chromosome study of Peregrine, Prairie and Gyrfalcons with implications for hybrids. *J. hered.* 78:388-390.
- _____, e S. E. Prus (1987) A cytogenetic study of four species of cockatoos and amazon parrots. *Genetica* 74:69-71.
- _____, J. S. Moker e T. D. Thue (1993) Chromosomes of five North American Buteonine Hawks. *J. Raptor Res.* 27:196-202.
- Shields, G. F. (1982) Comparative Avian Cytogenetics: A Review. *Condor* 84:45-58.
- _____, J. C. Barlow e R. D. James (1987) Karyotypes of five species of *Empidonax flycatchers*. *Wilson Bull.* 99:169-174.

- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira.
- Srb, V. (1985) Birds and Comparative Cytogenetics. *The nucleus* 28:96-98.
- Takagi, N., M. Itoh e M. Sasaki (1972) Chromosome studies in four species of ratitae (Aves). *Chromosoma* 36:281-291.
- _____ e M. Sasaki (1974) A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma* 46:91-120.
- Tegelström, H. e H. Rytman (1981) Chromosomes in birds (aves): evolutionary implications of macro and microchromosomes numbers and lengths. *Hereditas* 94:225-233.
- _____, T. Ebenhard e H. Rytman (1983) Rate of karyotype evolution and speciation in birds. *Hereditas* 98:235-239.

Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas

Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira^{1,3}, Marcella Mergulhão Tagliarini², Cleusa Yoshiko Nagamachi¹ e Julio César Pieczarka¹

¹ Laboratório de Citogenética, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, 66075-990, Rua Augusto Correa, n.º 01, Belém, PA, Brasil. E-mail: ehco@ufpa.br

² Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

³ Autor para Correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 05 de janeiro de 2006

ABSTRACT. Genomic comparison in birds using chromosome-specific probes. Advances in molecular cytogenetics with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and flow sorting of chromosomes provided a breakthrough for comparative chromosome studies in avian species. The chicken provides a “default map” for various birds. Recent chromosome painting studies in birds with chicken chromosome-specific DNA probes have demonstrated chromosome homeologies and interchromosomal rearrangements between chicken and various species belonging to different orders. The most dramatic changes in the genomic reorganization was observed in the comparison between chicken, which presents a typical bird karyotype, and the harpy eagle, with a derived karyotype like other birds of prey. The data showed how the organization into micro- and macrochromosomes has been lost in the harpy eagle, seemingly without any preference or constraints. In face of this important new technology, we discuss the results already published, and the use of chromosomal data in phylogenetic analysis as a powerful tool.

KEY WORDS: FISH, chromosomal rearrangements, phylogenomics, karyotype variation.

RESUMO. Os avanços na citogenética molecular com a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e separação de cromossomos por citometria de fluxo trouxeram um grande avanço em estudos cromossômicos comparativos entre espécies de Aves. Desde então, o galo doméstico é considerado um “mapa padrão” para várias aves. Estudos recentes de pintura cromossômica demonstraram homeologias cromossômicas e rearranjos intercromossômicos entre o galo e várias espécies pertencentes a diferentes ordens. As mudanças mais dramáticas na reorganização genômica foram observadas entre o galo, que apresenta o cariótipo padrão das aves, e a harpia, que apresenta um cariótipo derivado, como outras aves de rapina. Os dados mostraram como a organização em micro e macrocromossomos foi perdida na harpia, aparentemente sem uma direção definida. Em face da importância dessa nova tecnologia, o presente trabalho discute os resultados já publicados e o uso dos dados cromossômicos em análises filogenéticas como uma poderosa ferramenta.

PALAVRAS-CHAVE: FISH, rearranjos cromossômicos, filogenômica, variação cariotípica.

CONSIDERAÇÕES GERAIS: CITOGENÉTICA CLÁSSICA EM AVES

A cariotipagem de uma espécie é fundamental para qualquer metodologia de mapeamento gênico, já que tanto mapas gênicos como físicos são feitos com referência à posição cromossômica. Um cariótipo traz muitas informações sobre características genéticas de um animal ou linhagem celular. Esses aspectos podem ser relacionados a doenças, infertilidade ou gênese de tumores (Masabanda *et al.* 2004). Além disso, a detecção de rearranjos cromossômicos fornece importantes dados que podem ser utilizados em análises filogenéticas (Pieczarka e Nagamachi 2004).

A citogenética comparativa iniciou-se nos anos 60, com a aplicação da coloração convencional, método no qual os cromossomos são corados uniformemente. Os cariótipos eram comparados baseando-se no número total de cromossomos e na posição do centrômero, que distingue os cromossomos morfológicamente. Nessa época, já foi observado que o complemento cromossômico das espécies de Aves analisadas era bastante peculiar, diferindo do cariótipo dos mamíferos por apresentar-se bimodal, ou seja, formado por dois grupos distintos de cromossomos – macrocromossomos, de maior tamanho, com cerca de oito a dez pares, e microcromossomos, puntiformes e muito numerosos, em torno de 25-35 pares (Figura 1). Em contraste, os mamíferos apresentam cariótipos caracterizados por uma diminuição gradual do tamanho dos

cromossomos, com poucos cromossomos tão pequenos como os microcromossomos das aves.

Apesar das Aves apresentarem um número de espécies estimado em 9,7 mil no mundo e mais de 1500 só no Brasil (Silva 1998), há uma defasagem em estudos citogenéticos nesse grupo quando comparado a outros vertebrados, como mamíferos e peixes. Segundo de Oliveira e Jorge (2000), isto se deve não só às características peculiares do cariótipo das aves e às dificuldades técnicas delas decorrentes, mas também ao pouco investimento pessoal e financeiro nesta área de estudo. Estima-se que apenas 10% das espécies de aves brasileiras tenham seus cariótipos conhecidos (de Lucca e Rocha 1992). Infelizmente, este percentual ainda não sofreu alteração significativa, e reflete também a realidade quando consideramos o total de espécies de Aves existentes.

A aplicação de técnicas de coloração diferencial, como os bandeamentos cromossômicos, trouxe uma caracterização mais detalhada do cariótipo, com identificação individual dos pares cromossômicos, distribuição de segmentos heterocromáticos, localização dos genes para RNA ribossômico e uma melhor compreensão da estrutura cromossômica. Os bandeamentos cromossômicos permitem a detecção e interpretação de rearranjos cromossômicos, auxiliando no estabelecimento de relações cariotípicas e filogenéticas entre as espécies. Entretanto, poucas das espécies de Aves analisadas apresentam dados de bandeamentos, tais como bandeamentos G, C e NOR. Um maior número de dados citogenéticos permitiria

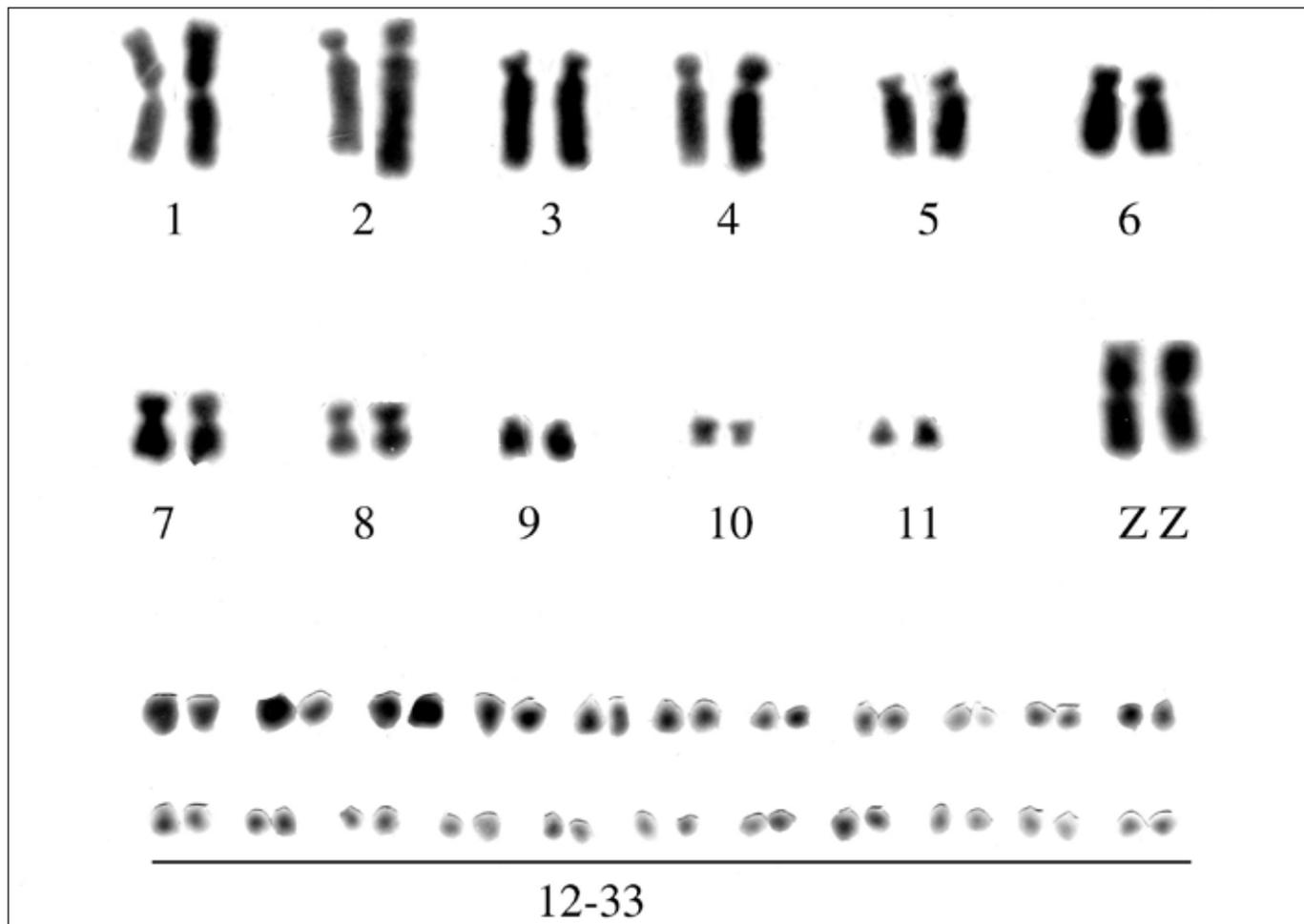


Figura 1. Cariótipo de arara-vermelha-grande (*Ara chloroptera*) em coloração convencional, exemplificando o cariótipo típico observado na maioria das aves já analisadas citogeneticamente. Esse cariótipo é bimodal, com dois grupos distintos de cromossomos: macrocromossomos (1-11 e o par sexual) e microcromossomos. Essa metáfase apresentou 68 cromossomos, porém o número diplóide dessa espécie ainda apresenta controvérsias. Devido ao pequeno tamanho dos microcromossomos, alguns deles podem se perder durante a preparação da lâmina.

Figure 1. Karyotype of *Ara chloroptera* obtained with conventional Giemsa staining, depicting a typical bird karyotype. This karyotype is bimodal, presenting two distinct groups of chromosomes: the macrochromosomes (1-11 and the sexual pair) and the microchromosomes. The metaphase here presented showed 68 chromosomes, however, the diploid number of this species is still controversial. Because of the small size of the microchromosomes, some of them can be lost during the preparation of the slides.

a análise mais pormenorizada dos mecanismos envolvidos na diferenciação cromossômica nesse grupo. Além disso, já se observou que, mesmo com o baixo número de espécies analisadas, certos grupos têm mostrado uma razoável variação cromossômica, o que poderia encorajar a aplicação de estudos citogenéticos mais refinados. A detecção de rearranjos cromossômicos é importante não só para o entendimento da reorganização genômica dos diferentes grupos a partir de um cariótipo ancestral, mas também em análises filogenéticas, já que representam caracteres muitas vezes exclusivos de um determinado grupo, agindo assim como sinapomorfias em análises cladísticas.

Um exemplo da aplicação de dados cromossômicos no entendimento da evolução cariotípica e filogenia de Aves foi apresentado por Bed'Hom (1999). Esse autor analisou o cariótipo de diversas aves de rapina, através de técnicas de citogenética clássica e molecular, e propôs teorias interessantes sobre o índice de rearranjos cromossômicos, além de apresentar o padrão de bandejamento G, distribuição de blocos

heterocromáticos e localização das regiões organizadoras de nucléolo. É importante ressaltar que as aves de rapina, especialmente os Accipitridae, vêm sendo objeto de diferentes estudos citogenéticos, principalmente devido às peculiaridades de seus cariótipos, que apresentam números cromossômicos relativamente mais baixos que outras aves, além da presença de poucos pares de microcromossomos. O autor constatou que a diminuição média do número diplóide de Accipitridae ($2n$ médio = 66) e outras aves ($2n$ médio = 80) é de 14 pares, enquanto o número fundamental, ou seja, o número de braços cromossômicos, é em média $NF = 105$ e $NF = 92$, respectivamente, e sugeriu não só a ocorrência de diversas translocações, como também de inversões pericêntricas.

CITOGENÉTICA MOLECULAR

O desenvolvimento de novas metodologias em seqüenciamento de DNA, mapeamento gênico e análise cromossômica permitiram um grande avanço na compreensão da organiza-

ção, estrutura e evolução do complemento cromossômico. As técnicas de hibridização *in situ* permitiram uma ligação entre os dados moleculares de seqüências de DNA e a citogenética, podendo ser utilizadas no mapeamento físico dessas seqüências e na identificação e caracterização de cromossomos ou segmentos cromossômicos (Schwarzacher e Heslop-Harrison 2000). Pela comparação da ordem e seqüência de genes em diferentes genomas, é possível traçar os caminhos evolutivos tomados pelo ancestral desses grupos. O potencial dessas metodologias é bem ilustrado em trabalhos publicados principalmente em mamíferos (revisão em Chowdhary e Raudsepp 2001, Alkalaeva *et al.* 2002), dentre os quais podemos destacar as análises em primatas, que já incluem um grande número de espécies analisadas (revisão em Pieczarka e Nagamachi 2004).

Uma das técnicas mais importantes é a pintura cromossômica comparativa (ZOO-FISH). Essa técnica consiste na separação individual de cromossomos por citometria de fluxo e posterior produção de sondas marcadas por fluorocromos. As sondas são utilizadas em experimentos de hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos de outras espécies, permitindo a identificação exata de cromossomos ou segmentos cromossômicos entre espécies filogeneticamente distantes. Os expe-

rimentos podem utilizar uma única sonda, ou diversas sondas marcadas com fluorocromos diferentes, e que serão distinguidas pelas suas cores.

A PINTURA CROMOSSÔMICA EM AVES

A pintura cromossômica comparativa em Aves poderá superar as limitações impostas pelas características do seu cariótipo, pois, devido ao seu pequeno tamanho, um grande número de microcromossomos não apresenta padrões de bandeamento que permitam a comparação e análise de homeologias. Poucos artigos com aplicação de sondas cromossomo-específicas em aves foram publicados nos últimos anos, explorando diferentes abordagens evolutivas, tais como mecanismos de diversificação cromossômica (Shetty *et al.* 1999, de Oliveira *et al.* 2005), filogenia (Shibusawa *et al.* 2004a, b), diferenciação dos cromossomos sexuais (Graves e Shetty 2001), e mapeamento cromossômico (Masabanda *et al.* 2004), entre outros.

