



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM ZOOLOGIA**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTUDO
POPULACIONAL DE *Antilophia bokermanni* (AVES: PIPRIDAE)
COM IMPLICAÇÕES PARA SUA CONSERVAÇÃO**

PÉRICLES SENA DO RÊGO

**Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zoologia do Museu Paraense
Emílio Goeldi e Universidade
Federal do Pará como requisito
final para obtenção do grau de
Doutor em Zoologia.**

Orientador: Prof. Dr. Horacio Schneider

**BELÉM – PA
2010**

PÉRICLES SENA DO RÊGO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTUDO
POPULACIONAL DE *Antilophia bokermanni* (AVES: PIPRIDAE) COM
IMPLICAÇÕES PARA SUA CONSERVAÇÃO**

**Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Zoologia
do Museu Paraense Emílio Goeldi e
Universidade Federal do Pará como
requisito final para obtenção do grau de
Doutor em Zoologia.**

Orientador: Prof. Dr. Horacio Schneider

**BELÉM – PA
2010**

PÉRICLES SENA DO RÊGO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTUDO
POPULACIONAL DE *Antilophia bokermanni* (AVES: PIPRIDAE) COM
IMPLICAÇÕES PARA SUA CONSERVAÇÃO**

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Horacio Schneider
IECOS (Bragança) – UFPA

Membros

Dr. Alexandre Luis Padovan Aleixo - (MPEG, Coordenação de Zoologia)

Dra. Camila Cherem Ribas - (INPA, Programa de Coleções e Acervos Científicos)

Dra. Cristina Yumi Miyaki - (Universidade de São Paulo - USP)

Dra. Wilsea Maria Batista de Figueiredo - (UFPA - IECOS, Campus de Bragança)

Dr. Leonardo dos Santos Sena - (UEPA, Departamento de Patologia)

Dr. Evonnildo Costa Gonçalves - (UFPA, Departamento de Genética)

Dra. Jaqueline Maria Goerck - (Associação Para a Conservação das Aves do Brasil)

**BELÉM – PA
2010**

DEDICATÓRIA

A todos da minha família.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização desta tese, muitas foram as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para o seu bom andamento. Dentre tantas, agradeço especialmente:

Ao Prof. Dr. Horacio Schneider, pela orientação, confiança, amizade, mas principalmente pelo exemplo de pesquisador e profissional dedicado;

A Profa. Dra. Iracilda Sampaio, por todo apoio e incentivo durante a realização desta pesquisa, pela amizade, exemplo de dedicação à pesquisa e também pela co-orientação;

Ao Prof. Dr. Marcelo Valinotto, que no processo final de análise dos resultados desempenhou um papel fundamental, bem como pela amizade e pelo grupo de pesquisa que, juntos, estamos desenvolvendo;

A Profa. Dra. Juliana Araripe, pelas inúmeras contribuições e apoio, mas principalmente por seu amor e cumplicidade;

A todos os professores do Campus de Bragança – UFPA e do Museu Emílio Goeldi que, de alguma forma, contribuíram para minha formação e realização desta tese, principalmente: Dr. Alexandre Aleixo, Dra. Wilsea Figueiredo, Dra. Simoni Santos, MSc. Grazielle Gomes e Dra. Cláudia Tagliaro;

A todos da ONG AQUASIS, que desenvolvem um importante papel na conservação da biodiversidade no Brasil, em especial: Weber Silva, Alberto Campos, Ciro Albano e Paulo Thieres (Bocão). Com esta equipe, consegui aprender como transformar informações em ações práticas;

Ao Weber Silva, que me incluiu nos primeiros estudos com o “soldadinho-do-araripe”, sendo responsável direto pela minha escolha neste tema de doutorado. Agradeço também pela sincera amizade;

A todos os pesquisadores e colegas que me ajudaram na obtenção das amostras utilizadas nesta pesquisa;

A todos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Campus de Bragança, não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém. Sou grato a todos;

Ao curso de Pós-Graduação do Museu Paraense Emílio Goeldi / UFPA, por colaborar com a minha formação de pesquisador. Um agradecimento especial a Dorotéa e Anete;

Ao curso de Ciências Biológicas da UEMA, por me acolherem como profissional no seu corpo docente, permitindo e apoiando a minha permanência e finalização do doutorado;

A todos da minha família, que me apoiaram, incentivaram e vibraram em todos os momentos;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado durante os quatro anos do doutorado;

A Universidade Federal do Pará, pelo apoio logístico disponibilizado durante o trabalho;

Ao meu filho, Rafael, por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia e encher de luz e alegria todos os dias da minha vida.

A Deus, simplesmente, por TUDO!!!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTO	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO INTRODUTÓRIO	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	1
1. ASPECTOS GERAIS DE <i>Antilophia bokermanni</i>	2
1.1 BREVE HISTÓRICO DA DESCOBERTA DO SOLDADINHO-DO-ARARIPE.....	2
1.2 MORFOLOGIA E POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO.....	5
1.3 DISTRIBUIÇÃO E HÁBITAT.....	6
1.4 TAMANHO POPULACIONAL.....	11
1.5 REPRODUÇÃO.....	12
1.6 STATUS DE ESPÉCIE AMEAÇADA.....	13
2. A CHAPADA DO ARARIPE E SUAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO	15
3. O ESTUDO DE ESPÉCIES AMEAÇADAS E A GENÉTICA MOLECULAR	19
4. OBJETIVO	23
4.1 OBJETIVO GERAL.....	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5, REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 1 – POPULATION GENETIC STUDIES OF MITOCHONDRIAL PSEUDO-CONTROL REGION IN THE ENDANGERED ARARIPE MANAKIN (<i>ANTILOPHIA BOKERMANNI</i>).....	29
CAPÍTULO 2 –	

VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO <i>Antilophia</i> (REICHENBACH 1850) SUGERE RECENTE SEPARAÇÃO ENTRE <i>A. bokermanni</i> E <i>A. galeata</i> EVIDENCIADO POR SEPARAÇÃO INCOMPLETA DE LINHAGENS.....	38
CAPÍTULO 3 –	
VARIABILIDADE DO GENE RECEPTOR DA MELANOCORTINA-1 (<i>MC1R</i>) NÃO EXPLICA DIFERENÇAS NO PADRÃO DE PLUMAGEM ENTRE <i>Antilophia bokermanni</i> E <i>Antilophia galeata</i>	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	98
ANEXO.....	101

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO INTRODUTÓRIO

Figura 1 - Foto de um exemplar macho adulto de <i>Antilophia bokermanni</i> (a) e de <i>A. galeata</i> (b), e de um exemplar fêmea de <i>A. bokermanni</i> (c) e de uma <i>A. galeata</i> (d).....	4
Figura 2 - Foto de um dos pontos de ocorrência do soldadinho-do-araripe, mostrando uma nascente e a mata típica de seu habitat.....	7
Figura 3 - Imagem mostrando a localização da distribuição do soldadinho-do-araripe na encosta da Chapada do Araripe. As setas em vermelho apontam os limites da sua distribuição.....	9
Figura 4 - Fotos da Chapada do Araripe ressaltando a vegetação encontrada na encosta.....	10
Figura 5 - Soldadinho-do-araripe fêmea sobre o ninho (a), aspecto dos ovos (b), filhotes recém eclodidos do ovo (c) e filhotes na terceira semana de desenvolvimento (d).....	14
Figura 6 - Localização da Chapada do Araripe.....	16
Figura 7 - Unidades de Conservação presentes na Chapada do Araripe. O quadro superior ilustra o limite da APA da Chapada do Araripe e as divisas dos Estados (Piauí, Ceará e Pernambuco), destacando a FLONA do Araripe no detalhe. O quadro inferior apresenta a ampliação do detalhe, destacando em verde o habitat remanescente do soldadinho-do-araripe.....	18

RESUMO

O Soldadinho-do-araripe – *Antilophia bokermanni* (Passeriformes, Pipridae) é atualmente o membro mais ameaçado de extinção de sua família, sendo classificado como “criticamente em perigo”. Com uma população estimada em somente 800 indivíduos, esta espécie é endêmica de uma pequena área (aproximadamente 30 km²) de floresta úmida de encosta da Chapada do Araripe no nordeste do Brasil. A urgente necessidade de implementação de um programa de conservação efetivo para o Soldadinho-do-araripe tem estimulado muitas pesquisas com diversos aspectos de sua biologia. No presente estudo, nós examinamos variações nas seqüências de segmentos do mtDNA e ncDNA em representantes de *A. bokermanni* e *A. galeata*. As análises mostraram nenhuma evidência para subestruturamento populacional e também de história de expansão populacional para *A. bokermanni*. Sua variabilidade genética é ligeiramente menor quando comparada com a sua espécie-irmã, mas suas similaridades indicam um recente processo de separação, indicado pela retenção de polimorfismo ancestral (separação incompleta de linhagens) em todos os marcadores. Nós também não encontramos nenhuma associação entre variação de plumagem e variações nucleotídicas do gene *MC1R* no gênero *Antilophia*. Este estudo representa uma contribuição da genética para o Plano de Conservação do Soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni*).

ABSTRACT

The Araripe Manakin *Antilophia bokermanni* (Passeriformes, Pipridae) is the most threatened member of this family, and is classified as “critically endangered”. With an estimated population of only 800 individuals, this species is endemic to a small area (approximately 30 km²) of forest on the slopes of the Araripe Plateau in northeastern Brazil. The urgent need for the implementation of an effective conservation program for the Araripe Manakin has stimulated intensive research into various aspects of its biology. In the present study, we examined sequence variation in segments of the mtDNA and ncDNA in specimens of *A. bokermanni* and *A. galeata*. The current analysis provides no evidence for population substructuring nor for a history of population expansion of *A. bokermanni*. The genetic variability is slightly reduced in comparison with its sister species, but their similarity indicates a relatively recent process of separation, indicated by retention of ancestral polymorphisms (incomplete lineage sorting) all markers. We also did not detect any association between plumage variation and nucleotide variation at *MC1R* in genus *Antilophia*. This study represents a contribution of genetics to the Conservation Plan of Araripe Manakin (*Antilophia bokermanni*).

INTRODUÇÃO

Em todas as partes do planeta é cada vez mais evidente que o uso indiscriminado dos recursos naturais pela ação humana, direta ou indiretamente, tem provocado grandes mudanças ambientais. Mesmo com a criação de políticas ambientais de âmbito global para uma utilização conservacionista e sustentável do meio ambiente, não se conseguiu impedir que nas últimas décadas houvesse uma aceleração no desaparecimento de muitas espécies da fauna e da flora. Esta contínua perda de biodiversidade tem sido chamada de “sexta extinção”, uma vez que sua magnitude compara-se às outras cinco extinções em massa já ocorridas no planeta (Leakey & Lewin, 1995). Contudo, o atual processo de perda de biodiversidade difere das demais por ser provocada quase que exclusivamente pela atividade humana.

Mesmo possuindo um programa de política ambiental reconhecido mundialmente pelo seu alto nível de desenvolvimento e responsabilidade (Dias, 2001), o Brasil tem sempre encabeçado a lista das nações com o maior número de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2008). Esta situação torna-se mais agravante quando se leva em conta que muitas áreas do território brasileiro ainda são pouco pesquisadas, aumentando a probabilidade de desaparecimento de espécies mesmo antes de serem conhecidas pelo meio científico.

O caso do pássaro soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni* Coelho & Silva, 1998) é um exemplo tanto do enorme potencial da diversidade encontrada em território brasileiro, quanto do perigo que a ação antrópica não ordenada pode causar. Esta ave, apesar de ter sido descoberta há pouco mais de uma década, já se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção. Sua situação é preocupante não somente devido à sua restrita

distribuição e ao seu reduzido tamanho populacional, mas também pela maneira exploratória e não sustentável nas quais os recursos do seu habitat estão sendo utilizados.

A tese aqui apresentada refere-se às pesquisas de genética e biologia molecular envolvendo a espécie *Antilophia bokermanni*, enfocando aspectos populacionais e da história evolutiva que possam ser aplicados no seu processo de conservação. Os resultados obtidos são apresentados em três capítulos no formato de artigos segundo normas da revista *The Auk* (**Anexo**), seguindo uma ordem dos aspectos abordados e dos marcadores moleculares utilizados. A última parte da tese é reservada às considerações finais e conclusões da pesquisa.

Nos tópicos abaixo que antecedem os capítulos são apresentados aspectos gerais relacionados à biologia de *Antilophia bokermanni*, uma breve descrição do local onde a ave é encontrada - Chapada do Araripe - e suas Unidades de Conservação, terminando com uma síntese da utilização da genética como ferramenta para conservação de espécies ameaçadas. As principais questões a serem respondidas com a execução desta tese são listadas em forma de objetivos no final desta seção.

1. ASPECTOS GERAIS DE *Antilophia bokermanni*

1.1 BREVE HISTÓRICO DA DESCOBERTA DO SOLDADINHO-DO-ARARIPE

Por se tratar de uma ave tão distinta em coloração e canto, a melhor explicação para o motivo do soldadinho-do-araripe passar despercebido por tanto tempo até a sua descoberta para o meio científico é, provavelmente, a sua distribuição limitada às matas de encosta da Chapada do Araripe. Diversos pesquisadores e campanhas científicas relataram a passagem pela região do Cariri, onde está localizada a Chapada do Araripe - CE. Dentre as expedições documentadas destaca-se a Comissão Científica de Exploração entre 1859 a 1861, as coletas

realizadas pelo ornitólogo alemão Emil Kaempfer em 1929, além das campanhas do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) na década de 1980 (Silva & Rêgo, 2004). Dos diversos registros realizados para a região, chama-se a atenção também para o feito pelo ornitólogo Paulo de Tarso Antas que indicou a presença de *Antilophia galeata* Lichtenstein, 1823 (Marini, 1992), provavelmente devido à semelhança do canto ou da morfologia das fêmeas e dos indivíduos jovens das duas espécies.

Somente em dezembro de 1996, no distrito de Arajara (39° 24' 45" W / 07° 19' 57" S), Município de Barbalha - CE, houve a confirmação da presença de uma espécie nova de ave pertencente ao gênero *Antilophia* naquela região. Foram os pesquisadores Galileu Coelho e Weber Silva que, após observarem um exemplar de macho adulto (**Figura 1a**), descartaram a possibilidade de se tratar de alguma espécie já conhecida, como outros pesquisadores chegaram a propor. Descrita cientificamente no periódico Ararajuba - Revista Brasileira de Ornitologia (Coelho & Silva, 1998), a nova espécie é atualmente chamada popularmente por soldadinho-do-araripe, sendo dado o nome científico de *Antilophia bokermanni*, em homenagem ao pesquisador Werner Bokermann, por suas contribuições à ornitologia brasileira.