Até o momento, foram utilizadas sondas de uma única espécie (*Gallus gallus*) nas comparações cromossômicas entre aves. Essa espécie apresenta o mapeamento gênico bem desenvolvido. A aplicação de sondas cromossomo-específicas dos macrocromossomos de *Gallus* em emu (*Dromaius nova-*

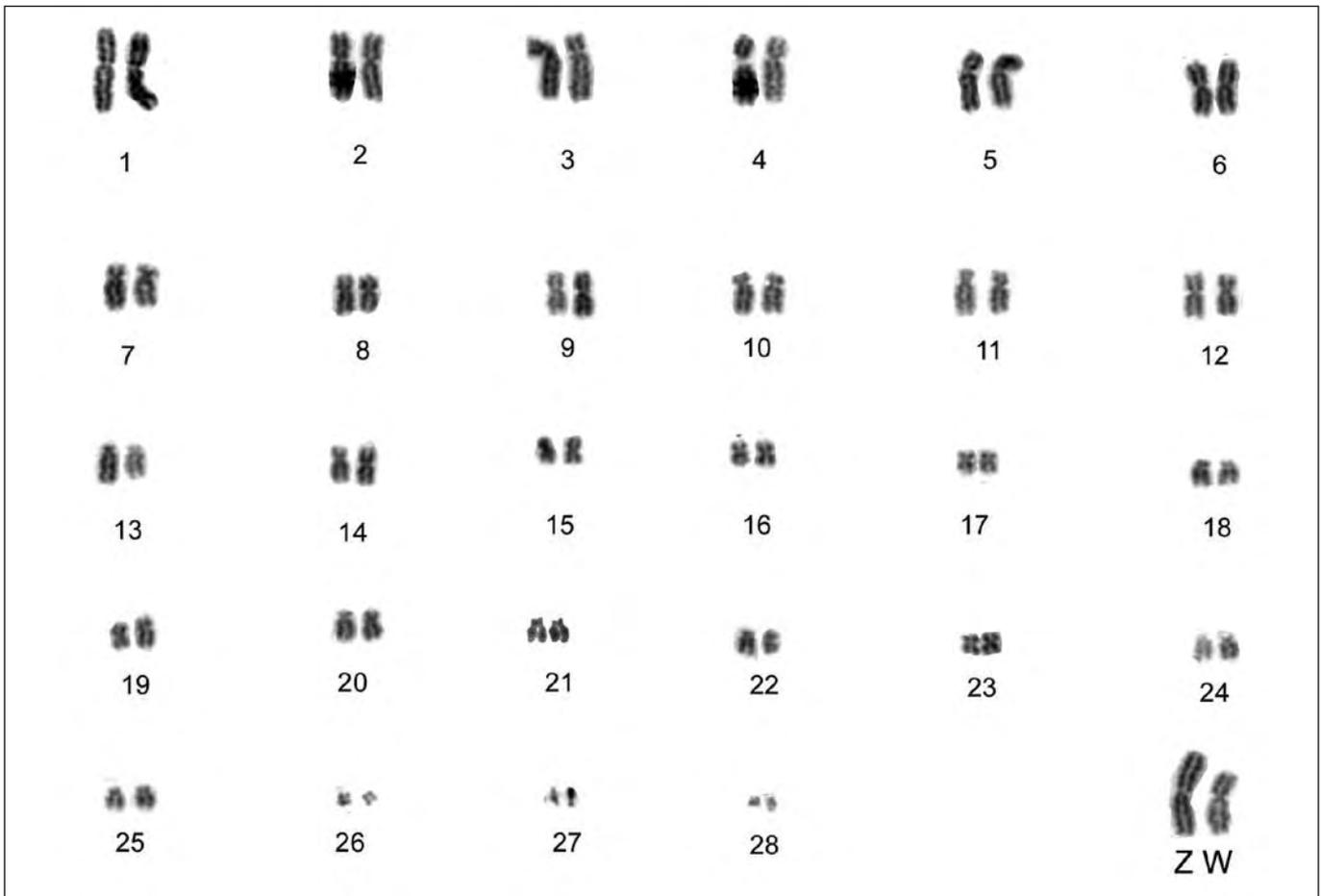


Figura 2. Cariótipo de harpia (*Harpia harpyja*). Como em outras aves de rapina, essa espécie apresenta um número diplóide relativamente baixo ($2n = 58$) e um cariótipo gradual, já que não apresenta uma divisão nítida entre macro e microcromossomos.

Figure 2. Karyotype of *Harpia harpyja*. Like other Falconiformes, this species present a relatively small diploid number ($2n = 58$), and its karyotype does not present a well defined subdivision between macro and microchromosomes.

ehollandiae), duas espécies separadas por 80 milhões de anos, revelou apenas um rearranjo cromossômico, já que o cromossomo GGA 4 marcou um macrocromossomo e um microcromossomo em *Dromaius* (Shetty *et al.* 1999). Posteriormente, a sonda GGA 4 apresentou resultados semelhantes no condor da Califórnia (*Gymnogyps californianus*), pombo (*Columba livia*), tentilhão (*Fringilla coelebs*), tordo (*Turdus iliacus*) e três espécies de faisão, entre outras (Raudsepp *et al.* 2002, Guttenbach *et al.* 2003, Derjusheva *et al.* 2004): apesar de apresentarem diferentes números cromossômicos, todas essas espécies apresentaram um par de macrocromossomos e um de microcromossomos marcados com a sonda GGA 4. Aparentemente, essa seria a condição plesiomórfica, enquanto a forma observada em *Gallus*, resultante da fusão desses dois pares, representaria um estado apomórfico.

Espécies que apresentam o cariótipo formado por um grupo de macrocromossomos (aproximadamente 8-10 pares) e muitos pares de microcromossomos mostram uma grande constância cariotípica, com a maioria dos grupos sintênicos mantendo-se inalterada. Esse cariótipo básico deve ser semelhante ao cariótipo ancestral das Aves, já que alguns répteis apresentam o cariótipo bimodal e as análises de mapeamento gênico identificaram uma ordem semelhante àquela observada em *Gallus* (Rodionov 1997, Derjusheva *et al.* 2004). Dessa forma, os dados de pintura cromossômica sugerem que o cariótipo ancestral hipotético das Aves teria $2n = 80$, com um par a mais do que *Gallus gallus*, já que o cromossomo GGA 4 corresponde a dois cromossomos distintos em espécies pertencentes a grupos taxonômicos diferentes (Raudsepp *et al.* 2002, Shibusawa *et al.* 2004a).

Uma grande expectativa foi criada em relação aos resultados de pintura cromossômica em Accipitridae: as hipóteses sobre a evolução cromossômica nesse grupo sempre evocaram a ocorrência de translocações e fusões envolvendo principalmente os microcromossomos (De Boer 1976, Bed'Hom 1999). Recentemente, foram publicados os primeiros resultados utilizando sondas cromossomo-específicas de *Gallus* em experimentos de hibridização *in situ* no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*) (de Oliveira *et al.* 2005). Como outras aves de rapina, a harpia apresenta um número diplóide relativamente baixo, $2n = 58$, e poucos pares de microcromossomos (Figura 2). O trabalho foi realizado com a utilização de dois *pools* diferentes de sondas. No primeiro *pool*, três grupos cromossômicos foram marcados com cores distintas: os cinco primeiros pares mais o Z em azul, os pares 6 a 10 em verde, e 19 pares distintos de microcromossomos em vermelho. O experimento revelou uma completa reorganização genômica na harpia, com a ocorrência de fusões, translocações e fissionamentos (Figura 3). A aplicação do segundo *pool*, formado pelos cromossomos GGA 1-6 e Z, cada um marcado com uma cor distinta, mostrou que os maiores pares cromossômicos de *Gallus* apresentam-se fissionados no cariótipo da harpia, originando de 2 a 5 cromossomos distintos. O cromossomo GGA 4 marcou dois pares distintos, como o observado em outras espécies de Aves. O cromossomo GGA 1 foi o par que sofreu o maior

número de rearranjos, participando da formação de 5 pares distintos na harpia. Além disso, a sonda cromossomo específica GGA Z marcou não só o cromossomo Z da harpia, mas também quase a totalidade do cromossomo W, que se apresenta normalmente de grande tamanho em algumas aves de rapina. Esses dados mostram a ocorrência de uma drástica reorganização genômica na harpia, que pode ser estendida para outras aves de rapina com cariótipos similares.

A aplicação da pintura cromossômica em outros grupos de aves que também apresentam cariótipos altamente derivados, como os Charadriiformes (o gênero *Burhinus* apresenta espécies com $2n = 44$), deverá trazer resultados tão surpreendentes como os observados na harpia. Como apenas poucas espécies de aves apresentam seus cariótipos analisados, mesmo em coloração convencional, há a possibilidade de que a variabilidade cromossômica dessa classe encontre-se subestimada.

PERSPECTIVAS: USO DA PINTURA CROMOSSÔMICA EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS

O uso da pintura cromossômica recíproca permite a detecção de grupos sintênicos conservados e rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a divergência cariotípica entre as espécies analisadas. O poder dessa metodologia ficou bem ilustrado nos resultados da comparação entre *Gallus* e harpia (de Oliveira *et al.* 2005). Um número maior de espécies analisadas por essa técnica permitiria a identificação de rearranjos cromossômicos comuns a diferentes grupos de espécies, que em uma análise filogenética funcionariam como sinapomorfias na resolução de filogenias ainda controversas. É importante observar que os rearranjos cromossômicos são altamente específicos. Em primatas do Novo Mundo, de Oliveira (2001) observou a ocorrência de apenas duas reversões em 184 rearranjos diferentes. No caso de Falconiformes, cuja filogenia ainda não foi inteiramente resolvida, a aplicação de sondas cromossomo-específicas poderia trazer informações importantes a respeito das relações filogenéticas entre as espécies analisadas. O grande número de rearranjos cromossômicos observados em harpia sugere a existência de grupos de rearranjos que podem ser exclusivos de ramificações dentro do clado das aves de rapina, que poderiam ser explorados em análises filogenéticas minuciosas.

Mesmo em aves com aparente conservação cromossômica, dados interessantes podem ser obtidos com técnicas variantes da pintura cromossômica. Sondas construídas a partir de segmentos de DNA, como os clones de cDNA permitem também a análise do mapeamento gênico dessas espécies, o que pode revelar rearranjos intracromossômicos não detectados pela aplicação de sondas cromossomo-específicas. Um exemplo interessante é a comparação entre oito espécies pertencentes à ordem Galiformes (Shibusawa *et al.* 2004a). Esses autores detectaram vários rearranjos intracromossômicos não revelados pelo uso de sondas cromossomo-específicas: várias inversões ocorreram nos diferentes macrocromossomos, e as relações filogenéticas entre essas espécies, propostas a partir

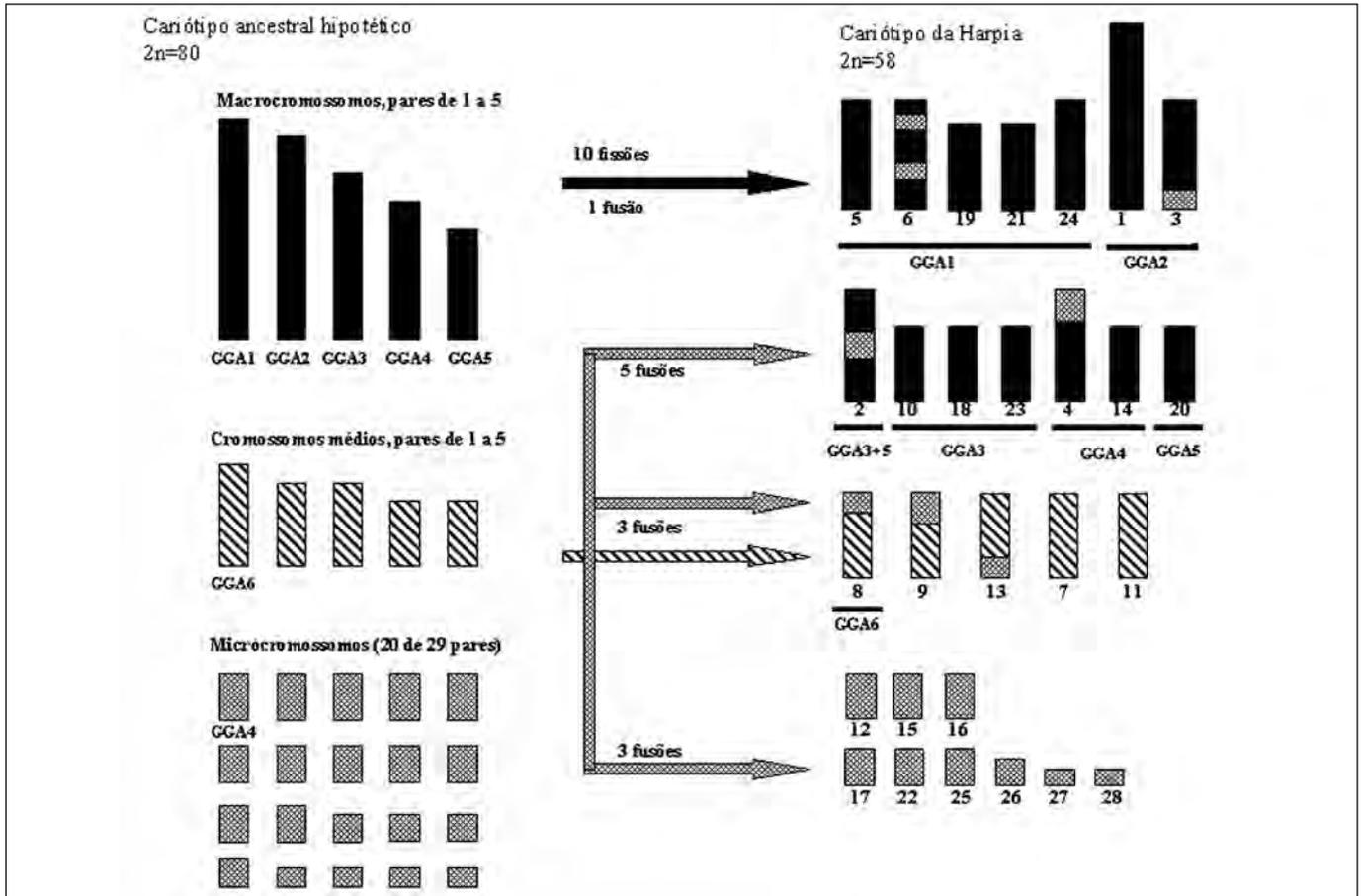


Figura 3. Rearranjos cromossômicos no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*). Comparado com o cariótipo ancestral hipotético das aves ($2n = 80$), o cariótipo da harpia passou por uma grande reorganização, com a ocorrência de fusões e fissões cromossômicas envolvendo tanto os macrocromossomos como os microcromossomos. Entre os autossomos, as sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus* utilizadas na comparação corresponderiam a 10 pares de macrocromossomos e 20 pares de microcromossomos no cariótipo ancestral. Os pares GGA1-6 foram identificados individualmente. O par sexual não se encontra representado no esquema.

Figure 3. Chromosomal rearrangements in the karyotype of *Harpia harpyja*. Compared to the hypothetical ancestral birds karyotype ($2n = 80$), the karyotype of *H. harpyja* experienced a significant reorganization, with fusions and fissions, involving both macro and microchromosomes. The chromosome-specific probes of *Gallus gallus* used in the comparison, would correspond to 10 pairs of macrochromosomes and 20 pairs of microchromosomes in the ancestral karyotype. The pairs GGA1 - 6 were individually identified. The sexual pair is not showed.

do uso dos dados cromossômicos, tiveram uma grande semelhança com propostas anteriores construídas a partir de dados moleculares.

Os exemplos citados anteriormente indicam que a filogenômica a partir do uso de sondas cromossomo-específicas ou segmento-específicas é uma poderosa ferramenta filogenética, e sua aplicação poderá trazer não só o esclarecimento nas relações de parentesco entre diferentes grupos de aves, mas também sobre os mecanismos de reorganização genômica que ocorreram nessa classe.

Entretanto, deve-se considerar que há a necessidade também da caracterização do cariótipo das espécies de aves através de técnicas de bandeamento cromossômico. A pintura cromossômica traz resultados mais satisfatórios quando aplicadas em espécies com cariótipos devidamente analisados. Assim, deve-se incentivar a análise de cariótipos de um maior número de espécies, através de técnicas de bandeamento cromossômico. Essa etapa, além de imprescindível para a caracterização básica do cariótipo, tem a vantagem de se ajustar melhor à realidade dos laboratórios brasileiros, visto que a metodologia

de citogenética molecular é relativamente dispendiosa.

A equipe do Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará vem analisando o complemento cromossômico de Aves há aproximadamente três anos. Nesse período, várias espécies pertencentes a diferentes ordens, em especial Falconiformes, tiveram seus cariótipos caracterizados por bandeamento G, C e NOR. Um dos pontos que influenciaram o sucesso que vem sendo alcançado foi a melhoria nas técnicas de obtenção de cromossomos metafásicos. O grupo vem utilizando não só a cultura de leucócitos de sangue periférico, mas também técnicas de cultura de tecido a partir de polpa dérmica ou biópsias. Recentemente, em um convênio com a Universidade de Cambridge, foram produzidas oito sondas cromossomo-específicas da harpia, a partir de culturas de fibroblastos. Essas sondas vêm sendo caracterizadas, e o próximo objetivo é a conclusão da obtenção de sondas dessa espécie e sua aplicação em estudos filogenéticos envolvendo diferentes espécies de aves de rapina e, posteriormente, de outros grupos de aves. Em um futuro próximo, é provável que haja um grande aumento no número de estudos cariotípicos em Aves, e com

isso um melhor esclarecimento não só dos processos ocorridos durante a diversificação cromossômica do grupo, mas também das relações filogenéticas entre os diferentes ramos dessa classe, que, com exceção dos peixes, apresenta o maior número de espécies entre os vertebrados.