Até o momento de sua descrição, apenas a localidade-tipo havia sido listada para confirmação de sua presença. Somente em 2000, Azevedo Jr. e colaboradores publicaram dois novos registros da distribuição de *A. bokermanni*, localizados nos Municípios de Crato e Barbalha, também no Estado do Ceará. Atualmente, após a realização de pesquisas visando à construção do plano de conservação desta ave (Silva & Rêgo, 2004; AQUASIS, 2006), dezenas de outras localidades tiveram sua presença confirmada, mas todas incluídas numa estreita faixa de mata de encosta no Ceará.



Figura 1 - Foto de um exemplar macho adulto de *Antilophia bokermanni* (a) e de *A. galeata* (b), e de um exemplar fêmea de *A. bokermanni* (c) e de uma *A. galeata* (d).

1.2 MORFOLOGIA E POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO

A. bokermanni é muito similar a sua espécie-irmã, *Antilophia galeata* (**Figura 1a e 1b**), onde a principal diferença entre os machos adultos está na predominância da coloração branca presente nas penas do dorso e das asas da nova espécie, uma vez que ambas possuem um manto vermelho que se estende do dorso até o topete sobre o bico. Já as fêmeas das duas espécies (**Figura 1c e 1d**) e os indivíduos jovens apresentam todos uma coloração verde-oliva, sendo o adorno do topete praticamente ausente nas fêmeas (Coelho & Silva, 1998). Um exemplar macho do soldadinho-do-araripe pode medir cerca de 16 centímetros de comprimento e pesar cerca de 20 gramas, sendo a fêmea ligeiramente mais pesada, porém, apresentando um comprimento total menor (AQUASIS, 2006).

A. bokermanni pertence à família Pipridae, formada por pássaros conhecidos vulgarmente como tangarás, dançadores ou uirapurus. Os piprídeos compõem a superfamília Tyrannoidea, juntamente com as famílias Cotingidae, Tyrannidae, Phytotomidae e Oxyruncidae (Traylor, 1977). A maioria dos piprídeos apresenta forte dimorfismo sexual na plumagem, apresentam rituais de corte na época reprodutiva e habitam preferencialmente o interior de matas e florestas (Sick, 1997).

Anatomicamente destacam-se três características peculiares utilizadas na classificação desta família que também estão presentes no gênero *Antilophia*: apresentam sindactilia (junção) na base do terceiro e quarto dedo; a escutelação do tarso é do tipo exaspidiano; e a estrutura da siringe é extremamente variada, sendo esta característica tradicionalmente usada como principal caráter morfológico no estudo das relações de parentesco entre os piprídeos (Prum, 1990b). Das características gerais da biologia descritas para a família Pipridae, o gênero *Antilophia* difere bastante do ramo filogenético ao qual pertence. As principais

diferenças observadas neste gênero são: o acasalamento não-promíscuo; a ausência de ritual pré-nupcial definido, sendo observado apenas vôos de perseguições; a igualdade na proporção sexual; e o tamanho corporal significativamente maior que nos demais representantes da família (AQUASIS, 2006).

Em estudos de classificação filogenética realizados com a família Pipridae usando dados morfológicos (Prum, 1990a, 1990b, 1992), o gênero *Antilophia*, representado apenas por *A. galeata*, apareceu agrupado em todas as análises com o gênero *Chiroxiphia*, estando o gênero *Manacus* mais externo a este clado. Mais recentemente, Rêgo *et al.*, (2007) e Tello *et al.*, (2009) realizaram estudos das relações filogenéticas com representantes de piprídeos através de marcadores moleculares no qual foram incluídas amostras de *A. galeata*. Em seus resultados foi confirmada a estrita relação entre o gênero *Antilophia* e o gênero *Chiroxiphia*, corroborado a relação filogenética já sugerida pelos dados morfológicos. O registro de híbridos entre estes dois gêneros na natureza (Pacheco & Parrini, 1995; Vasconcelos *et al.*, 2005) são dados que reforçam ainda mais a próxima relação existente.

1.3 DISTRIBUIÇÃO E HÁBITAT

O soldadinho-do-araripe é a única ave endêmica do Estado do Ceará, ocorrendo exclusivamente nas matas úmidas próximas às nascentes da encosta cearense da Chapada do Araripe (**Figura 2**). Sua distribuição agora é bem conhecida, tendo sido confirmada a sua presença apenas nos municípios cearenses do Crato, Barbalha e Missão Velha (BirdLife International, 2008). Dados obtidos em estudos da área de ocorrência da ave através da visualização de exemplares, revelaram que elas são encontradas entre a nascente Guaribas



Figura 2 - Foto de um dos pontos de ocorrência do soldadinho-do-araripe, mostrando uma nascente e a mata típica de seu habitat.

(39° 28' 22"W / 07° 13' 13"S) até a nascente do sítio Valentim (39° 10' 01"W / 07° 24' 24"S) (**Figura 3**), totalizando 56 km de extensão (Silva & Rêgo, 2004). Levando-se em conta que a floresta úmida remanescente nas encostas possui uma largura média inferior a 500 metros, a área de distribuição total do soldadinho-do-araripe não ultrapassa 30 km².

A vegetação encontrada na área de ocorrência de *A. bokermanni* é classificada como Floresta Estacional Perenifólia Montana (Veloso *et al.*, 1991) (**Figura 4**), estando a uma altitude de 600 a 800 metros acima do nível do mar. Esta vegetação estende-se por quase 200 km na chapada, compreendendo 294 nascentes que representam 85% das fontes d'água existentes na chapada (DNPM, 1996). A estreita relação entre a presença da ave e as nascentes da encosta é um fato confirmado, sendo também relatado este tipo de relação entre a outra espécie do gênero (*A. galeata*) e córregos presentes nas matas ciliares do bioma Cerrado. Assim, a distribuição de *A. bokermanni* não é uniforme por toda faixa florestal, mas limitada à algumas nascentes e córregos dentro dos pontos extremos de sua ocorrência (AQUASIS, 2006).

A porção das matas de encosta próxima às nascentes forma uma fitofisionomia de floresta brejada, sendo este o habitat preferencial da ave. Este segmento de mata concentra espécies de plantas que se diferenciam daquele presente em matas úmidas sem nascentes, com destaque para espécies das famílias Melastomataceae, Rubiaceae e da divisão Pteridophyta (AQUASIS, 2006). Muitas dessas espécies de planta fazem parte da dieta de frutos do soldadinho-do-araripe, a qual também inclui espécies ruderais (típicas de áreas em regeneração) e pequenos artrópodes.