REFERÊNCIAS

- Alkalaeva, E. Z., V. A. Trifonov, P. L. Perelman e A. S. Graphodatsky (2002) Comparative chromosome painting. *Rus. J. Genet.* 38:869–876.
- Bed'Hom, B. (1999) *Etude des caryotypes atypiques des Accipitridae (Aves, Falconiformes) par cytogenetique classique et moleculaire, et modelisation de leur evolution.* Tese de Doutorado. Paris, França: Museu Nacional de História Natural.
- Chowdhary, B. P. e T. Raudsepp (2001) Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci.* 23:37–55.
- De Boer, L. E. M. (1976) The somatic chromosome complements of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order. *Genetica* 46:77–113.
- De Lucca, E. J. e G. T. Rocha (1992) Citogenética de Aves. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, série Zool.* 8:33–68.
- De Oliveira, E. H. C. (2001) *Filogenia da subfamília Atelinae (Primates, Atelidae): análise comparativa por pintura cromossômica multicolor.* Tese de doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- De Oliveira, E. H. C., F. Habermann, O. Lacerda, I. J. Sbalqueiro, J. Wienberg e S. Muller (2005) Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma* 114:338–343.
- De Oliveira, M. D. V. e W. Jorge (2000) Análise cromossômica em Aves. *Melopsittacus* 3:72–80.
- Derjusheva, S., A. Kurganova, F. Haberman e E. Gaginskaia (2004) High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome Res.* 12:715–723.
- Graves, J. A. M. e S. Shetty (2001) Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J. Exp. Zool.* 290:449–462.
- Guttenbach, M., I. Nanda, W. Feichtinger, J. S. Masabanda, D. K. Griffin e M. Schmid (2003) Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. *Cytogenet. Genome Res.* 103:173–184.
- Masabanda, J. S., D. W. Burt e P. C. M. O'Brien (2004) Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the 1st complete avian karyotype. *Genetics* 166:1367–1373.
- Pieczarka, J. C. e C. Y. Nagamachi (2004) Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas, p. 115–132. Em: M. Guerra (ed.). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética.* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Rodionov, A. V. (1997) Evolution of avian chromosomes and linkage groups. *Rus. J. Genet.* 33:605–617.
- Raudsepp, T., M. L. Houck, C. O. Brien, M. A. Ferguson-Smith, O. A. Ryder e B. P. Chowdhary (2002) Cytogenetic analysis of California condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 98:54–60.
- Shetty, S., D. K. Griffin e J. A. M. Graves (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 7:289–295.
- Schwarzacher, T. e P. Heslop-Harrison (2000) *Practical in situ hybridization.* Oxford: BIOS Scientific Publisher Ltd..
- Shibusawa, M., M. Nishibori, C. Nishida-Umehara, M. Tsudzuki, J. Masabanda, D. K. Griffin e Y. Matsuda (2004a) Karyotypic evolution in the Galliformes: an examination of the process of karyotypic evolution by comparison of the molecular cytogenetic findings with the molecular phylogeny. *Cytogenet. Genome Res.* 106:111–119.
- Shibusawa, M., C. Nishida-Umehara, M. Tsudzuki, J. Masabanda, D. K. Griffin e Y. Matsuda (2004b) A comparative karyological study of the blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*, Phasianidae) and California quail (*Callipepla californica*, Odontophoridae). *Cytogenet. Genome Res.* 106:82–90.
- Silva, J. M. C. (1998) As Aves, p. 211–219. Em: P. L. B. Lisboa (ed.) *Caxianã: ambiente físico e diversidade biológica.* Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.

Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes)

Analia del Valle Garnero^{1,3}, Mario Angel Ledesma² e Ricardo José Gunski¹

¹ Ciências. Biológicas, Laboratório de Genética, Universidade Federal do Tocantins, Rua 03, Q17, CEP 77 500-000, Jardim dos Ipês, Porto Nacional, TO, Brazil. E-mail: analiagarnero@uft.edu.br

² Departamento de Genética, Felix de Azara, 1552, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina. E-mail: mledesma@fceqyn.unam.edu.ar

³ Autor para correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 06 de março de 2006

ABSTRACT. High karyotypic homology in the family Tinamidae (Aves: Tinamiformes). Bird karyotypes are in general poorly known. About 20% of the species belonging to the order Tinamiformes had their karyotypes described, and only three of them were analyzed using differential staining techniques. Then, the objective of this work was to provide further cytotoxic information on this group of birds by describing C and NOR banding patterns for *Crypturellus tataupa* and *Tinamus solitarius*. Four individuals of *C. tataupa* (2 ♀ and 2 ♂) and two *T. solitarius* (2 ♂) were sampled in northeast Argentina. Mitotic chromosomes were obtained from direct cultures of bone marrow and peripheral blood lymphocytes, for *C. tataupa* and *T. solitarius*, respectively. *C. tataupa* presented $2n = \pm 78$, being the 1st pair a large acrocentric, the 2nd and 3rd pairs medium telocentrics and the subsequent pairs small telocentrics. The Z chromosome was C banding negative, corresponding in size to the 4th pair. The W was C banding positive, being similar in size to the 6th pair. *T. solitarius* presented $2n = \pm 80$, with the first two pairs submetacentrics, the 3rd pair acrocentric and the following pairs telocentrics. The Z chromosome was similar in size to the 4th - 5th pairs. The C banding showed marks in the centromeric region of the macrochromosomes, except for the Z chromosome. In both species, the NORs were located in a pair of microchromosomes. Within the Tinamidae family, a high chromosomal homology was observed. Their representatives could be subdivided into two different groups: *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* and *Tinamus*, that are characterized by the 2nd pair submetacentric, and *Crypturellus*, in which this chromosome is telocentric. The species from the first group are possibly closer to the ratites, despite the higher degree of differentiation among the sexual chromosomes.

KEY WORDS: C and NORs banding, cytogenetic, *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius*

RESUMO. A classe Aves é uma das menos estudadas citogeneticamente. Somente 20% das espécies de Tinamiformes foram cariotipadas, e destas, somente três foram analisadas com técnicas de coloração diferencial. Os objetivos deste trabalho foram obter padrões de bandeamento C e NORs de *Crypturellus tataupa* e *Tinamus solitarius* amostrados no nordeste da Argentina, assim como, acrescentar informações citogenéticas à ordem. Foram analisados quatro exemplares de *C. tataupa* (2 ♀ e 2 ♂), e dois machos de *T. solitarius*, utilizando-se as técnicas de cultura direta de medula óssea e de linfócitos de sangue periférico, respectivamente. *C. tataupa* apresentou $2n = 78$, sendo o primeiro par submetacêntrico grande, o 2^o e 3^o pares telocêntricos medianos e os pares seguintes telocêntricos pequenos. O cromossomo Z é acrocêntrico, banda C negativo, corresponde em tamanho ao 4^o par. O W é também acrocêntrico, porém banda C positivo e tem tamanho equivalente ao 6^o par. Já *T. solitarius* apresentou $2n = 80$, com os dois primeiros pares submetacêntricos, o 3^o acrocêntrico e os demais telocêntricos. O cromossomo Z foi acrocêntrico e equivalente em tamanho ao 4-5^o pares. Os padrões de bandeamento C para *T. solitarius* apresentaram marcações definidas na região centromérica dos macrocromossomos, exceto no cromossomo Z. As regiões organizadoras de nucléolo localizaram-se em um par de microcromossomos em ambas as espécies. Observou-se uma alta homeologia cromossômica entre as espécies pertencentes à família Tinamidae, sendo possível reuni-las em dois grupos: *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Tinamus*, caracterizados pelo 2^o par submetacêntrico, e *Crypturellus*, que difere destas pela morfologia telocêntrica deste par cromossômico. As espécies do primeiro grupo estariam mais próximas das ratitas, porém com um maior grau de diferenciação entre os cromossomos sexuais.

PALAVRAS-CHAVE: bandeamento C, NORs, citogenética, *Crypturellus tataupa*, *Tinamus solitarius*

Entre as Aves Carinatae, os Tinamiformes (codornas, macucos, inhambus e perdizes) são considerados o grupo mais antigo e mais próximo das Ratitae, como indicam os dados referentes à disposição dos ossos da abóbada palatina (Cracraft 1974) e informações obtidas por hibridação de DNA (Sibley e Ahlquist 1981).

As aves da ordem Tinamiformes são endêmicas da região neotropical, sendo distribuídas do sul da Argentina ao México. O valor cinegético da carne destas aves tem provocado uma forte pressão predatória resultante da caça intensiva. Além disso, a diminuição do hábitat natural devido ao avanço da fronteira agrícola, tem tornado algumas espécies ameaçadas de extinção.

Das 47 espécies de Tinamiformes (Sibley 1996), somente sete foram analisadas citogeneticamente, a maioria delas apenas com coloração convencional: *Crypturellus parvirostris* (Lucca 1974, 1985), *Crypturellus tataupa* (Lucca 1985, Rocha 1987), *Nothura maculosa* (Lucca e Chamma 1977, Lucca

1985, Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005), *N. minor* (Lucca 1985, Rocha 1987), *Rynchotus rufescens* (Moro et al. 1994, Garnero e Gunski 2000), *Tinamus solitarius* (Beltermam e De Boer 1990) e *Eudromia elegans* (Sasaki et al. 1980).

Técnicas de bandeamento foram utilizadas apenas em *E. elegans* (Banda C) (Sasaki et al. 1980), *R. rufescens* (bandas C e NOR) (Moro et al. 1994, Pigozzi e Solari 1999, Garnero e Gunski 2000) e *N. maculosa* (bandas C e NOR) (Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005).

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram obter padrões de bandeamento C e NORs para *C. tataupa* e *T. solitarius* amostrados no nordeste da Argentina, acrescentando informações sobre os mecanismos de evolução cariotípica do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados quatro exemplares de *C. tataupa* (2 ♀ e 2 ♂), capturados com armadilhas artesanais (“arapucas”) no Município de Santa Ana, Departamento Candelária, Misiones,

Tabela 1. Razão entre braços (r), longo (l) e curto (c) e índice centromérico (ic) dos primeiros macrocromossomos e dos cromossomos sexuais (Z e W) de *Crypturellus tataupa* e *Tinamus solitarius*.

Table 1. Arms ratio (r), ratios of the long (l) and short (c) arms, and centromeric index (ic) of the first macrochromosomes and of the sexual chromosomes (Z and W) of *Crypturellus tataupa* and *Tinamus solitarius*.

Cromossomo n°	<i>C. tataupa</i>					<i>T. solitarius</i>				
	l	c	r	ic	Tipo ^a	l	c	r	ic	Tipo ^a
1	0,98	0,59	1,65	37,77	SM	1,12	0,67	1,67	37,38	SM
2	1,18	-	∞	0	T	0,93	0,47	2,05	33,33	SM
3	0,94	-	∞	0	T	1,05	0,10	9,50	9,52	A
4	0,64	-	∞	0	T	0,80	-	∞	0	T
5	0,55	-	∞	0	T	0,65	-	∞	0	T
Z	0,63	-	∞	0	T	0,72	-	∞	0	T
W	0,33	-	∞	0	T	-	-	-	-	-

^a A: acrocêntrico, SM: submetacêntrico, T: telocêntrico.

Argentina (27°22'S, 55°34'W). A identificação taxonômica dos exemplares de *C. tataupa* foi realizada pelo curador da Coleção Félix de Azara (CFA), Prof. J. Contreras, e as peles foram depositadas no Museu Bernardino Rivadavia. Foram também colhidas amostras sanguíneas de dois machos de *T. solitarius* mantidos em cativeiro no Museu de Ciencias Naturales e Historia "Antonio Ruiz de Montoya", Misiones, Argentina.

Para obtenção das metáfases de *C. tataupa* empregou-se a técnica de cultura direta de medula óssea (Garnero e Gunski

2000) e em *T. solitarius* a cultura de linfócitos de sangue periférico coletado das artérias umerais (Moorhead et al. 1960). A coloração convencional foi realizada com solução de Giemsa, em tampão fosfato 0,01M, pH 6,8, por 15 minutos. As técnicas de coloração diferencial de Banda C e de NOR foram realizadas segundo os protocolos de Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente, com modificações.

A análise biométrica dos cromossomos foi realizada escolhendo-se e fotografando-se as 10 melhores metáfases de cada espécie, isto é, as que apresentaram ótima coloração e morfologia, com contornos bem definidos. Os pares de cromossomos foram recortados e ordenados do maior para o menor e foram mensurados mediante a utilização de uma régua milimetrada. Foi estimada a razão entre braços (r) e o índice centromérico (ic), segundo Guerra (1986). No primeiro caso, a posição do centrômero é definida pelo valor obtido da razão entre o braço longo (l) e o curto (c): $r = l/c$. No segundo, divide-se o tamanho do braço curto multiplicado por 100 pelo comprimento total do cromossomo: $ic = c \times 100 / c + l$. Os cariótipos foram classificados segundo a nomenclatura proposta por Guerra (1986).

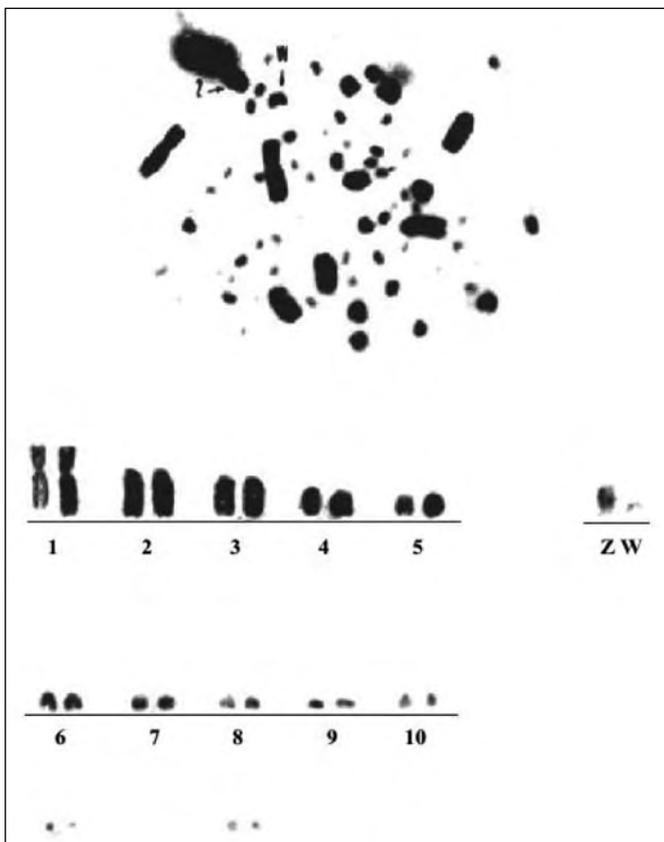


Figura 1. Metáfase e cariótipo parcial de um exemplar fêmea de *Crypturellus tataupa*, $2n = 78$.

Figure 1. Metaphase and partial karyotype of a female *Crypturellus tataupa*, $2n = 78$.

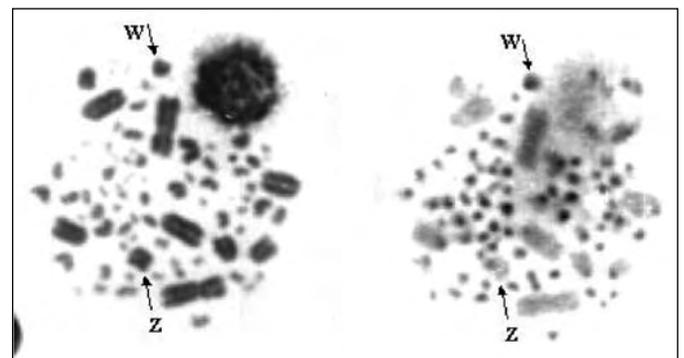


Figura 2. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) e bandeamento C (direita) de um exemplar fêmea de *Crypturellus tataupa*. As setas indicam os cromossomos sexuais.

Figure 2. Sequential analysis, Giemsa (left) and C banding (right), of a female *Crypturellus tataupa*. The arrows indicate the sexual chromosomes.

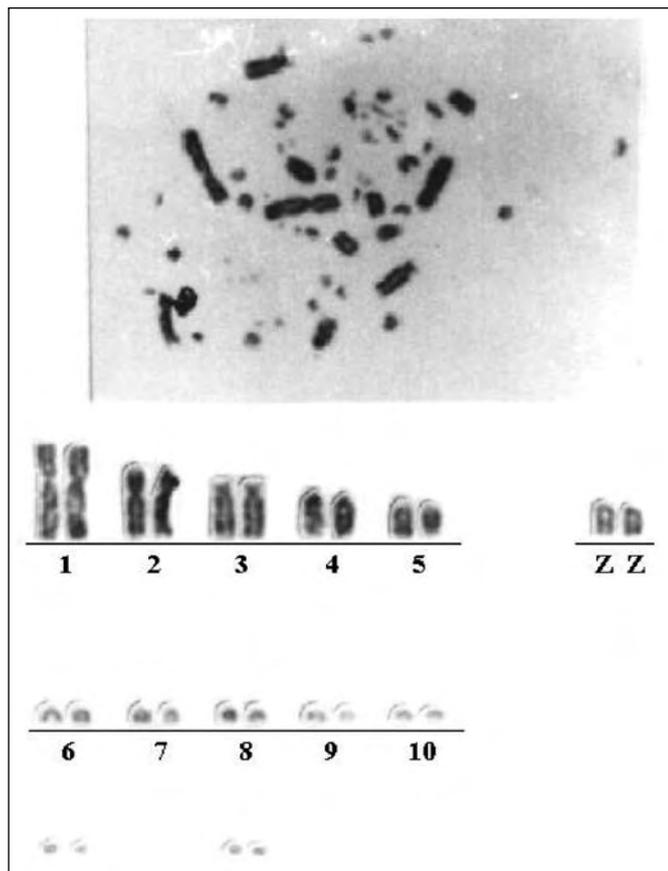


Figura 3. Metáfase e cariótipo parcial de um exemplar macho de *Tinamus solitarius*, $2n = 80$.