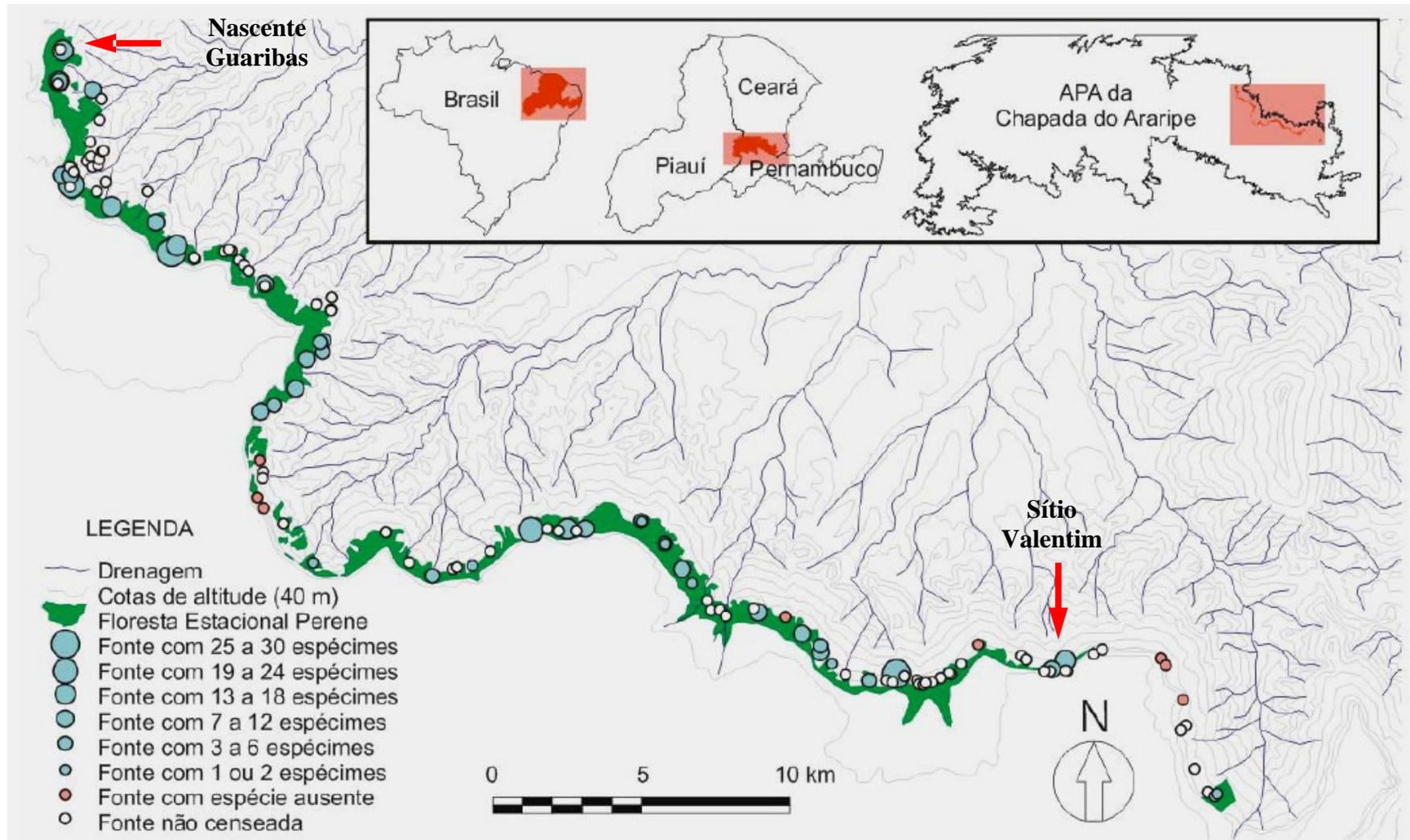


Figura 3 - Imagem mostrando a localização da distribuição do soldadinho-do-araripe na encosta da Chapada do Araripe. As setas em vermelho apontam os limites da sua distribuição.



Figura 4 - Fotos da Chapada do Araripe ressaltando a vegetação encontrada na encosta.

1.4 TAMANHO POPULACIONAL

Informações a respeito do tamanho populacional, bem como do padrão de estruturação da população do soldadinho-do-araripe ainda são baseadas em estimativas pouco precisas. Segundo dados publicados em pela IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza), esta ave é classificada na categoria das espécies com tamanho populacional estimado de 50 a 250 indivíduos. Em projetos realizados em 2004 (Silva & Rêgo) e 2006 (AQUASIS), os quais utilizaram uma metodologia específica de censo baseada em características particulares do padrão de distribuição e comportamento da *A. bokermanni*, foi relatado que o número total da população pode ultrapassar 700 indivíduos. Além da diferença na metodologia adotada para análise direcionada para espécie em estudo, o principal fator que contribui para uma elevação da estimativa do tamanho populacional foi o aumento do número de nascentes visitadas e o registro de novas nascentes não cadastradas pelo Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM, 1996).

Considerando que a vegetação do ambiente em que ocorre o soldadinho-do-araripe estende-se por quase 200 km sobre a encosta da Chapada do Araripe, e que menos de um quinto das nascentes foram visitadas ou analisadas de forma mais criteriosa, é possível que o número de indivíduos ainda seja maior. É provável que a presença da ave seja confirmada em outras localidades ainda não analisadas. O relato da ocorrência de um único indivíduo de plumagem verde em um pequeno fragmento florestal no distrito de Jamacaru, município de Missão Velha, distante cerca de 9 km do ponto considerado extremo oeste da distribuição, abre precedentes para a hipótese de que esta ave seria capaz de colonizar áreas vizinhas que apresentem as condições propícias para sua sobrevivência. Tal localidade não foi incluída na distribuição por não ter sido encontrado mais nenhum indivíduo desta espécie em visitas

posteriores a este local. Outra importante informação observada nos trabalhos de campo foi o registro de oscilações na presença de machos adultos (variando entre zero e três exemplares) numa mesma localidade visitada em diferentes anos (AQUASIS, 2006). Desta forma, fica evidenciada a necessidade de preservação de todas as nascentes, mesmo aquelas que não apresentam atualmente a ocupação pela ave, pois são potenciais localidades de expansão territorial para a espécie.

1.5 REPRODUÇÃO

Diferentemente do observado para a maioria dos piprídeos, onde um único macho pode acasalar com várias fêmeas no mesmo período reprodutivo, o soldadinho-do-araripe apresentam um sistema de acasalamento não promíscuo (Girão & Souto, 2005), igualmente observado em *A. galeata*. Os machos de ambas as espécies apresentam comportamento de defesa de território neste período, garantindo proteção e fonte alimentar para a fêmea e seus filhotes (Cavalcanti & Marini, 1993; Girão & Souto, 2005), aumentando assim, as chances de sucesso reprodutivo.

Apesar de possuir uma plumagem de destaque, como observado nos demais machos de piprídeos, o soldadinho-do-araripe não executa cômico de danças, limitando-se apenas a vôos de perseguições, como forma de exibição para as fêmeas. Este comportamento destaca a capacidade de defesa de território por parte dos machos mais fortes, sendo os demais expulsos para áreas periféricas, longe das nascentes (AQUASIS, 2006).

A construção do ninho é uma atividade exclusiva das fêmeas, sendo o local escolhido sempre próximo à córregos, evidenciando uma provável dependência da postura dos ovos com um micro-clima adequado. O período reprodutivo dura cerca de cinco meses, antecedendo a

estação de chuvas, o que permitirá uma maior disponibilidade de alimento (Girão & Souto, 2005). A fêmea põe dois ovos por estação reprodutiva, desempenhando cuidado parental até o momento dos filhotes deixarem o ninho (**Figura 5**). Os filhotes apresentam, independente do sexo, uma coloração verde-oliva semelhante à das fêmeas, o que dificulta a visualização por parte de predadores (**Figura 5**). Os indivíduos jovens podem permanecer nos territórios dos pais por até dois anos, quando adquirem a sua plumagem definitiva e atingem a maturidade sexual, sendo posteriormente expulsos para outras áreas.

1.6 STATUS DE ESPÉCIE AMEAÇADA

Classificada como uma ave “ criticamente Ameaçada ” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (2008), *A. bokermanni* também faz parte da Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção publicada pelo MMA (2003), sendo considerada espécie “ Criticamente em Perigo ”. Ambas as listas apontam como pontos críticos para sua conservação o tamanho populacional reduzido e sua distribuição restrita, com provável declínio devido a problemas de qualidade ambiental e fragmentação de habitat. De acordo com um estudo realizado pela BirdLife International (2000), “ são necessárias ações urgentes para que a espécie não se torne extinta, quase que simultaneamente com a sua descrição ”.