Figure 3. Metaphase and partial karyotype of a male *Tinamus solitarius*, $2n = 80$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *C. tataupa* possui um cariótipo com $2n = \pm 78$ cromossomos (Figura 1), sendo o primeiro par submetacêntrico grande, o 2° e 3° pares telocêntricos medianos e os pares seguintes telocêntricos pequenos (Tabela 1). Os dados aqui apresentados corroboram com o número diplóide apresentado por Lucca (1985) e Rocha (1987). Os cariótipos foram equiva-

lentes também em morfologia, no entanto, estes autores utilizaram outro sistema de nomenclatura, considerando o primeiro par como sendo metacêntrico e os restantes acrocêntricos. O número diplóide desta espécie coincide com o descrito para *C. parvirostris* (Lucca 1974, 1985, Duarte e Giannoni, 1985).

A morfologia telocêntrica do 2° par diferencia o cariótipo de *C. tataupa* do apresentado pelas demais espécies da família, nas quais é submetacêntrico (Belterman e De Boer 1990, Moro *et al.* 1994, Rocha *et al.* 1996, Garnero e Gunski 2000). Também o diferencia das Ratites *Apteryx australis*, *Dromaius novaehollandiae*, *Casuaris casuaris*, *Pterocnemia pennata*, *Rhea americana* e *Struthio camelus*, nas quais este par é metacêntrico (Takagi *et al.* 1972, Benirschke *et al.* 1976, De Boer 1980, Ansari *et al.* 1988, Liotta e Gunski 1998, Gunski e Giannoni 1998).

O cromossomo Z é acrocêntrico, banda C negativo, e corresponde em tamanho ao 4° par autossômico. O W é também acrocêntrico, porém banda C positivo, e tem tamanho equivalente ao 6° par. Nos outros cromossomos do complemento observam-se marcações definidas na região centromérica, com exceção dos dois primeiros pares (Figura 2).

O complemento cromossômico de *T. solitarius* é de $2n = \pm 80$ (Figura 3), com os dois primeiros pares submetacêntricos, o 3° par acrocêntrico e os pares seguintes telocêntricos (Tabela 1), estando de acordo com a descrição prévia de Belterman e De Boer (1990). A presença do 3° par bibráquial é uma característica que distingue o cariótipo desta espécie dos cariótipos de *N. maculosa* e *R. rufescens*, e a aproxima do cariótipo das ratites: *D. novaehollandiae*, *C. casuaris* e *R. americana*.

Os padrões de bandeamento C (Figura 4) apresentam marcações definidas nas regiões centroméricas dos macrocromossomos, exceto no cromossomo Z, este último acrocêntrico e equivalente em tamanho ao 4-5° par. Igual reação ao tratamento salino do cromossomo Z observa-se nas outras espécies da família, como *N. maculosa* e *R. rufescens* (Moro *et al.* 1994, Garnero e Gunski 2000, Pigozzi e Solari 2005), além dos Rheiformes, como *D. novaehollandiae*, *P. pennata*, *R. americana* e *S. camelus* (Ansari *et al.* 1988, Liotta e Gunski 1998, Gunski e

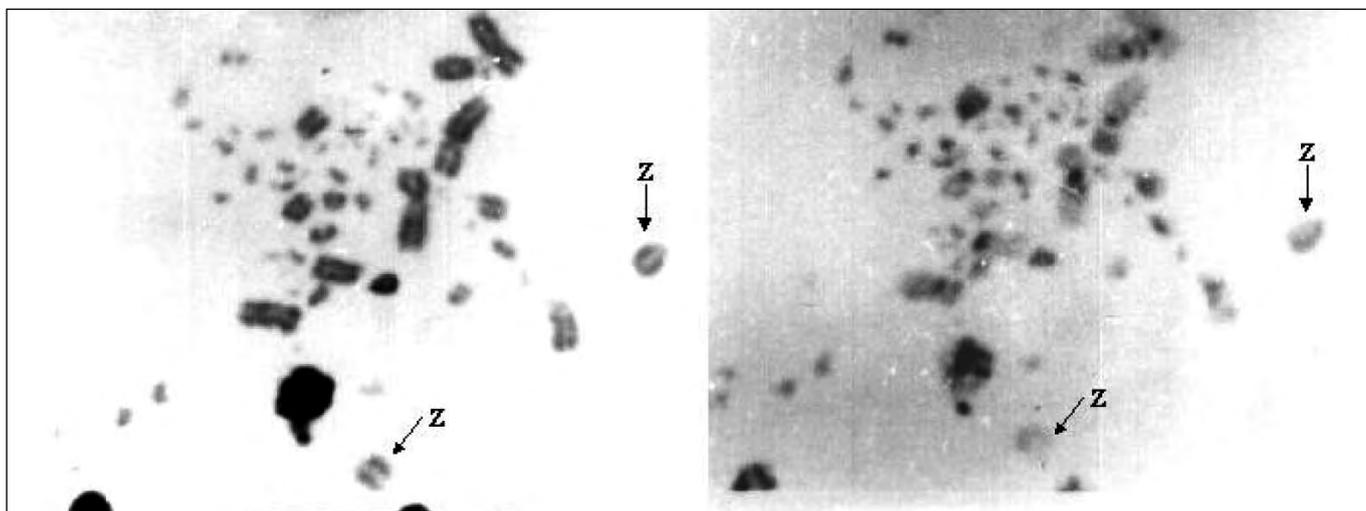


Figura 4. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) bandeamento C (direita) de um exemplar macho de *Tinamus solitarius*. As setas indicam os cromossomos sexuais.

Figure 4. Sequential analysis, Giemsa (left) and C banding (right) of a male *Tinamus solitarius*. The arrows indicate the sexual chromosomes.

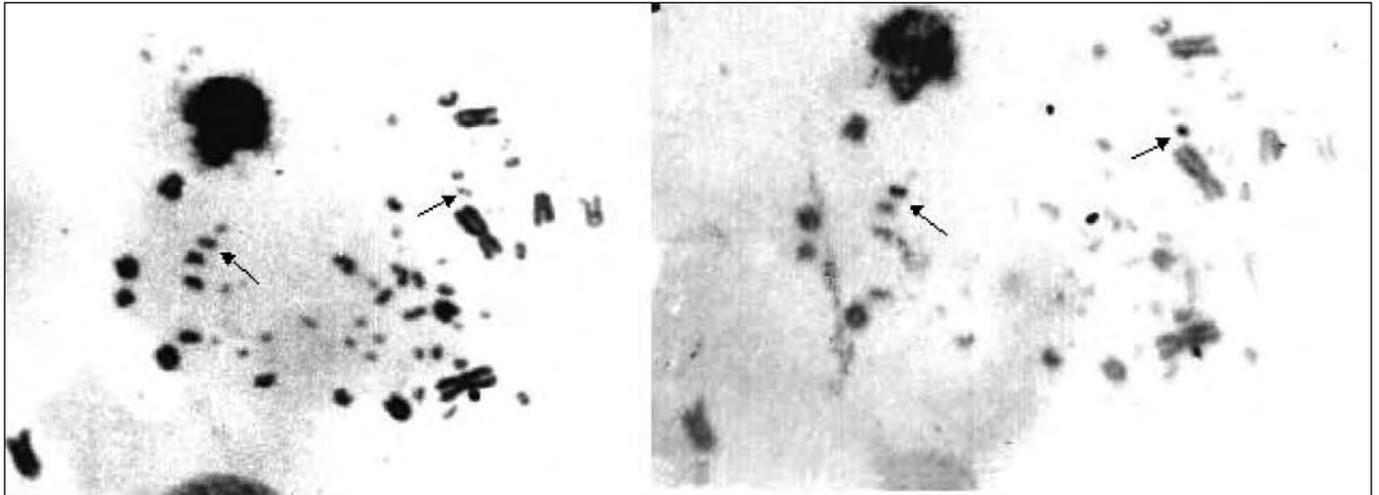


Figura 5. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) e bandeamento NOR (direita) de um exemplar fêmea de *Crypturellus tataupa*. As setas indicam os organizadores nucleolares.

Figure 5. Sequential analysis, Giemsa (left) and NOR (right) of a female *Crypturellus tataupa*. The arrows indicate the sexual chromosomes

Giannoni 1998). Não foi possível a amostragem de indivíduos fêmeas de *T. solitarius*, permanecendo duvidosa a correta identificação do cromossomo W, o qual não havia sido identificado também na publicação de Belterman e De Boer (1990).

Em ambas as espécies aqui estudadas as regiões organizadoras de nucléolo localizaram-se num par de microcromossomos, como demonstrado pela análise seqüencial Giemsa-NOR (Figuras 5 e 6). Este padrão é similar ao apresentado por outras espécies da família já analisadas (Moro *et al.* 1994, Garnero e Gunski 2000).

As aves da família Tinamidae apresentam uma alta homeologia cromossômica, o que é evidenciado pela predominância de cromossomos telocêntricos de médio e pequeno porte e pela uniformidade dos padrões de bandeamentos C e NOR. É possível reuni-las em dois grupos de acordo com o padrão dos macrocromossomos grandes (Figura 7): *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Tinamus*, caracterizados pelo 2° par submetacêntrico, e *Crypturellus*, no qual este par cromossômico é acrocêntrico. Os cariótipos das espécies do primeiro grupo são mais similares em relação aos cariótipos das Ratites, principalmente pela presença do segundo cromossomo

bibraquial, porém com um grau maior de diferenciação entre os cromossomos sexuais. Ainda, *T. solitarius* teria o cariótipo mais ancestral deste grupo, devido à bibraquialidade do 3° par e ao número diplóide de cromossomos ($2n = 80$), coincidentes com os de *A. australis*, *D. novaehollandiae*, *C. casuarius* e *R. americana* (Figura 7). Deve-se ressaltar que *R. americana* apresenta também bibraquialidade no 5° par cromossômico do complemento, assim como *P. pennata* e *S. camelus*.

O cromossomo W dos tinamídeos apresenta uma conformação intermediária entre o padrão encontrado nos Neognathas (altamente condensado e muito menor em tamanho do que o cromossomo Z) e nas Ratitae (altamente eucromático e igual ou ligeiramente menor em tamanho em relação ao cromossomo Z) (Takagi *et al.* 1972, Benirschke *et al.* 1976, De Boer 1980, Ansari *et al.* 1988, Liotta e Gunski 1998, Gunski e Giannoni 1998, Pigozzi 1999, Pigozzi e Solari 1999, 2005). Assim, as Ratites comportam-se como tendo quase livre a recombinação em seus cromossomos sexuais, no entanto, as espécies Neognathas apresentam uma limitada região de recombinação (Pigozzi e Solari 1997, Pigozzi e Solari 2005).

Nos Tinamiformes verifica-se uma diminuição do número

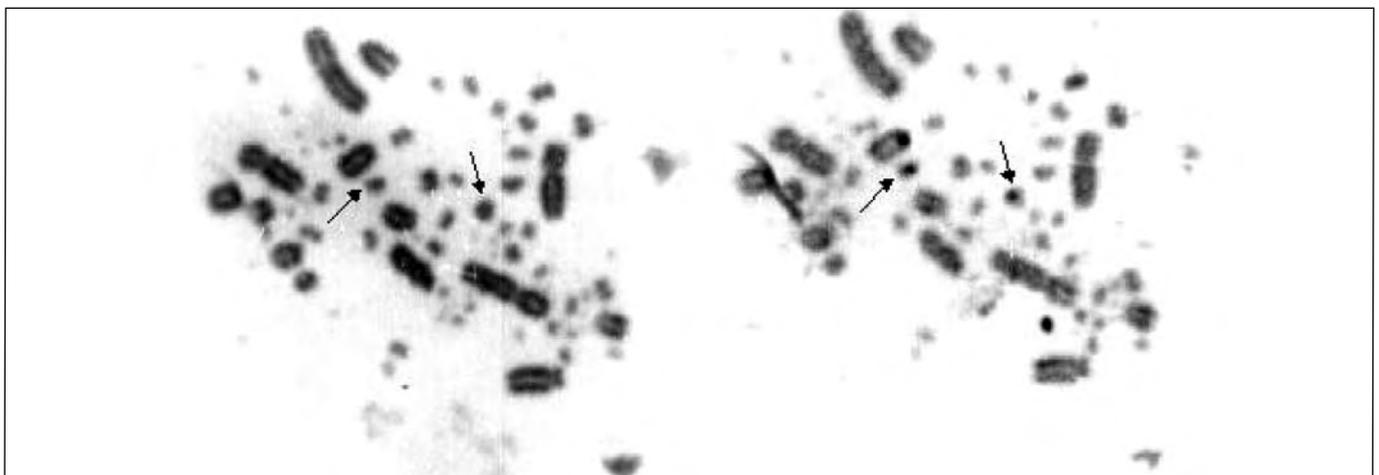


Figura 6. Análise seqüencial Giemsa (esquerda) e bandeamento NOR (direita) de um exemplar macho de *Tinamus solitarius*. As setas indicam os organizadores de nucléolo.

Figure 6. Sequential analysis, Giemsa (left) and NOR (right) of a male *Tinamus solitarius*. The arrows indicate the sexual chromosomes

cromossômico, de 80, como em *T. solitarius* e *E. elegans*, para 78, nas outras espécies da família. No entanto, não existe um aumento da bibraquialidade dos mesmos, como seria de se esperar se a diminuição fosse originária de fusões cêntricas ou translocações (Figura 7). Assim, pode-se sugerir que a redução do número diplóide se deve a perdas completas de microcromossomos.

Os Tinamiformes estão estreitamente relacionados com

as Ratites por possuírem palato primitivo, capacidade de vôo limitada e, como apresentado neste estudo, características cromossômicas similares (Figura 7), a ponto de ser praticamente impossível distinguir os cariótipos de *Tinamus*, *Apteryx*, *Casuarius* e *Dromaius*, entre outros. A homeologia cromossômica encontrada entre os Tinamidae reforça o monofiletismo das espécies do grupo.

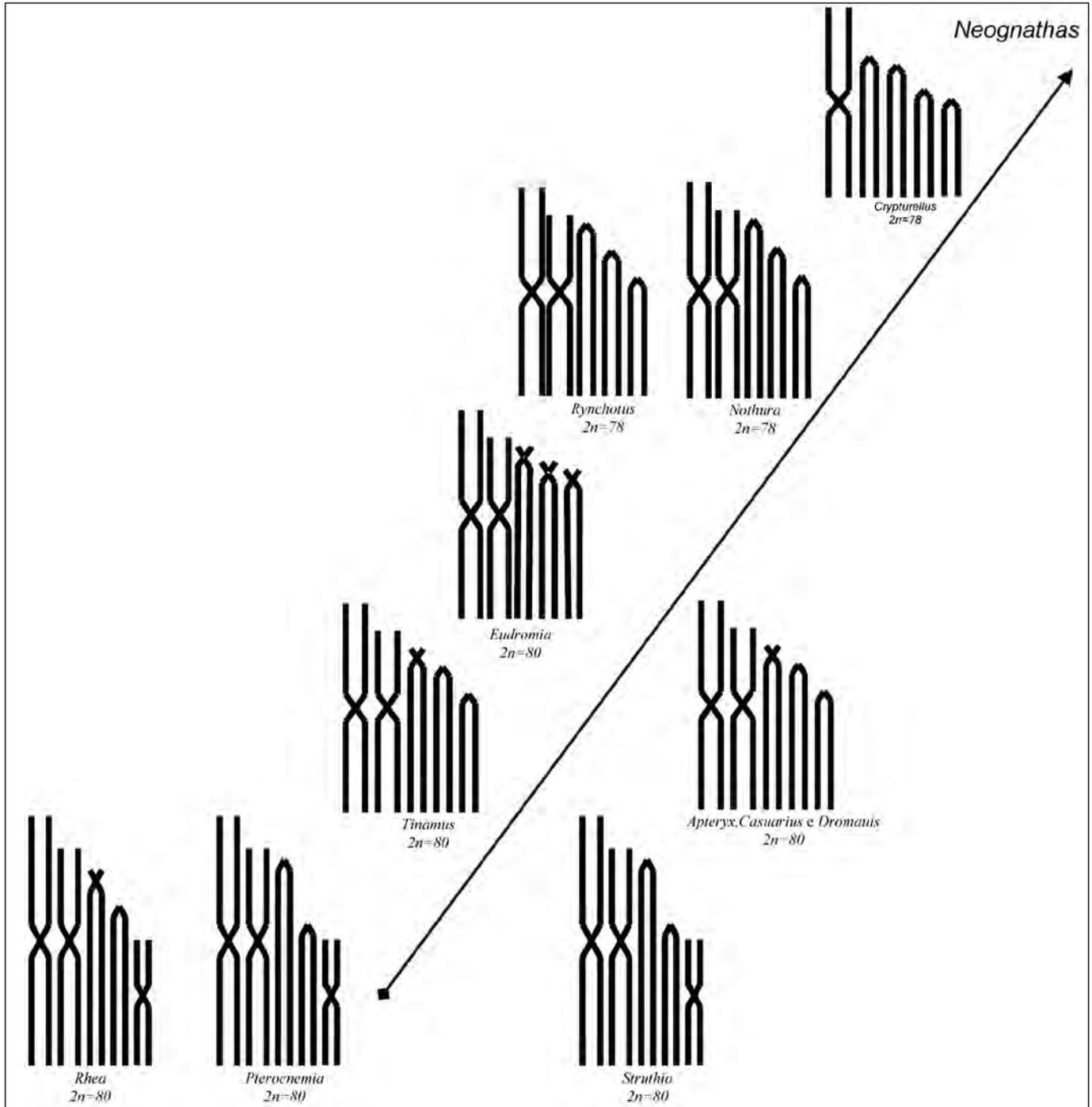


Figura 7. Esquema representativo da possível evolução cariotípica da família *Tinamidae* em relação às Ratites. Os cariótipos de *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Tinamus*, caracterizados pelo 2º par submetacêntrico são mais similares aos observados nas ratites, principalmente pela presença do segundo par cromossômico bibraquial. *T. solitarius* teria o cariótipo mais ancestral deste grupo, devido à bibraquialidade do 3º par e ao número diplóide de cromossomos ($2n=80$), coincidentes com os de *Apteryx*, *Dromanius*, *Casuarius* e *Rhea*.