A análise de informações provenientes de monitoramentos anuais, realizados por diversos grupos de pesquisas nas áreas de geologia, biologia e antropologia, revelam que o ambiente onde o soldadinho-do-araripe habita está atualmente sofrendo um processo de descaracterização. Dentre os agentes causadores das mudanças, destacam-se as pressões de uso e ocupação crescente sobre as encostas e nascentes da Chapada do Araripe. A inclusão de medidas para um melhor gerenciamento das atividades que fazem uso dos recursos disponíveis

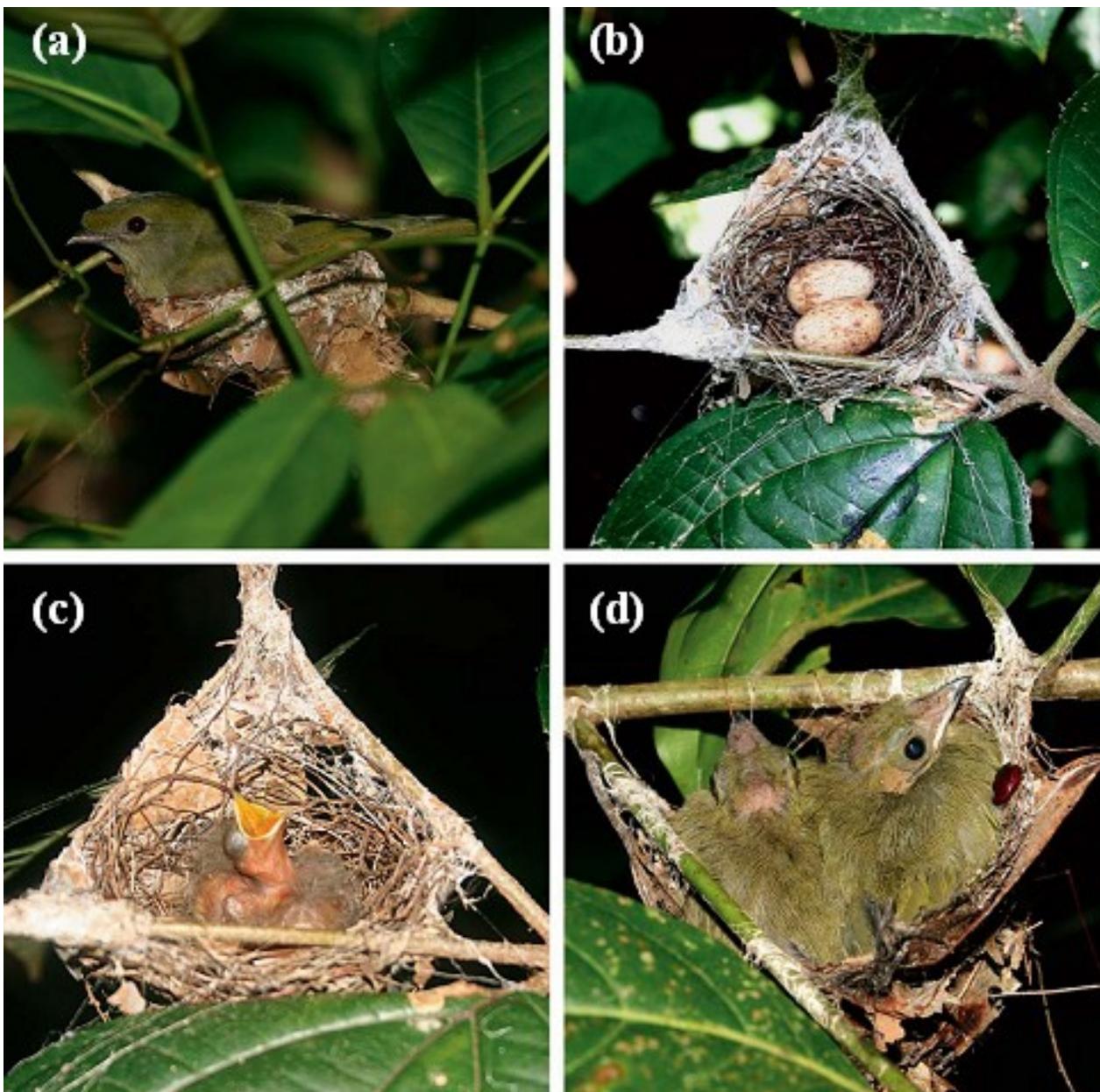


Figura 5 - Soldadinho-do-araripe fêmea sobre o ninho (a), aspecto dos ovos (b), filhotes recém eclodidos do ovo (c) e filhotes na terceira semana de desenvolvimento (d).

na área de ocorrência da ave pela população local deverá ter uma posição de destaque no programa de conservação a ser desenvolvido, uma vez que este é o fator de maior impacto para a perpetuação da espécie e de seu hábitat.

Dentre as ameaças listadas no Plano de Conservação do soldadinho-do-araripe (AQUASIS, 2006), destaca-se a questão do uso racional das nascentes como aspecto prioritário para a manutenção da espécie. O micro-clima produzido nas proximidades das nascentes, no qual se desenvolve a floresta estacional perene das encostas, é um elemento determinante no ciclo de vida desta ave. Processos de modificação envolvendo as nascentes, como a diminuição da vazão, o encanamento, a perda da mata ciliar e o avanço das atividades antrópicas provocam mudanças no hábitat, que podem comprometer de forma drástica a manutenção desta espécie.

2. A CHAPADA DO ARARIPE E SUAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Situada na fronteira entre os Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, a Chapada do Araripe (**Figura 6**) ocupa uma área de 6.230 km², estando sua maior parte na porção meridional do Estado do Ceará. Na chapada é possível distinguir quatro zonas fisiográficas distintas: o topo da chapada; a zona de escarpa; o pé da serra e o sertão. A sua altitude varia de 700 a 950 m, sendo o clima sobre a chapada quente e semi-árido. O período chuvoso ocorre na maioria das vezes entre os meses de dezembro e maio. A água infiltrada pelo topo da Chapada corre por baixo do solo, emergindo em sua grande maioria para o norte, em direção ao Ceará, devido à disposição das camadas que favorecem a ocorrência de ressurgências na encosta, popularmente chamadas de nascentes.

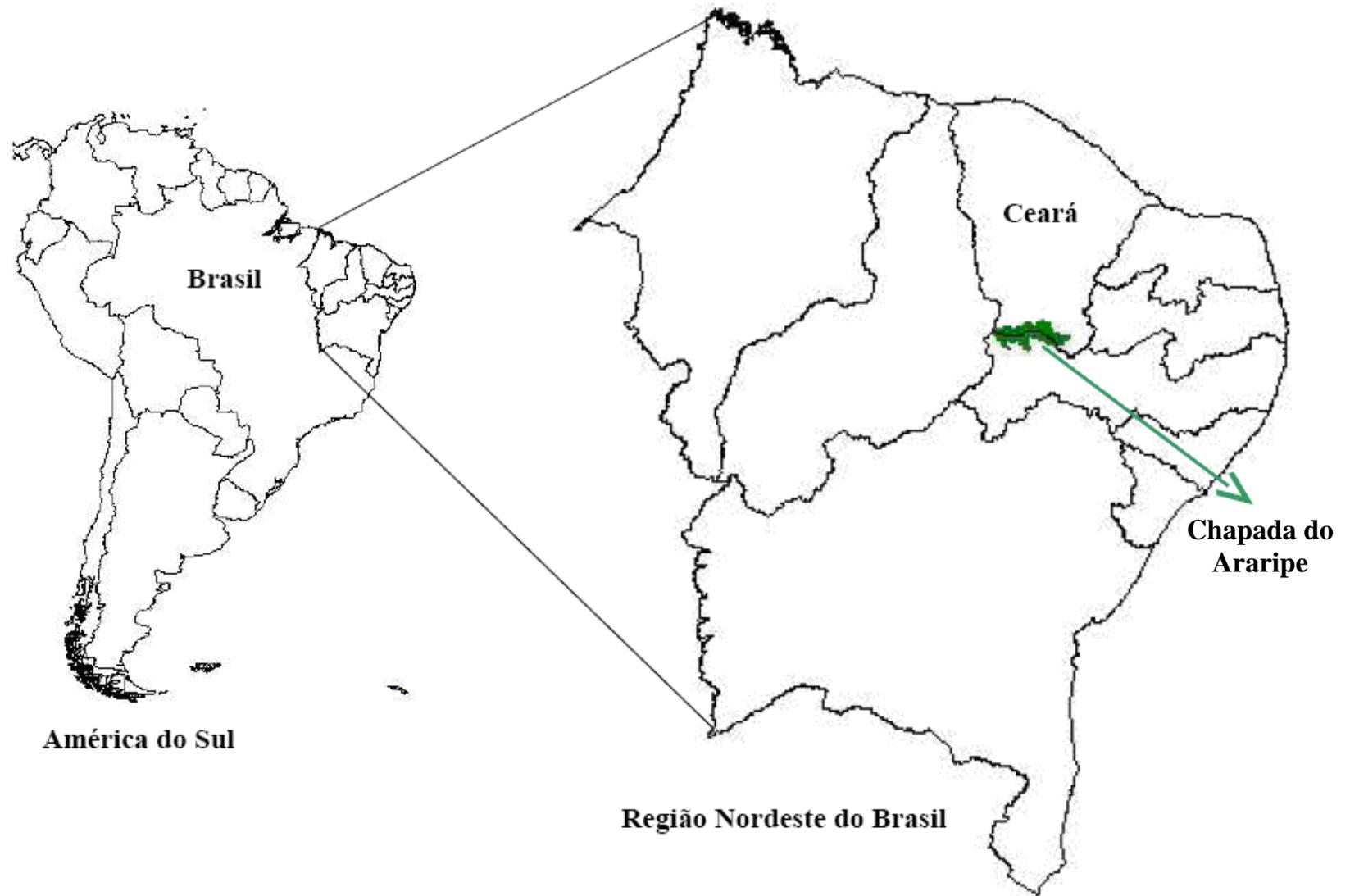


Figura 6 - Localização da Chapada do Araripe.

Da combinação de umidade com as águas provenientes das chuvas e das nascentes é que se desenvolve e se mantêm a mata de encosta da chapada, ambiente este onde é encontrada a espécie *A. bokermanni*. Dentro da distribuição de ocorrência desta ave encontra-se quase 50% das nascentes, apesar de representar uma faixa de menos de 8% de encosta da chapada. Por outro lado, também é próximo desta região que se desenvolvem os maiores Municípios da região do Cariri (Crato, Juazeiro do Norte e Barbalha), que juntos somam quase um milhão de habitantes (IBGE, 2008). O crescimento populacional observado nesta região foi um dos principais pontos discutido no Plano de Conservação do soldadinho-do-araripe (AQUASIS, 2006), uma vez que está diretamente ligado ao uso da água, desmatamento para avanço da agricultura e crescimento imobiliário na encosta.

Na Chapada do Araripe encontra-se duas Unidades de Conservação de âmbito federal: a Floresta Nacional do Araripe (FLONA do Araripe), criada em 1946 e possuindo uma área de 38.262 hectares, e a Área de Proteção Ambiental da Chapada do Araripe (APA do Araripe), criada em 1997 e possuindo uma área superior a um milhão de hectares (**Figura 7**), ambas sob administração do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Como pode ser visto na **Figura 7**, a área de ocorrência de *A. bokermanni* está totalmente inserida na APA do Araripe e coincide com o comprimento da borda da FLONA.

A APA do Araripe, apesar de ser uma unidade de conservação para uso sustentável, não tem impedido que a utilização dos recursos naturais pela população local tenha provocado uma degradação significativa da vegetação nativa. A ausência de instrumentos de gestão (plano de manejo, zoneamento) e o próprio tamanho desta Unidade, que abrange três Estados (Ceará, Pernambuco e Piauí) são aspectos que tem dificultado no processo de fiscalização. Seu papel dentro do Plano de Conservação do soldadinho-do-araripe torna-se crucial,