Figure 7. Possible cytotoxic relationship between the family *Tinamidae* and the Ratites. The karyotypes of *Rynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* and *Tinamus*, that are characterized by the second pair submetacentric, seem to be more closely related to the karyotypes observed in the Ratites. *T. solitarius* would have the more ancestral karyotype among the *Tinamidae* species, which is demonstrated by 3rd pair biarmed and the diploid number ($2n=80$), which coincides with *Apteryx*, *Dromanius*, *Casuarius* and *Rhea*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sebastián Cabanne e Ernesto Krauzuk pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

- Ansari, H. A., N. Takagi e M. Sasaki (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:185-188.
- Beltermam, R. H. R. e L. E. M. De Boer (1990) A miscellaneous collection of bird karyotypes. *Genetica* 83:17-29.
- Benirschke, R. J., R. E. Sekulovich e A. C. Risser (1976) The chromosomes of Darwin's rhea (*Pterocnemia p. pennata* – Aves). *Chromosome Inf.* 21:13-14.
- Cracraft, J. (1974) Phylogeny and evolution of the ratite birds. *The Ibis* 116 (4): 494–527.
- De Boer, L. E. M. (1980) Do the chromosomes of the kiwi provide evidence for a monophyletic origin of the ratites? *Nature* 287:84-85.
- Duarte, J. M. B. e M. A. Giannoni (1985) Análise citogenética de algumas espécies da ordem Tinamiformes (Aves). Jaboticabal: Encontro de Pesquisas Veterinárias.
- Garnero A. del V. e R. J. Gunski (2000) Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *The nucleus* 43:64–70.
- Guerra, M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev. Bras. Genet.* 9:741-743.
- Gunski, J. R. e M. L. Giannoni (1998) Nucleolar organizer regions and a new chromosome number for *Rhea americana* (Aves, Rheiformes). *Gen. and Mol. Biol.* 21:207-210.
- Howell, W. M. e D. A. Black (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Liotta, D. J. e R. J. Gunski (1998) Análisis citogenético de la especie *Pterocnemia pennata* (Aves, Rheidae). *Bol. Soc. Biol. Concepcion, Chile* 69:147-153.
- Lucca, E. J. de (1974) Cariótipo de 14 espécies de aves das ordens Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.* 7:253-263.
- _____ (1985) Análise comparativa do cariótipo de 4 espécies de aves da ordem Tinamiformes e as relações cariotípicas com Ratitae. *Naturalia* 10:57-63.
- _____ e L. Chamma (1977) Estudo do complemento cromossômico de 11 espécies de aves das ordens Columbiformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.* 10:97-105.
- Moorhead, R. S., P. C. Howell, W. J. Mellman, D. M. Battips e D. A. Hundgerford (1960) Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616.
- Moro, M. E. G., M. L. Giannoni, J. A. Boer e P. A. Tosta (1994) Estudos da *Rynchotus rufescens* - perdiz (Aves: Tinamiformes) em cativeiro II. Citogenética. *Ars. Veterinaria* 10:41-49.
- Pigozzi, M. I. e A. J. Solari (1997) Extreme axial equalization and wide distribution of recombination nodules in the primitive ZW pair of *Rhea americana* (Aves, Ratitae). *Chromosome Res.* 5:421-428.
- _____ (1999) Origin and Evolution of the Sex Chromosomes in Birds. *Biocell* 23:79-95.
- _____ e A. J. Solari (1999) The ZW pairs of two paleognath birds from two orders show transitional stages of sex chromosome differentiation. *Chromosome Res.* 7:541-551.
- _____ e _____ (2005) Meiotic recombination in the ZW pair of a tinamid bird shows a differential pattern compared with neognaths. *Genome* 48:286-290.
- Rocha, G.T. (1987) *Estudo do complemento cromossômico e da região organizadora do nucléolo em algumas espécies de aves.* Dissertação de mestrado. Botucatu: UNESP.
- _____, M. S. dos Santos e E. J. De Lucca (1996) Cytogenetics of the family Tinamidae (Tinamiformes-Aves). *Rev. Bras. Genét.* 19(Suppl.):110.
- Sasaki, N., C. Nishida, N. Takagi e H. Hori (1980) Sex chromosomes of the elegant crested Tinamou, *Eudromia elegans*. *Chrom. Inf. Serv.* 29:19-21.
- Sibley, C. G. e J. Ahlquist (1981). The phylogeny and relationships of the ratites birds as indicated by DNA-DNA hybridization. *Proc. End. Int. Congr. Sys. and Evol. Biol.* 301-335.
- _____ (1996) Birds of the world 2.0. Thayer Birding Software.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75:304-306.
- Takagi, N., M. Itoh e M. Sasaki (1972) Chromosome studies in four species of *Ratitae* (Aves). *Chromosoma* 36:281-291.

Descrição do cariótipo e padrões de bandas C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae).

Mario A. Ledesma^{1,2}, Pablo A. Martínez¹, Pablo S. Calderón¹, Juan M. Boeris¹ e José M. Meriles¹

¹ Laboratorio de Citogenética de Aves, Departamento de Genética, FCEQyN, UNAM, Félix de Azara, 1552, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina. E-mail: mledesma@fceqyn.unam.edu.ar

² Autor para correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 02 de março de 2006

ABSTRACT. Karyotypic description and C – NOR bands of *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae). The black-backed grosbeak (*Pheucticus aureoventris*) is one of the species in risk of extinction due to human pressure on its habitat. It is mainly distributed in the pre-mountain areas of Andes (between 1700 to 3700 mts). Although the order Passeriformes presents the largest amount of karyotyped species, none of the six species of the genus *Pheucticus* have been previously studied. The objective of the present work was to determine the diploid number and the C and NOR bands patterns of *P. aureoventris*. Three females and two males were collected in General Belgrano department, Province of Jujuy, Argentina. The chromosomes were obtained from direct cultures of bone marrow. Seventy metaphases were analyzed for each individual in order to establish the diploid number. Conventional and differential staining techniques (C and NOR bands) were used. The diploid number was $2n = 78$. The pair one and the Z chromosome were submetacentrics, the pairs two, three, five and the W chromosome were subtelocentric, and the remaining elements of the complement were telocentric. C banding showed that the heterochromatin is located mainly in the centromeric regions of the microchromosomes, and that the W chromosome is completely heterochromatic. Among the macrochromosomes, tenuous centromeric marks were observed, as well as interstitial bands in the largest pairs. The analysis of the nucleolar organizer regions showed positive marks in two microchromosome pairs. The data here presented provides an initial step for the understanding of the karyotype evolution of the genus *Pheucticus*.

KEY WORDS: *Pheucticus aureoventris*, C and NOR bands, macrochromosomes, microchromosomes.

RESUMO. O rei-do-bosque (*Pheucticus aureoventris*) é uma espécie em perigo de extinção devido à destruição do seu hábitat e à caça para comércio de animais de estimação. Distribui-se principalmente nas regiões da pré-cordilheira dos Andes (entre 1.700 e 3.700 metros de altitude). Embora a ordem Passeriformes conte com a maior quantidade de espécies cariotipadas, até o momento não se conhecem dados citogenéticos relacionados às seis espécies que pertencem ao gênero *Pheucticus*. O objetivo do presente trabalho foi determinar o número cromossômico e os padrões de bandeamento C e NOR de *P. aureoventris*. Foram analisadas três fêmeas e dois machos, capturados no Departamento General Belgrano, Província de Jujuy, Argentina. As metáfases foram obtidas a partir de culturas diretas de medula óssea. Para se estabelecer o número diplóide foram analisadas 70 metáfases para cada indivíduo. As preparações foram analisadas com coloração convencional Giemsa e bandeamentos C e NOR. O número cromossômico observado em *P. aureoventris* foi $2n = 78$. Os pares um e o sexual Z foram submetacêntricos; os pares dois, três, cinco e o W foram subtelocêntricos; os pares restantes do complemento são todos telocêntricos. O Bandeamento C mostrou que a heterocromatina constitutiva está localizada principalmente nas regiões centroméricas dos microcromossomos e o cromossomo W é completamente heterocromático. Nos macrocromossomos observaram-se tênues marcações centroméricas, além de bandas intersticiais nos braços longos dos maiores cromossomos. A análise das regiões organizadoras do nucléolo evidenciou marcações positivas em dois pares de microcromossomos. Os resultados aqui apresentados representam um passo inicial para o entendimento da evolução cariotípica do gênero.

PALAVRAS-CHAVE: *Pheucticus aureoventris*, bandas C e NOR, macrocromossomos, microcromossomos.

A formação vegetal conhecida como mata de montanha, ou Yungas, distribui-se na vertente oriental da Cordilheira dos Andes, compondo uma faixa estreita com mais de 4000 km de comprimento, que se estende desde as matas das montanhas andinas da Venezuela (7° N) até a província Argentina de Catamarca (28° S) (Herrán *et al.* 2003).

O rei-do-bosque (*Pheucticus aureoventris*) é uma espécie habitante deste ecossistema que tem sofrido com as pressões exercidas pelo homem, como a destruição do seu hábitat e a caça furtiva para serem comercializados como animais de estimação. Isto, porque apresentam cores intensas e canto melódico. Distribui-se principalmente nas regiões da pré-cordilheira dos Andes (entre 1.700 até 3.700 metros de altitude), no Peru, Argentina e Bolívia, com alguns registros recentes para o norte de Chile, Brasil e Paraguai (Narosky e Yzurieta 1987).

Dentre as aves analisadas citogeneticamente, a ordem Passeriformes é a que possui o maior número de espécies

cariotipadas. No Brasil foram estudadas citogeneticamente aproximadamente 52 espécies (Carvalho 1989) e na Argentina apenas 15 espécies (Gunki *et al.* 2004). Além disso, as técnicas de bandeamento cromossômico (C, G ou NOR) foram aplicadas a um número ainda mais reduzido de espécies (Carvalho 1989).

O gênero *Pheucticus* é composto pelas espécies *P. chrysopleplus*, *P. tibialis*, *P. chrysogaster*, *P. ludovicianus*, *P. melanocephalus* e *P. aureoventris*. No entanto, dados citogenéticos são inexistentes para estes animais. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi determinar o número diplóide e os padrões de bandeamentos C e NOR de *P. aureoventris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas três fêmeas e dois machos de *P. aureoventris*, capturados mediante o uso de redes de neblina (*mist nets*) no Departamento General Belgrano, Província de Jujuy,

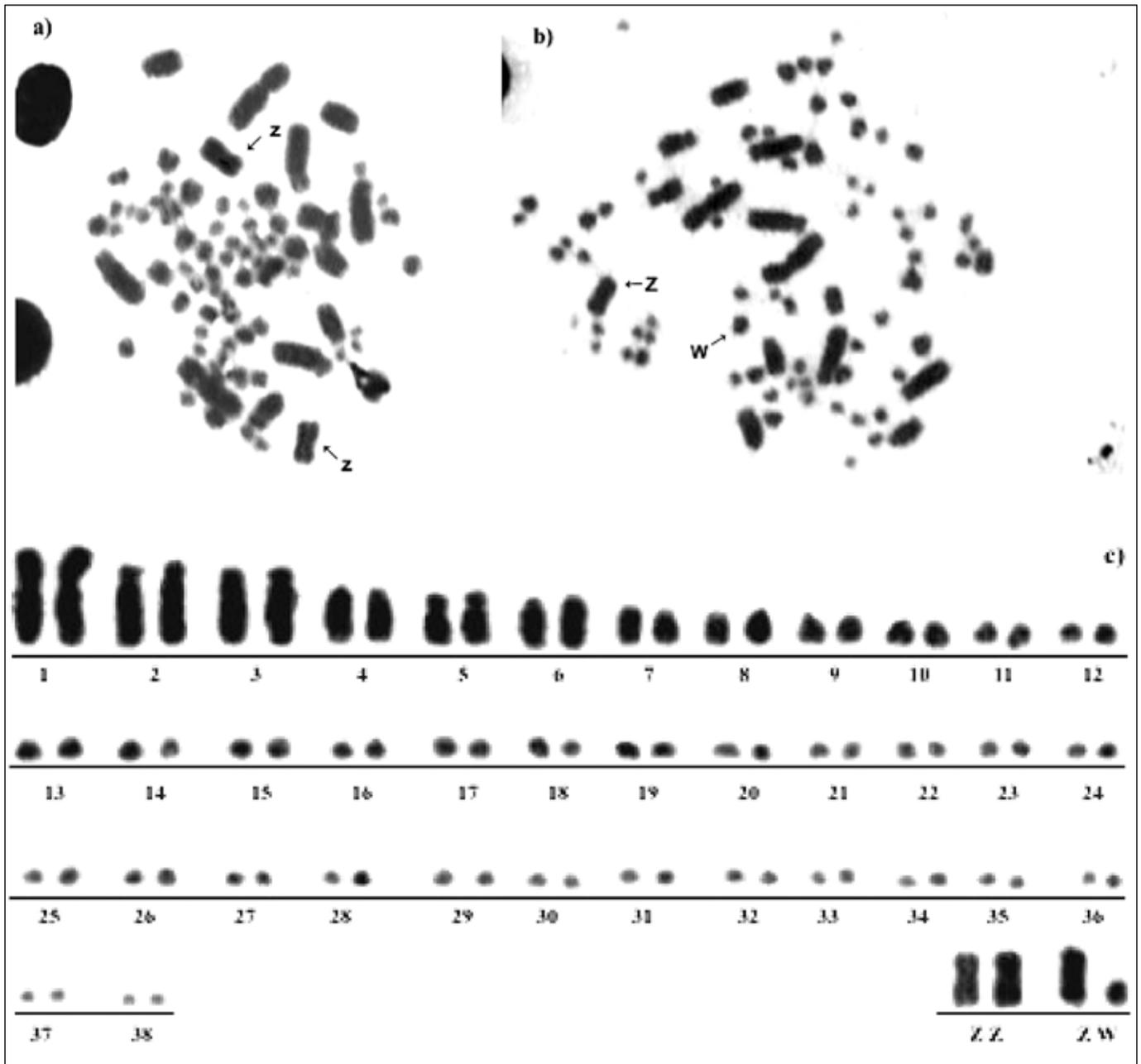


Figura 1. (a) Metáfase de macho, (b) metáfase de fêmea e (c) cariótipo completo de *Pheucticus aureoventris*, com número diplóide de $2n = 78$. As setas indicam os cromossomos sexuais Z e W.

Figure 1. Metaphases of (a) Male, (b) female and (c) complete karyotype of *Pheucticus aureoventris* (diploid number, $2n = 78$). The arrows indicate the sexual chromosomes.

Argentina ($24^{\circ}16'S$, $65^{\circ}07'W$). Para a obtenção das metáfases foi utilizada a técnica de cultura direta de medula óssea. Para a determinação do número diplóide foram analisadas 70 metáfases por indivíduo. As preparações foram analisadas com coloração convencional de Giemsa e com bandeamentos C e NOR, sendo as duas últimas realizadas seguindo-se os protocolos de Sumner (1972), com as modificações implementadas por Ledesma *et al.* (2002), e Howell e Black (1980), respectivamente. As metáfases foram fotodocumentadas utilizando-se um fotomicroscópio *Olympus CX31*, com uma câmera digital *Olympus C-5000 zoom*. Os cariótipos foram organizados segundo a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número diplóide observado para *P. aureoventris* foi $2n = 78$. O par um foi submetacêntrico e os pares dois, três e cinco foram submetacêntricos. Todos os elementos restantes do complemento foram telocêntricos. O cromossomo sexual Z se apresentou submetacêntrico, com tamanho intermediário entre os pares três e quatro. O cromossomo W foi submetacêntrico, equivalente em tamanho aos pares nove ou dez (Figura 1a, b e c).