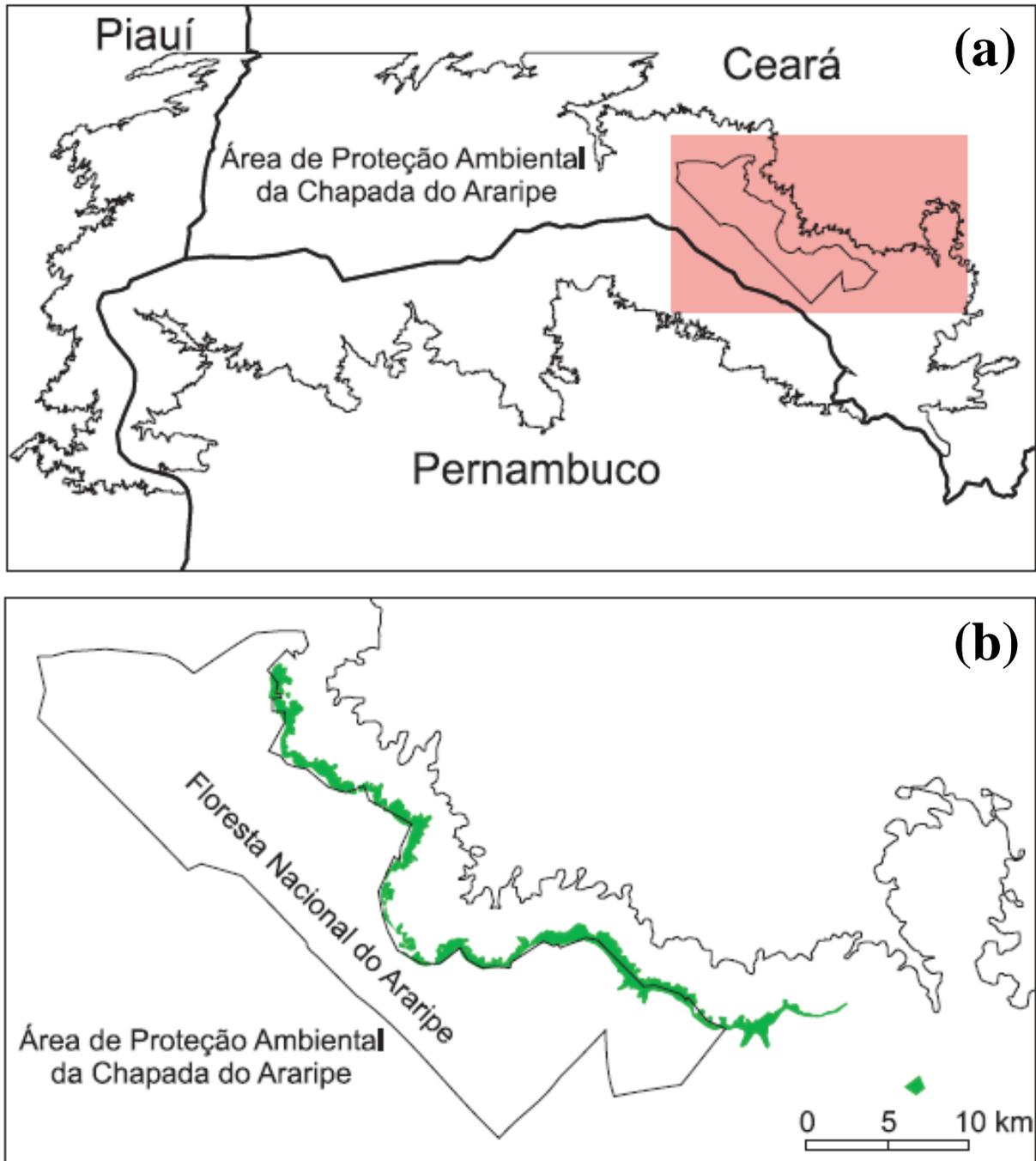


Figura 7 - Unidades de Conservação presentes na Chapada do Araripe. (a) Limite da APA da Chapada do Araripe e as divisas dos Estados (Piauí, Ceará e Pernambuco), destacando a FLONA do Araripe no detalhe. (b) Ampliação do detalhe, destacando em verde o habitat remanescente do soldadinho-do-araripe.

principalmente no que diz respeito ao controle do uso sustentável dos recursos naturais, bem como no ordenamento do uso da terra próximo a encosta.

Já a FLONA do Araripe ocupa uma posição-chave na proteção e manutenção do hábitat da ave. Não coincidentemente, é ao longo da borda do platô da chapada que se encontra a totalidade da sua área de distribuição de *A. bokermanni*. A FLONA tem preservado e mantido a mata seca presente no platô, que por sua vez funcionado como área tampão da mata úmida da encosta, garantido a infiltração das águas pluviais que alimentam as nascentes (AQUASIS, 2006), e também evitando o processo de erosão e desmoronamento das encostas.

3. O ESTUDO DE ESPÉCIES AMEAÇADAS E A GENÉTICA MOLECULAR

O desaparecimento de espécies ou populações como resultado de processos naturais é um fato que tem sido considerado normal durante a evolução da vida na Terra. Os registros fossilíferos encontrados em todos os continentes são indícios incontestáveis de que milhares de espécies já se extinguiram e que as espécies encontradas nos dias de hoje compõem o produto da evolução que melhor adaptaram-se às condições ambientais. Entretanto, a recente ação humana tem feito com que o processo de extinção atinja níveis preocupantes para a manutenção da biodiversidade (Frankham *et al.*, 2002). Para se ter uma dimensão desta problemática, no século vinte todas as extinções conhecidas de espécies de vertebrados foram causadas direta ou indiretamente pelo ser humano (Primack & Rodrigues, 2001).

A necessidade de um maior conhecimento a respeito da influência humana sobre a manutenção da diversidade global levou a criação do campo de estudo da Biologia da Conservação. Reunindo o conhecimento de diversas áreas, este ramo da biologia soma esforços para impedir o desaparecimento de espécies, estabelecer áreas de conservação da vida natural e compreender os efeitos da ação humana sobre os ecossistemas para o melhor desenvolvimento de

medidas para o uso sustentável dos recursos naturais (Soulé, 1985). Na grande maioria dos casos, os programas de conservação são principalmente dirigidos à proteção de espécies cuja população encontra-se em declínio, restrita a uma pequena extensão de sua área de ocorrência e, portanto, ameaçada de extinção caso medidas urgentes não sejam tomadas (Primack & Rodrigues, 2001). Desta forma, uma das funções principais dos conservacionistas passou a ser a determinação das condições necessárias para que uma população ameaçada seja capaz de chegar a um ponto de estabilidade que permita a perpetuação da espécie, mesmo sofrendo influência das condições impostas pela ação humana. Como regra geral, o que se tem visto nos programas de conservação é a tentativa de preservar o maior número possível de exemplares em um local protegido.

O número de indivíduos necessários para garantir a manutenção de uma espécie passou a ficar conhecido como População Mínima Viável – PMV (MacArthur & Wilson, 1967; Shaffer, 1981; Thomas, 1990). Uma PMV seria então a menor população que teria uma maior probabilidade de sobreviver em um determinado intervalo de tempo. Alguns autores chegaram a sugerir valores de PMV que evitassem perdas genéticas e mantivessem a flexibilidade evolutiva (Lande & Barrowclough, 1987; Soulé, 1987; Thomas, 1990), onde para vertebrados ficaria em torno de 500 a 1000 indivíduos. Entretanto, ficou insustentável acreditar que um número pudesse ser aplicado a tantas espécies com características de vida tão diferentes, sendo necessário um estudo em particular para cada caso, baseando-se no maior número de características biológicas e ecológicas possíveis.

Além da necessidade da determinação da PMV, o aumento do interesse no estudo de populações ameaçadas também culminou na determinação dos agentes que contribuiriam no processo de extinção de uma espécie. Estes agentes seriam: estocasticidade (demográfica, ambiental e genética), perda da flexibilidade evolutiva e catástrofes naturais (Shaffer, 1981; Soulé, 1983; Gilpin & Soulé, 1986). Segundo Fernandez (1997), esses processos teriam em

comum o fato de que qualquer um deles é tão mais perigoso quanto mais isoladas e menores forem as populações. Outro fator a ser considerado é que essas forças nem sempre ocorrem isoladamente, onde uma população pode inicialmente ser acometida pelos efeitos de um desses processos, tornando-se mais suscetível aos outros (Pires, 2000).

Nos últimos anos, os conservacionistas passaram a aplicar mais o conhecimento gerado pelas técnicas de genética e biologia molecular nos estudos com populações ameaçadas (Frankham *et al.*, 2002). Esse interesse se deve não somente ao reconhecimento de que, entre os principais processos que afetariam populações em vias de extinção, dois seriam genéticos (perda de variabilidade genética e endogamia), mas também pela gama de informações e o nível de precisão que as pesquisas genéticas poderiam contribuir no processo de conservação e manutenção de espécies ameaçadas. A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), já orienta para a necessidade de preservação da diversidade genética, como um dos níveis fundamentais da biodiversidade.

O uso da genética molecular no estudo de populações ameaçadas é marcado por dois importantes acontecimentos que mudaram a maneira de obtenção, interpretação e análise das informações disponíveis. O primeiro foi o desenvolvimento de técnicas moleculares ocorrido em meados da década de 80, que possibilitaram uma avaliação mais precisa dos casos. O segundo fato, já comentado no item anterior, teve início no começo dos anos 90, com a aceitação de que determinados fatores genéticos teriam que ser melhores compreendidos, uma vez que estes poderiam contribuir de forma significativa no processo de conservação de alguma espécie (Frankham *et al.*, 2002).

Os avanços na área da genética molecular, impulsionados pelo surgimento da tecnologia do DNA recombinante e pelo desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (reação em cadeia da polimerase), provocaram a mudança da análise do genótipo a partir do

fenótipo (“genética mendeliana”), para a análise direta das variações no material genético (“genética genômica”) (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Técnicas cada vez mais acessíveis e eficientes passaram a ser constantemente aprimoradas, juntamente com métodos estatísticos que permitem a análise de informações que outras áreas não teriam como acessar. Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas atualmente no estudo de populações, destacam as que se baseiam em: microssatélites; sequenciamento de regiões específicas; e análise de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificado).