O Bandejamento C mostrou que a heterocromatina está localizada principalmente nas regiões centroméricas dos microcromossomos, e que o cromossomo W é completamente hetero-

cromático. Nos macrocromossomos observaram-se tênues marcações centroméricas, além de bandas intersticiais nos braços longos dos maiores pares cromossômicos (Figura 2a). A análise das regiões organizadoras do nucléolo evidenciou marcações positivas em dois pares de microcromossomos (Figura 2b).

Fazendo-se as comparações de *P. aureoventris* com os dados de outros estudos realizados para a ordem Passeriformes, é possível observar que existe pouca variação na morfologia dos macrocromossomos. Dentro da subfamília Cardinalinae foram analisados até o momento apenas os cariótipos de *Saltator maximus*, *S. coerulescens*, *S. similis*, *Passerina brissonii* e *Cardinalis cardinalis* (Lucca 1974, Bass 1979, Cabanne *et al.* 1997, Carvalho 1989). *S. maximus* apresenta o número

diploide de $2n = 82$ e difere de *P. aureoventris* também na morfologia dos cromossomos sexuais, sendo o cromossomo Z subteloentríco e o W telocêntrico (Lucca 1974). *S. coerulescens* e *S. Similis* apresentam número diplóide de $2n = 86$ (Cabanne *et al.* 1997), e a principal diferença observada em relação a *P. aureoventris* é na morfologia do quinto par, o qual é telocêntrico. No que diz respeito ao bandeamento C, as diferenças observadas residem na distribuição homogênea da heterocromatina em *S. coerulescens* e *S. similis*. Neste último é possível se observar uma forte marcação centromérica nos cromossomos do par sete, e o cromossomo sexual Z apresenta os braços curtos completamente heterocromáticos, situação que não foi observada em *P. aureoventris*.

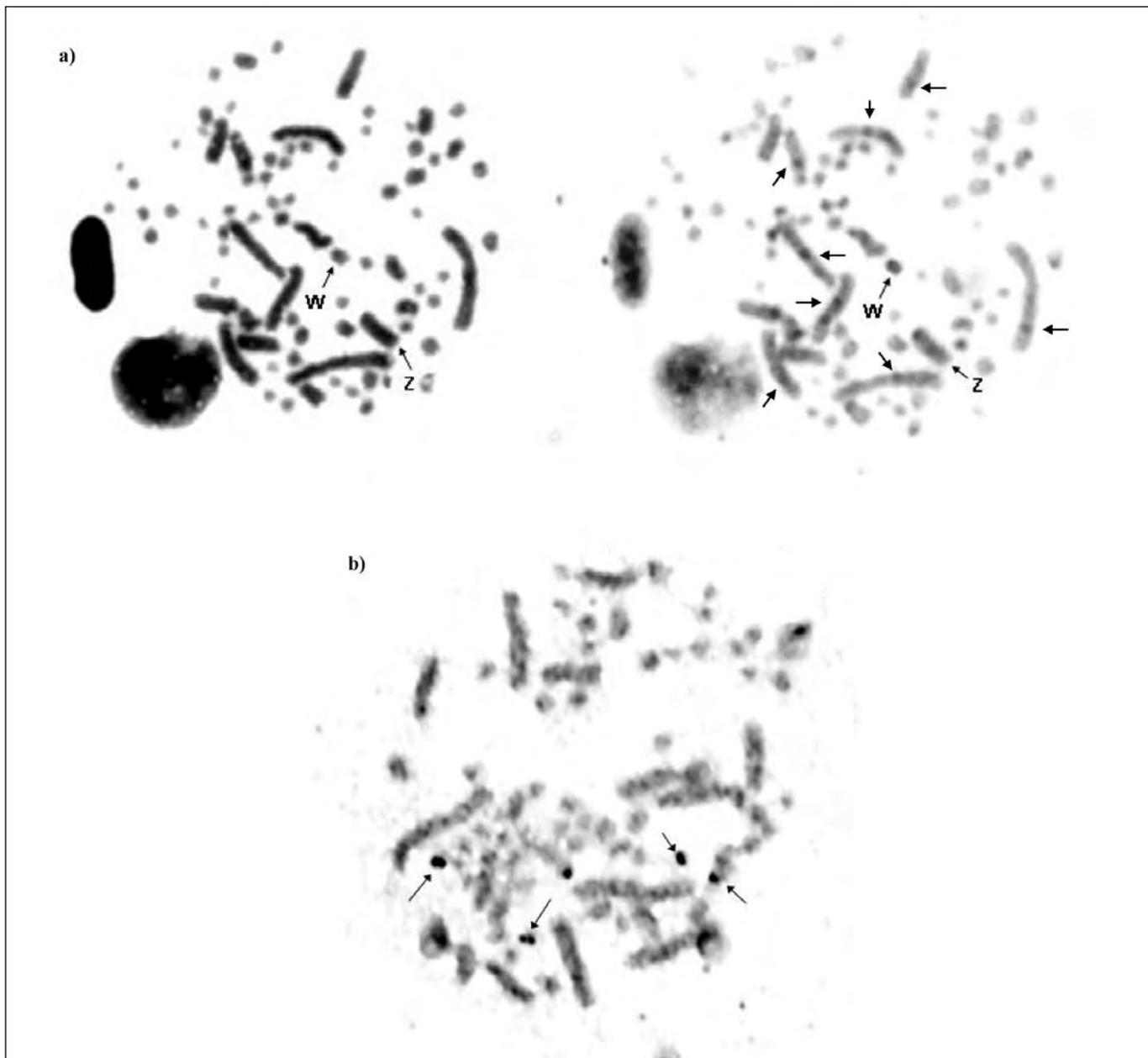


Figura 2. (a) Análise seqüencial Giemsa - Banda C de um exemplar fêmea de *Pheucticus aureoventris*. As setas indicam os cromossomos sexuais Z e W e as marcações intersticiais nos braços longos dos primeiros pares de macrocromossomos; (b) Regiões organizadoras do nucléolo de *P. aureoventris*, indicadas pelas setas.

Figure 2. (a) Sequential analysis, Giemsa-C banding, of a female *Pheucticus aureoventris*. The arrows indicate the sexual chromosomes, Z and W, as well as the interstitial marks occurring in the long arms of the first macrochromosome pairs; (b) NORs of *P. aureoventris* indicated by the arrows.

P. brissonii difere de *P. aureoventris* tanto no número diplóide, $2n = 76$, quanto na morfologia do cromossomo Z, o qual é metacêntrico (Carvalho 1989). No entanto, com relação a *C. cardinalis* (Bass 1979), a principal diferença observada é no número diplóide de $2n = 84$. Além disso, nesta espécie foi descrito um polimorfismo cromossômico no 5º par do complemento, o qual pode ser submetacêntrico ou subtlocêntrico. O cromossomo Z é subtlocêntrico e o W telocêntrico.

A partir dos resultados obtidos até o momento para a subfamília Cardinalinae, é possível observar que existem importantes variações no número diplóide, provavelmente causadas por rearranjos do tipo Robertsonianos. Os dados aqui apresentados representam um passo inicial para o entendimento da evolução cariotípica do gênero *Pheucticus*. Portanto, novos aportes para este grupo serão necessários para um correto entendimento das diferentes estratégias evolutivas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a valiosa colaboração do Dr. José Dipierri, do Laboratório de Genética do Hospital Dr. Héctor Quintana, San Salvador de Jujuy, Argentina, ao Dr. Ricardo Gunski da UFT, Dr. Andrés Delgado Cañedo e a Msc. Adriana Sassi da UFRGS, pela revisão crítica e pelos comentários que melhoraram substancialmente o presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- Bass, R. A. (1979) Chromosomal polymorphism in cardinal *Cardinalis cardinalis*. *Can. J. Genet. Cytol.* 21:459-553.
- Cabanne, G. S., R. J. Gunski, e J. R. Contreras (1997) Primeros resultados de estudios citogenéticos en *Saltator coerulescens* y *Saltator similis* (Aves: Emberizidae). Corrientes. Argentina: VI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral.
- Carvalho, M. W. (1989) *Estudos Citogenéticos na Família Fingillidae (Passeriformes: Aves)*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Universidade Federal de Rio Grande do Sul.
- Gunski, R. J., A. del V. Garnero, M. A. Ledesma e L. Pereira Dos Santos (2004) Resultados de 10 anos de pesquisas citogenéticas em aves da Argentina. Santa Catarina: *XII Congresso Brasileiro de Ornitologia*.
- Herrán, M., P. Perovic, P. Marconi, e N. Aguilera (2003) Las Yungas - Informe Completo. <http://www.jaguares.com.ar/yungas/descripcion.html>.
- Howell, W. M. e D. A. Black (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Ledesma, M. A., A del V. Garnero, e R. J. Gunski (2002) Análise do Cariótipo de duas espécies da Família Formicariidae (Aves: Passeriformes). *Ararajuba* 10:15-19
- Levan, A., K. Fredga, e A. Sandberg (1964) Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Lucca, E. J. (1974) Cariótipo de 14 espécies de Aves das Ordens Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* 7:253-263.
- Narosky T. e D. Yzurieta (1987) *Guía para la identificación de las Aves de Argentina y Uruguay*. Asociación Ornitológica del Plata.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.* 75:304-306.

Karyotype description of the Semicollared nighthawk, *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae)

Mercival Roberto Francisco^{1,2}, Vitor de Oliveira Lunardi¹, Caroline Garcia¹ e Pedro Manoel Galetti Junior¹

¹ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: mercivalfrancisco@uol.com.br

² Autor para correspondência

Recebido em 30 de agosto de 2005; aceito em 10 de março de 2006

RESUMO. Descrição cariotípica do Tuju, *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae). Os estudos sobre os padrões evolutivos dos cariótipos têm revelado importantes informações sobre as relações taxonômicas em diversos grupos de aves. No entanto, a ordem Caprimulgiformes é uma das menos conhecidas citotaxonomicamente. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi descrever o cariótipo de *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae) e contribuir com novos dados que possam auxiliar no esclarecimento da citotaxonomia deste grupo. Foi analisado um indivíduo jovem, de sexo indefinido, encontrado no *campus* da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células de tecido dérmico de penas em crescimento. Cinquenta e seis metáfases foram analisadas através da coloração convencional de Giemsa. O número diplóide observado foi $2n = 82$ cromossomos. Os pares 1, 6, 9 e 11 foram submetacêntricos, os pares 2, 4 e 5 subteloacêntricos, os pares 7, 8, 10 e 13 metacêntricos, os pares 3 e 12 telocêntricos e os demais foram microcromossomos com morfologia indefinida. Embora o número de espécies de Caprimulgiformes citogeneticamente conhecidas até o momento seja ainda muito pequeno para o estabelecimento de padrões citotaxonômicos gerais, dados preliminares demonstram uma grande variação cariotípica entre os táxons, tanto na morfologia quanto em número. Isto indica que os cariótipos possam ser uma ferramenta adicional para os estudos das relações taxonômicas das aves deste grupo.

PALAVRAS-CHAVE: Citogenética, cariótipo, Caprimulgiformes, citotaxonomia.

KEY WORDS: Cytogenetics, cariotype, Caprimulgiformes, cytotaxonomy

The Caprimulgiformes (nightjars, potoos and oilbird) are nocturnal birds mainly found in the Neotropical region (Sick 1997). This order traditionally includes five extant families: Caprimulgidae, Nyctibiidae, Steatornithidae, Aegothelidae and Podargidae (Mayr 2002). However, recent cladistic analyses of morphological characters have provided strong evidences that the Caprimulgiformes compose a paraphyletic group, which is supported by the monophyletism found between the members of the families Caprimulgidae, Nyctibiidae and Aegothelidae with representatives of the order Apodiformes (Mayr 2002). Besides, a monophyletism between the Trogoniformes and the representatives of the families Steatornithidae and Podargidae has also been proposed (Mayr 2003, Mayr and Clarke 2003). The phylogenetic relationship between Steatornithidae and Podargidae with the clade Caprimulgidae, Nyctibiidae, Aegothelidae/Apodiformes remains unresolved (Mayr 2002, 2003, Mayr and Clarke 2003), as well as the taxonomic relations within each of the families.

Studies on the evolutionary patterns of karyotypes have revealed information concerning the taxonomic relations in many bird groups, often becoming an important tool for systematics (Takagi and Sasaki 1974, Christidis 1986a, b, Francisco *et al.* 2001). However, Caprimulgiformes is one of the less citotaxonomically known orders (Belterman and De Boer 1984, Nieto and Gunski 1998).

In Brazil, this group is represented by 30 species distributed into three families: Caprimulgidae, Nyctibiidae and Steatornithidae (Sick 1997). Of all the Caprimulgiformes species known in the world, only seven present detailed karyotypic descriptions, five of them occurring in Brazil (Belterman and De Boer 1984, De Lucca and Waldrigues 1986, Nieto and Gunski 1998).

All this considered, the objective of this work was to describe the karyotype of *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae) and to contribute with new data that may help in the elucidation of the citotaxonomy of this bird group.

A nestling of unidentified sex was analyzed. It was found in the *campus* of São Carlos Federal University, São Carlos, southeastern Brazil (21°58', 47°52'). The mitotic chromosomes were obtained from dermal tissue cells of growing feathers following the technique described by Sandnes (1954), with the modifications suggested by Giannoni *et al.* (1993). The morphometric analyses of the chromosomes were performed according to Levan *et al.* (1964).

Fifty-six metaphases were analyzed through conventional Giemsa staining. The observed diploid number was $2n = 82$ chromosomes. Pairs 1, 6, 9 and 11 were submetacentric, pairs 2, 4 and 5 subteloacentric, pairs 7, 8, 10 and 13 metacentric, pairs 3 and 12 telocentric and the others were microchromosomes with undefined morphology (Figure 1). The identification of a sex chromosome pair was not possible. A comparison between the karyotypes of all cytogenetically known Caprimulgiformes species is presented in table 1.

Although the number of cytogenetically known Caprimulgiformes species is still very small, the preliminary data grouped in table 1 regarding both morphology and number demonstrate a large karyotypic variation between the taxa. It permits the use of karyotypes as an additional tool for taxonomic studies on this group.

Nieto and Gunski (1998) classified the chromosomes with subterminal centromeres as acrocentric, in substitution to the subteloacentric category. In order to make comparisons compatible, these chromosomes were considered as subteloac-

Table 1. Diploid number and morphology of the different chromosome pairs of Caprimulgiformes species already karyotyped.

Family / Species	2n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Z	W
PODARGIDAE																
<i>Podargus strigoides</i> (Belterman and De Boer 1984)	72	SM	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	-	-
CAPRIMULGIDAE																
<i>Nictidromus albicollis</i> (De Lucca and Waldrigues 1986)	78	ST	ST	ST	ST	ST	ST	SM	T	T	T	T	T	T	M	M
<i>Hidropsalis brasiliiana</i> (Nieto and Gunski 1998)	74	T	ST	T	ST	ST	SM	SM	M	SM	M	T	T	T	ST	M
<i>Chordeiles pusillus</i> (Nieto and Gunski 1998)	68	ST	T	T	SM	T	T	ST	M	ST	T	-	-	-	SM	T
<i>Caprimulgus parvulus</i> (Nieto and Gunski 1998)	72	M	SM	SM	SM	M	M	SM	M	M	M	-	-	-	SM	T
<i>Caprimulgus rufus</i> (Nieto and Gunski 1998)	78	ST	ST	T	ST	ST	ST	ST	M	ST	ST	-	-	-	M	M
<i>Lurocalis semitorquatus</i> (present work)	82	SM	ST	T	ST	ST	SM	M	M	SM	M	SM	T	M	-	-

2n = diploid number, M = metacentric, SM = submetacentric, ST = subtelocentric, T = telocentric.

tric. Still, Belterman and De Boer (1984) used the acrocentric category to classify the chromosomes with terminal centromeres. Here, these were considered as telocentrics.

In *P. strigoides*, even for an individual anatomically confirmed as a female, the identification of a sex chromosome

pair was not possible (Belterman and De Boer 1984). These authors suggest that the Z and W chromosomes are microchromosomes, which would hinder their identification. In *L. semitorquatus*, the sex chromosomes were not identified, probably due to the fact that the only analyzed individual could be a male (ZZ), or, like in *P. strigoides*, the sex chromosomes are microchromosomes. Future studies using a larger number of individuals may confirm the localization of the sex chromosome pair in this species.

Even though the phylogenetic relationships of Caprimulgiformes with other bird groups are still controversial (Mayr 2002, 2003, Mayr and Clarke 2003), some authors have suggested that Podargidae, together with Steatornithidae, are closer to the Strigiformes than to Caprimulgidae, Nyctibiidae and Aegothelidae, being more plesiomorphic within the Caprimulgiformes phylogeny (Mayr 2003). If this is ever confirmed in the future, the predominance of telocentric elements in *P. strigoides* would make up a basal karyotype that would have originated karyotypes with variable numbers of elements with median or subterminal centromeres. The great variation observed between the diploid numbers of the different species suggests that chromosomal fusions and fissions may have been responsible for the divergence. However, only the analysis of a larger number of species considering not only morphology and diploid number, but also chromosome bandings, will allow a clear elucidation of the cytotaxonomical relationships of the Caprimulgiformes.

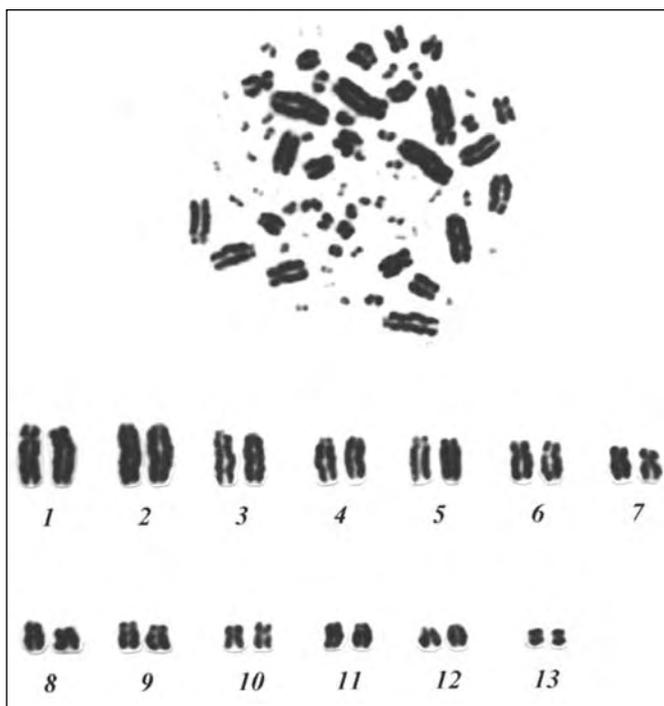


Figure 1. Karyogram of *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae).

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho for the identification of the specimen and two anonymous referees for their important suggestions that contributed to the improvement of this manuscript. V. O. Lunardi and C. Garcia were financially aided by PIBIC/CNPq, M. R. Francisco by CAPES and P. M. Galetti Junior by CNPq and FAPESP.

REFERENCES

- Belterman, R. H. R. and L. E. M. De Boer (1984) A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. *Genetica* 65:39-82.
- Christidis, L. (1986a) Chromosomal evolution within the family Estrildidae (Aves) I. The Poephilae. *Genetica* 71:81-97.
- _____ (1986b) Chromosomal evolution within the family Estrildidae (Aves) II. The Lonchurae. *Genetica* 71:99-113.
- De Lucca, E. J. and A. Waldrigues (1986) Karyotype of *Nyctidromus albicollis* (Caprimulgiformes: Aves). *Egypt. J. Genet. Cytol.* 15:157-158.
- Francisco, M. R., V. O. Lunardi. and P. M. Galetti Junior (2001) Chromosomal evidences of adaptive convergence in the tail morphology of Neotropical Psittacidae (Aves, Psittaciformes). *Cytologia* 66:329-332.
- Giannoni, M. L., F. Foresti, C. Falcone and P. A. Tosta (1993) An inexpensive method for chromosome preparations from feather pulp in birds, using short term treatment with colchicine *in vitro*, demonstrated on *Amazona amazonica* (Psittacidae). *Brazil. J. Genetics* 16:477-483.
- Levan, A., K. Fredga and A. Sandberg (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Mayr, G. (2002) Osteological evidence for parphyly of the Avian order Caprimulgiformes (nightjars and allies). *J. Ornithol.* 143:82-97.
- _____ (2003) On the phylogenetic relationships of trogons (Aves, Trogonidae). *J. Avian Biol.* 34:81-88.
- _____ and J. Clarke (2003) The deep divergences of Neornithine birds: a phylogenetic analysis of morphological characters. *Cladistics* 19:527-553.
- Nieto, L. M. and R. J. Gunski (1998) Estudios cromossomicos en atajacaminos (Aves, Caprimulgidae). *Bol. Soc. Biol. Concepción* 69:161-169.
- Sandnes, G. C. (1954) A new technique for the study of avian chromosomes. *Science* 119:508-509.
- Sick, H. (1997) *Ornitologia brasileira, uma introdução*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.
- Takagi, N. and M. Sasaki (1974) A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma* 46:91-120.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ornitologia para a destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro.

Márcio Amorim Efe^{1,2}, Claiton Martins-Ferreira^{1,3}, Fabio Olmos^{1,4}, Leonardo Vianna Mohr^{1,5} e Luís Fábio Silveira^{1,6}

¹ Grupo de estudos sobre destinação de aves silvestres da Sociedade Brasileira de Ornitologia.

² Programa de Pós-graduação em Zoologia – PUCRS. marcio_efe@yahoo.com.br

³ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal – UFRGS. claiton.ferreira@ufrgs.br

⁴ Consultor autônomo f-olmos@uol.com.br

⁵ leovmohr@portoweb.com.br

⁶ Departamento de Zoologia e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. lfsilvei@usp.br

ABSTRACT. Guidelines from the Sociedade Brasileira de Ornitologia for birds taken from poaching and captivity. Brazil has one of the greatest bird diversities in the world, and is one of the most important places for bird conservation. However, Brazilian birds suffer from a tremendous pressure due to illegal trade in wildlife. The Sociedade Brasileira de Ornitologia is very concerned with the lack of technical guidelines, herein contributes to the standardization of protocol for handling animals taken from illegal trade, by the establishment of the Wild Bird Traffic Working Group. One of the greatest problems of birds coming from poaching and captivity is where to place them after recovery, due the lack space in zoos and others institutions. Additionally, it is very expensive to maintain a large number of birds in captivity. We believe that the placement of birds recovered from illegal traffic or captivity must have an explicit conservation goal, with attention focused on populations and communities rather than individuals. We suggest that recovered animals be classified into the following categories: 1) birds important for conservation, 2) already many in captivity, 3) less common, but captive interests, and 4) debilitated animals. We present a classification tree for decision-making with steps and justification for each choice. The goal of these suggestions is to contribute to political decision-making with respect to the conservation of Brazilian biodiversity. These guidelines reflect the opinion of the majority of Brazilian ornithologists who are affiliated with the Sociedade Brasileira de Ornitologia.

KEY WORDS: confiscated birds, conservation, destination, selection, wildlife poaching.

RESUMO. O Brasil reúne uma das maiores riquezas em avifauna do mundo, o que torna o país um dos mais importantes em relação a investimentos em conservação. Por outro lado o país sofre forte pressão do tráfico de animais silvestres. Preocupada com a falta e o cumprimento de diretrizes técnicas definidas para destinação de fauna silvestre e como forma de contribuir para a padronização destas de modo a conduzir o processo de destinação por uma via conservacionista mais eficiente, a Sociedade Brasileira de Ornitologia instituiu um grupo de estudo para analisar o tema e propor diretrizes que venham a nortear o processo de destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro visando a conservação das espécies e suas populações naturais. Um dos grandes problemas da triagem de animais apreendidos e provenientes de cativeiro é a dificuldade de se destinar indivíduos diante de um quadro caótico de superpopulação nas instituições que os recebem. Outro problema freqüente é o alto custo de manutenção de cativeiros e gastos com funcionários, alimentação e medicamentos e, por outro lado, a carência de recursos para o combate ao tráfico e para bons programas de conservação. Portanto, é primordial que o processo de apreensão/destinação de animais oriundos do tráfico ou do cativeiro tenha um caráter mais conservacionista, preocupando-se com a espécie, as comunidades e/ou o ecossistema, do que “salvador”, focando apenas no indivíduo apreendido. Por considerarmos prioritária a concentração dos esforços e dos poucos recursos disponíveis nos animais com problemas de conservação, sugerimos a divisão dos animais apreendidos/confiscados nas categorias “animais com problema de conservação” e “outros”, que são ainda subdivididos em “excedentes”, “animais menos comuns de interesse para cativeiro” e “animais acidentados/debilitados”. O trabalho apresenta um fluxograma de decisões com passos e justificativas com objetivo de contribuir na construção de políticas públicas adequadas à conservação da biodiversidade brasileira. As diretrizes acima refletem a opinião majoritária dos ornitólogos brasileiros sobre as possibilidades de destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro, representando um importante passo participativo desta sociedade científica.

PALAVRAS-CHAVE: aves apreendidas, conservação, destinação, tráfico de animais silvestres, triagem.

O Brasil reúne uma das maiores riquezas em avifauna do mundo com mais de 1700 espécies, das quais mais de 10% são endêmicas, o que torna o país um dos mais importantes em relação a investimentos em conservação (Sick 1997). Por outro lado, o país sofre forte pressão do tráfico de animais silvestres (RENTAS 2002).

Segundo Le Duc (1996), o tráfico de animais silvestres é o terceiro maior comércio ilegal do mundo, perdendo apenas para o tráfico de drogas e de armas. De acordo com informações do IBAMA (http://www.ibama.gov.br/fauna/trafico/downloads/dados_2002.pdf), no Brasil, cerca de 82% dos animais apreendidos são aves. Ferreira e Glock (2004) afirmam que as aves silvestres mais freqüentemente capturadas são os

Passeriformes e Wright *et al.* (2000) listam também os Psitacíformes.

De acordo com a Declaração de Princípio da IUCN (2000), quando animais selvagens são confiscados por autoridades governamentais, as mesmas são responsáveis pela sua destinação de forma apropriada. Em um contexto conservacionista e de leis nacionais e internacionais, a decisão máxima sobre a disposição de animais confiscados deve atingir três pontos: 1) maximizar o valor conservacionista dos animais, sem qualquer prejuízo para sua saúde, comportamento e características genéticas, ao *status* de conservação de populações das espécies selvagens ou de cativeiro ou à biota nativa; 2) não incentivar o comércio ilegal ou irregular e 3) fornecer uma solução

clara para o problema, mesmo que esta envolva a manutenção de animais em cativeiro, a sua reintrodução à natureza ou o emprego da eutanásia.

A devolução dos animais à natureza é freqüentemente a solução escolhida pelos órgãos de fiscalização e gestão de fauna e tem grande simpatia e apoio popular. Entretanto, tal ação tem um alto potencial de risco aos ambientes e às populações naturais e geralmente traz poucos benefícios à conservação (IUCN 2000). De acordo com Marini e Garcia (2005) a maioria dos espécimes capturados ilegalmente é libertada em locais impróprios (fora de sua distribuição geográfica original) e sem uma avaliação apropriada de seu estado sanitário, sendo o efeito dessas solturas desconhecido.

A Declaração de Necessidade da IUCN (2000) afirma que o aumento na regulamentação do comércio e o reforço da legislação pertinente resultaram no aumento do número de animais selvagens confiscados por agências governamentais. Em alguns casos, o confisco é o resultado do comércio ilegal e, em outros, é a resposta a outras irregularidades, tais como a captura ilegal para cativeiro, a coleta de filhotes caídos de ninho, as doações a familiares, etc. O grande número de animais apreendidos e a necessidade de que estes sejam manejados de forma responsável, pressionam as autoridades para lidar adequadamente com essas situações. Em muitos países, a prática geral é doar animais confiscados para zoológicos ou aquários; entretanto, esta opção está se tornando pouco viável, pois estes geralmente não podem acomodar as grandes quantidades de animais que são disponibilizados. Além dos recursos necessários para abrigá-los e administrar cuidados veterinários, essas instituições freqüentemente estão pouco interessadas em espécies comuns, que correspondem à grande maioria dos animais apreendidos. A comunidade internacional de zoológicos reconheceu que alojar animais de baixa prioridade conservacionista, considerando-se as limitações de espaço físico e verbas, pode beneficiar tais indivíduos, mas pode diminuir os esforços conservacionistas como um todo. Assim, estão estabelecendo prioridades para limitar o espaço em jaulas (IUDZG/CBSG 1993), reduzindo sua disponibilidade em receber animais confiscados. Desta forma, há uma tendência crescente em lidar com o problema da disposição de animais confiscados por meio da soltura na natureza. Em alguns casos, a soltura de animais confiscados em áreas de populações selvagens tem sido feita depois de uma cuidadosa avaliação, considerando-se as diretrizes técnicas existentes (IUCN 1987, IUCN 1998). Em outros casos, tais solturas não foram bem planejadas e foram inconsistentes com os objetivos conservacionistas e o bem-estar animal. Animais reintroduzidos em habitats inapropriados estão condenados a não obter alimento e morrer de causas para as quais não se encontram preparados. Além da questão do bem-estar, as reintroduções, translocações e revigoramentos (IUCN 1995) podem causar um impacto negativo ao ameaçar populações selvagens existentes (Wanjtal e Silveira 2000, Jiménez e Cadena 2004).

Preocupada com a falta e o cumprimento de diretrizes técnicas definidas para destinação de fauna silvestre e como for-

ma de contribuir para a padronização destas de modo a conduzir o processo de destinação por uma via conservacionista eficiente, a Sociedade Brasileira de Ornitologia, reunida durante a Assembléia Geral Ordinária ocorrida no XII Congresso Brasileiro de Ornitologia em novembro de 2004, instituiu um Grupo de Estudo para analisar o tema e propor diretrizes que venham a nortear o processo de destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro, visando a conservação das espécies e suas populações naturais.

Assim, os membros deste grupo elaboraram um fluxograma de decisões (figura 1), o qual está a seguir apresentado e justificado a seguir.

CHAVE DE DECISÃO E JUSTIFICATIVAS

Passo 1 - Caso a apreensão seja executada em flagrante, ou seja, os apanhadores ainda estiverem no ambiente natural, e tendo-se certeza de que as aves foram capturadas naquela ocasião, deve se proceder à soltura imediata das aves no mesmo local. Caso a apreensão seja feita em trânsito, na casa ou depósito do traficante, ou não havendo certeza de onde as aves foram capturadas, seguir para o passo 2.

Um dos grandes problemas da triagem é a dificuldade de se destinar indivíduos diante de um quadro caótico de superpopulação nas instituições que os recebem, devido à quantidade excessiva de animais apreendidos. Outro problema freqüente é o alto custo de manutenção de cativeiros e gastos com funcionários, alimentação e medicamentos e, por outro lado, a carência de recursos para o combate ao tráfico e para bons programas de conservação. Portanto, é primordial que o processo de apreensão/destinação de animais oriundos do tráfico ou do cativeiro tenha um caráter mais conservacionista, preocupando-se com a espécie, as comunidades e/ou o ecossistema, do que “salvador”, focando apenas no indivíduo apreendido. Por considerarmos prioritária a concentração dos esforços e dos poucos recursos disponíveis nos animais com problemas de conservação, sugerimos a divisão dos animais apreendidos/confiscados em duas categorias: 1) animais com problema de conservação (ameaçados ou com problemas populacionais) e 2) outros, que são ainda subdivididos em “excedentes”, “animais menos comuns de interesse para cativeiro” e “animais acidentados/debilitados”.

No passo 2, o CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) fará a triagem e destinará os animais de acordo com as divisões acima.

Passo 2 – As aves serão encaminhadas ao CETAS mais próximo para a destinação.

Por definição a principal função do CETAS é a Triagem, ou seja, a realização de procedimentos básicos (identificação da espécie, avaliação da condição do animal, categorização no fluxograma apresentado na figura 1 e providências para a

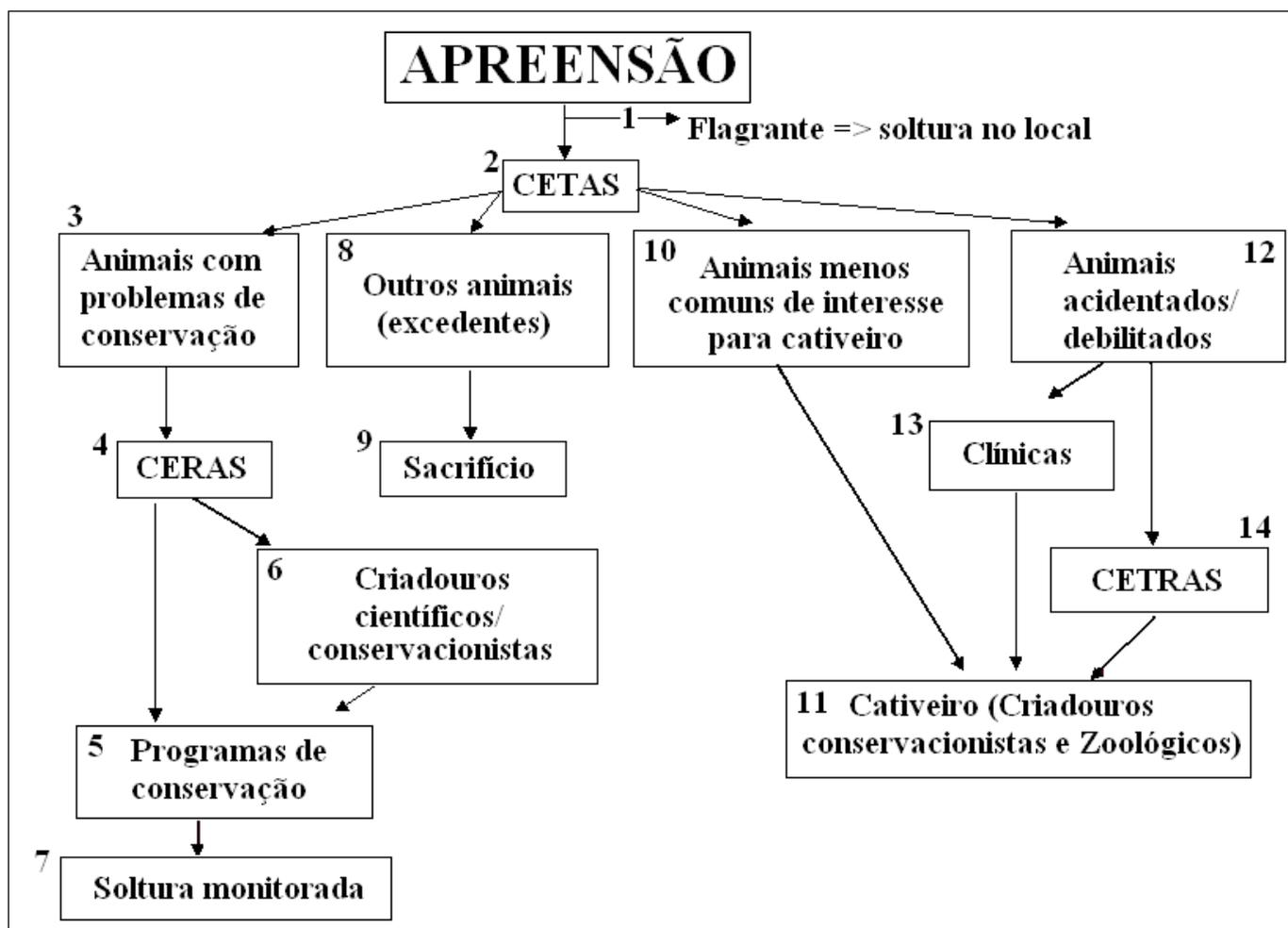


Figura 1. Fluxograma de decisões. Os números referem-se aos passos descritos no texto.

Figure 1. Protocol of destination. Numbers are referred to steps described in the text.

destinação) e a “imediata” destinação da ave. Esta “imediata” destinação pode ocorrer em algumas horas ou no máximo em alguns dias para que não comprometa a condição do animal nem a capacidade de suporte do CETAS.

De acordo com a Lei nº 5.197/67, que dispõe sobre a proteção à fauna, “animais de quaisquer espécies, em qualquer fase do seu desenvolvimento e que vivem naturalmente fora do cativeiro, constituindo a fauna silvestre, bem como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais são propriedades do Estado”. A Portaria nº 230, de 14/5/2002, aprova o Regimento Interno do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o qual indica, em seu Art. 1º, que esta entidade tem como uma de suas finalidades “executar as políticas nacionais de meio ambiente referentes às atribuições federais permanentes, relativas à preservação, à conservação e ao uso sustentável dos recursos ambientais e sua fiscalização e controle”. Desta forma, o responsável pela destinação de fauna apreendida no Brasil é o IBAMA. Sendo assim, entendemos que o CETAS deve ser, exclusivamente, um órgão do IBAMA e apresentar uma estrutura simples instalada nos Núcleos de Fauna e/ou escritórios regionais do IBAMA interligados entre si através da rede interna de informática deste Instituto e coordenados por Analistas Ambientais.

Ao dar entrada no CETAS o animal deve receber uma marcação individualizada (anilha) e ser cadastrado no sistema em um Protocolo de Acompanhamento, o qual deverá ser preenchido pelo CETAS quando do recebimento do animal e onde deverá constar uma série de dados sobre o indivíduo (data de entrada no CETAS, procedência, espécie, condição física, destino, etc). Estes dados alimentarão o banco de dados do IBAMA e deverão estar à disposição de todos os inseridos no processo. A partir deste momento, o destino das aves seria acompanhado pela Coordenação Geral de Fauna do IBAMA, que coordenaria e integraria todos os CETAS, criadouros autorizados e programas de conservação. Aqui abordamos a destinação de aves, mas isto pode ser aplicado aos demais grupos animais.

Uma vez que a triagem é primordial para a correta destinação da ave após sua entrada no CETAS, é fundamental que este tenha técnico(s) capacitado(s) para identificação da espécie, incluindo bibliografia especializada. Neste sentido, é importante fomentar a elaboração de guias ilustrados das aves mais comumente apreendidas, respeitando as particularidades regionais. Especial atenção deve ser dada às espécies incluídas nas listas regionais e nacional de fauna ameaçada de extinção. Sugerimos a implementação de um banco de dados com as espécies de conhecimento insuficiente e de interesse

de conservação que geralmente não constam nas listas oficiais de fauna ameaçada.

Passo 3 – Se a espécie encontra-se em alguma lista de fauna ameaçada de extinção ou suspeita-se que enfrenta declínio populacional, ir para o passo 4.

Passo 4 – O CERAS (Centro de Reabilitação de Animais Silvestres) será o responsável pela execução da quarentena, do protocolo de exames (incluindo sanidade e caracterização genética) e da reabilitação da ave, caso não haja um programa de conservação específico. Se este último existir para a espécie recebida pelo CERAS, ir para o passo 5. Caso negativo, ir para o passo 6.

Por definição o CERAS será responsável pela reabilitação das aves (condições de vôo, reaprendizagem alimentar, etc) com intuito de retorná-las à natureza. Receberá apenas animais saudáveis, com boa condição física e pode ser uma das estruturas de um programa de conservação ou um Criadouro Conservacionista e/ou Científico com esta estrutura especializada.

Passo 5 – O Programa de Conservação receberá a ave, incorporando-a ao plantel, visando à recomposição do *status* populacional da espécie. O Programa pode destinar o indivíduo para servir como matriz ou, se houver condições de soltura, seguir para o passo 7.

O Programa deve ter em seu quadro técnico ornitólogos experientes e será supervisionado pelo IBAMA. O Programa pode ser investigativo, ou seja, acompanhado de um projeto de pesquisa que pretende estudar, avaliar e/ou aplicar métodos que levem à conservação da espécie, e/ou manipulativo, ou seja, que já esteja consolidado e com atividades de reintrodução/translocação definidas.

Passo 6 – Caso não haja ainda nenhum programa de conservação com a espécie, a mesma deve ser encaminhada para criadouros conservacionistas e/ou científicos, onde ficará à disposição de futuros programas.

Passo 7 – Caso as premissas do programa sejam atendidas e existam condições do indivíduo voltar à natureza, o programa de conservação, se assim entender, efetuará a soltura da ave, que estará marcada. Assim, o indivíduo passará a ser monitorado (fornecendo, entre outras, informações sobre comportamento, reprodução e sobrevivência), bem como informações a respeito da população na qual foi inserido.

Como premissas, sugerimos que na normatização da instalação de programas de conservação, deverão constar atividades preliminares que, embasadas cientificamente, obtenham informações detalhadas sobre áreas potenciais de soltura, incluindo, entre outras, riqueza, tamanhos populacionais, caracterizações genéticas e patógenos/parasitos. Deverão existir atividades

rotineiras que analisem se os indivíduos a serem soltos estão realmente em condições para tal, tendo-se conhecimento, entre outros, de quais patógenos/parasitos apresentam, do local de origem (qual população), se têm capacidade de identificar e buscar a alimentação natural da espécie, se têm capacidade real de vôo e se reconhecem predadores. É fundamental o posterior monitoramento, indicando se o animal marcado está cumprindo na natureza com suas necessidades biológicas e funções ecológicas e também se a comunidade da qual faz parte permanece sem alterações devido à sua presença.

Para qualquer iniciativa conservacionista é necessário o aporte de recursos financeiros. Assim, sugerimos algumas ações que podem estimular a implantação dos programas de conservação: (1) estimular os criadouros conservacionistas e/ou científicos a atuarem também em programas de conservação, aproveitando a estrutura de manutenção dos animais já existente e a fonte de renda obtida a partir da exploração direta ou indireta da avifauna em cativeiro para criar projetos de pesquisa associados; (2) o governo brasileiro, por meio do IBAMA, pode solicitar aos órgãos de fomento (p. ex. FNMA, PROBIO, CNPq e CAPES) que sejam abertos editais para financiar a implantação e o funcionamento destes programas; (3) realizar conversão de multas ambientais para financiar os programas; (4) obter, por meio de elaboração de normatização específica, uma contrapartida financeira dos criadouros comerciais pelo uso da fauna brasileira como fonte de renda. Esta renda deverá estar atrelada a um fundo específico, devendo ser utilizada exclusivamente para programas de conservação.

Passo 8 – Se for uma espécie comumente apreendida e nenhum criadouro/zoológico tiver condições de recebê-la, ir para o passo 9.

Passo 9 – A ave com excedente populacional em cativeiro será sacrificada, de acordo com o protocolo de eutanásia.

Tal sugestão certamente não será simpática à sociedade em geral, mas deve ser considerada uma alternativa válida, sob o ponto de vista técnico, e não emocional. Por isso mesmo, atualmente vem sendo aceita como uma prática viável e de cunho conservacionista. De acordo com as diretrizes da IUCN sobre a disposição de animais confiscados (Aprovada no 51º Encontro do Conselho da IUCN, em Gland, Suíça, em fevereiro de 2000) a eutanásia (ou sacrifício, como preferimos denominar), deve ser considerada uma alternativa válida. Embora possa parecer contraproducente, há diversas razões que justificam sua prática, incluindo: (1) em muitas circunstâncias, como o caso de animais extremamente debilitados ou quando há superpopulação em jaulas/gaiolas, o sacrifício é a melhor opção justamente quanto ao bem-estar dos animais confiscados; (2) o sacrifício elimina os riscos genéticos e ecológicos que a reintrodução possa causar às populações selvagens e ecossistemas; (3) o sacrifício elimina o sério risco de propagação de doenças às populações de animais selvagens e de cativeiro.

Outro ponto a ser considerado é a atual existência - nos

criadouros que atuam como fiéis depositários do IBAMA, nos zoológicos e CETAS atuais - de um grande plantel das espécies mais comumente apreendidas, as quais poderão servir de matriz e/ou reforço genético/populacional caso estas espécies venham a ter futuros problemas de conservação, ou caso seja implantado um programa que vise à reintrodução ou reforço populacional. Neste caso, sacrificar o excedente torna-se uma opção viável.

Diante da oportunidade de obtenção de outras informações importantes para o conhecimento biológico e a conservação das espécies, sugere-se que as aves sacrificadas, assim como todas as outras que venham a morrer durante qualquer fase do processo de destinação, sejam doadas e/ou depositadas em instituições científicas para guarda e/ou uso científico ou didático, respeitando-se a legislação pertinente.

Passo 10 – Tratando-se de espécie sem problemas de conservação, “que raramente é apreendida e/ou existem criadouros/zoológicos interessados”, ir para o passo 11.

Passo 11 – O indivíduo será encaminhado para o cativeiro (criadouro/zoológico) que apresentar melhores condições de recepção e manejo.

Passo 12 – Tratando-se de animal machucado ou que necessite de outros cuidados clínico-veterinários intensos e/ou duradouros, e o CETRAS (Centro de Tratamento de Animais Silvestres) não tiver condições de executá-los, ir para o passo 13. Caso negativo, ir para o passo 14.

Por definição o CETRAS será responsável pelo tratamento clínico das aves e receberá apenas os animais com dificuldades de sobrevivência (com dificuldades de se alimentar sozinhos ou aqueles com deficiências físicas permanentes) e que não apresentam condições de retorno à natureza, mas que os criadouros têm interesse.

Usualmente, o estresse causado pela captura e manutenção em cativeiro, aliado à espera pela destinação é tanto que muitos indivíduos podem não agüentar a viagem até o próximo destino. Assim, em certos casos, torna-se importante que, ao saírem do CETAS, seja qual for a destinação final, os animais sejam atendidos em um CETRAS ou clínica veterinária conveniada, para receber cuidados básicos.

É importante ressaltar que estas novas “instâncias” (CETRAS e CETRAS) não necessariamente são estruturas físicas independentes, nem precisam estar isoladas. As mesmas podem ser apenas “títulos” ou parte de uma estrutura maior, como um criadouro ou programa de conservação. A separação proposta está unicamente na definição, uma vez que cada instância tem um objetivo específico no atendimento à ave destinada. Torna-se importante que cada uma siga uma normatização específica para sua instalação, que aporte estrutura física, pessoal e equipamentos necessários para a execução de sua função específica, ou seja, atenda completamente a necessidade para a qual foi criada.

Passo 13 – Caso não exista um CETRAS próximo e seja prioritário administrar cuidados veterinários às aves debilitadas, as clínicas veterinárias conveniadas ao IBAMA receberão o título de CETRAS, podendo recebê-las. Quando cessarem os procedimentos, estas clínicas encaminharão os animais de volta ao CETAS, ou diretamente ao criadouro/zoológico determinado pelo CETAS.

Passo 14 – Caso exista um CETRAS próximo, as aves deverão ser encaminhadas diretamente para este, sendo o mesmo responsável pela reabilitação da ave até que esta esteja em condições de ser mantida em cativeiro.

O Brasil possui atualmente 1.796 espécies de aves (CBRO 2006), o que o torna o segundo país do mundo quanto à riqueza de aves. Vivemos num país que possui muitas diferenças regionais e uma variedade de ecossistemas que gera uma grande riqueza de fauna e flora, constantemente ameaçada pelo progresso a todo custo. Entendemos que, para o combate ao tráfico de animais silvestres, diversas ações - mais eficientes e rigorosas - devem ser tomadas.

A Sociedade Brasileira de Ornitologia (SBO) reúne os mais renomados especialistas em aves do Brasil, os quais detêm importantes conhecimentos sobre a biologia, distribuição e ecologia de aves. Estes conhecimentos geralmente estão disponíveis de uma forma mais restrita (como em forma de publicações científicas) e nem sempre estão acessíveis à sociedade leiga ou aos gestores dos recursos naturais brasileiros. Por entender que a SBO pode contribuir na construção de políticas públicas adequadas à conservação da biodiversidade brasileira, as diretrizes acima refletem a opinião majoritária dos ornitólogos brasileiros sobre as possibilidades de destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro, representando um importante passo participativo desta sociedade científica.

REFERÊNCIAS

- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2006). *Listas das aves do Brasil. Versão 10/2/2006*. <http://www.cbro.org.br> (acesso em 14/03/2006).
- Ferreira, C. M. e L. Glock (2004) Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 12: 21-30.
- Jiménez, I e C. D. Cadena (2004) Por qué no liberar animales silvestres decomisados. *Ornitologia Colombiana* 2: 53-57.
- IUCN (1987) A posição da IUCN sobre a migração de organismos vivos: introduções, reintroduções e reforços. IUCN: Gland, Suíça. <http://iucn.org/themes/ssc/pubs/policy/index.htm> (acesso em 25/08/2005).

- _____ (1995) IUCN/SSC Guidelines for Re-Introductions. Aprovadas no 41º Encontro do Conselho da IUCN: Gland, Suíça. <http://www.iucn.org/themes/ssc/pubs/policy/reinte.htm> (acesso em 25/08/2005).
- _____ (1998) Diretrizes da IUCN para Reintroduções. Preparado pelo IUCN/SSC Grupo de Especialistas em Re-introduções. Gland: Suíça e Cambridge, UK. <http://iucn.org/themes/ssc/pubs/policy/index.htm> (acesso em 25/08/2005).
- _____ (2000) Diretrizes da IUCN sobre a disposição de animais confiscados. Aprovado no 51º Encontro do Conselho da IUCN: Gland, Suíça. <http://iucn.org/themes/ssc/pubs/policy/index.htm#anchor298469> (acesso em 25/08/2005).
- IUDZG/CBSG (IUCN/SSC) (1993) *The World Zoo Conservation Strategy: the Role of the Zoos and Aquaria of the World in Global Conservation*. Executive Summary. Chicago: Chicago Zoological Society.
- Le Duc, J. P. (1996) Trafficking in animals and plants: a lucrative form of crime. *International Criminal Police* 458/459: 19-31.
- Marini, M. A. e F. I. Garcia (2005) Bird Conservation in Brazil. *Cons. Biol.* 19: 665-671.
- RENTAS (2002) 1º relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Brasília: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (RENTAS).
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira.
- Wanjtal, A. e Silveira, L. F. (2000) A soltura de aves contribui para a sua conservação? *Atualidades Ornitológicas* 98: 7.
- Wright, S.J., H. Zeballos, I. Domínguez, M.M.Gallardo, M.C. Moreno e R. Ibáñez (2000) Poachers alter mammal abundance, seed dispersal, and seed predation in a neotropical forest. *Cons. Biol.* 14: 227-239.