Baseado nestas técnicas é possível atualmente acessar informações a respeito da história evolutiva, de aspectos biológicos e ecológicos, além do potencial de evolução de cada espécie. Em todos estes aspectos, a diversidade genética tem sido o principal parâmetro utilizado como base das análises. No caso de espécies ameaçadas, a diminuição da variabilidade tem sido relatada como a principal causa de diversos problemas populacionais, tais como: aumento de suscetibilidade às doenças e anomalias (Packer, 1992; Sanjayan *et al.*, 1996); fixação de alelos deletérios (Hedrick *et al.*, 1996); diminuição nas taxas de crescimento, fecundidade e estabilidade fenotípica (Madsen *et al.*, 1996). A importância desta medida também foi ressaltada quando comparado os níveis de diversidade genética de espécies ameaçadas com espécies relacionadas, mas com grande tamanho populacional, sendo observada uma menor diversidade na maioria das espécies ameaçadas (Haig & Avise, 1996; Frankham *et al.*, 2002).

Desta forma, ter conhecimento do nível de variabilidade genética de uma espécie ameaçada, bem como entender como diversos fatores podem influenciar seus níveis, direta ou indiretamente, torna-se um ponto imprescindível para a conservação. A associação de tais informações com dados comportamentais e ecológicos tem possibilitado não somente a construção de um cenário mais realista do estado atual de uma população, mais também

permitido o monitoramento futuro dessas comunidades, aumentando suas chances de sobrevivência a médio e longo prazo.

4. OBJETIVO

A atual situação da espécie *Antilophia bokermanni*, considerada criticamente ameaçada de extinção devido principalmente ao uso exploratório dos recursos naturais de seu habitat, mas também por conta de seu reduzido tamanho populacional e limitada área de ocorrência, tem sido motivo de preocupação para instituições nacionais e internacionais. Os trabalhos já realizados com esta espécie (Silva & Rêgo, 2004; AQUASIS, 2006, IUCN, 2008), reforçam a necessidade da execução de ações urgentes para sua preservação.

A utilização de técnicas moleculares com o intuito de se melhor conhecer diversidade genética, a estrutura populacional e a história evolutiva desta espécie de ave ameaçada tornou-se imprescindível para a montagem do plano de conservação. Desta forma, esta tese visou desenvolver estudos moleculares com a população do soldadinho-do-araripe, buscando a produção de informações aplicáveis em processo de preservação.

4.1 OBJETIVO GERAL

Análise da diversidade genética, da estrutura populacional e da história evolutiva do soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni*) através do estudo de seqüências de porções do genoma mitocondrial e nuclear, visando elucidar questões da biologia e ecologia, relevantes para a conservação e manejo desta espécie endêmica do Brasil.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a diversidade genética presente na população do soldadinho-do-araripe, comparando-a com a de sua espécie-irmã (*A. galeata*) através de seqüências de DNA (mitocondrial e nuclear); (**Capítulo 1, 2 e 3**).
- Verificar a existência de sub-estruturação populacional (fragmentação), avaliando o nível de fluxo gênico dentro da área de distribuição de *A. bokermanni*; (**Capítulo 1 e 2**).
- Avaliar a história demográfica no que diz respeito a eventos de crescimento ou redução populacional ao longo de sua existência (**Capítulo 1 e 2**);
- Estimar o tamanho efetivo populacional baseado em dados moleculares (**Capítulo 2**);
- Estimar o nível de diferenciação genética e o tempo de separação entre as duas espécies do gênero *Antilophia*, associando à eventos biogeográficos (**Capítulo 1, 2 e 3**);
- Associar informações de sua diversidade genética com aspectos de sua biologia (**Capítulo 1, 2 e 3**);
- Listar medidas de conservação baseadas em dados genéticos que permitam preservar o potencial evolutivo desta ave (**Capítulo 1, 2 e 3**);

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUASIS. 2006. Plano de Conservação do Soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni*). Fortaleza - CE.
- Azevedo Jr., S. M.; Nascimento, J. L. X. & Nascimento, I. L. S. 2000. Novos registros de ocorrência de *Antilophia bokermanni* Coelho e Silva, 1998 na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. Ararajuba. 8(2): 133 - 134.

- BirdLife International. 2000. Threatened birds of the world. Barcelona and Cambridge: Lynx edicions and BirdLife International.
- BirdLife International. 2008. Rare Birds Yearbook 2008: The World's 189 Most Threatened Birds.
- Cavalcanti, R. B. & Marini, M. A. 1993. Body masses of birds of the cerrado region, Brazil. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*. 113(2): 211 - 214.
- Coelho, A. G. M. & Silva, W. A. G. 1998. A new species of *Antilophia* (Passeriformes: Pipridae) from Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. *Ararajuba*, 6(2): 81 - 84.
- Dias, B. F. S. 2001. Demandas Governamentais para o monitoramento da diversidade biológica brasileira. *In: Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento*. Editora Vozes, Petrópolis – RJ, 17 - 28.
- DNPM. 1996. Projeto Avaliação Hidrogeológica da Bacia Sedimentar do Araripe. Recife: Departamento Nacional de Produção Mineral.
- Fernandez, F. A. S. 1997. Efeitos da fragmentação de ecossistemas: a situação das unidades de conservação. Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. Anais Volume 1 - Conferências e Palestras. Curitiba - PR.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Edição. Brasília - DF: EMBRAPA-CENARGEN.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. University Press, Cambridge, UK.
- Gilpin, M. E & Soulé, M. E. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. *In: Soulé, M. E. (Ed.), Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*, Sinauer, Sunderland.

- Girão, W. & Souto, A. 2005. Breeding period of Araripe Manakin *Antilophia bokermanni* inferred from vocalization activity. *Cotinga*, 24: 35 - 37.
- Haig, S. M. & Avise, J. C. 1996. Avian conservation Genetics. *In*: Avise, J. C. (ed.) Conservation Genetics: Case histories from nature. New York, Chapman & Hall, 160 - 189.
- Hedrick, P. W., Lacy, R. C., Allendorf, F.W. & Soulé, M.E. 1996. Directions in conservation Biology: comments on Caughley. *Conservation Biology* 10(5): 1312 - 1320.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. 2008. Estimativas populacionais para os municípios brasileiros. [Online.] Available at <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008/default.shtm>.
- IUCN. 2008 - The IUCN Red List of Threatened Species™ 2008. [Online.] Available at redlist@iucn.org.
- Lande, R. & Barrowclough, G. F. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. *In*: Soulé, M.E. (Ed.), Viable Population for Conservation. Cambridge University Press, Cambridge, 87 – 124.
- Leakey, R. & Lewin, R. 1995. The sixth extinction: patterns of life and the future of humankind. Anchor Books, New York.
- MacArthur, R. H. & Wilson, E. O., 1967. The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press, Princeton.
- Madsen, T.; Stille, B. & Shine, R. 1996. Inbreeding depression in a isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* 75: 113 - 118.
- Marini, M. A. 1992. Notes on the breeding and reproductive biology of the Helmeted Manakin. *Wilson Bull.* 104(1): 168 - 173.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. 2003. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. [Online.] Available at www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm.

- Pacheco, J. F. & Parrini, R. 1995. O “rei-dos-tangarás” (*Chiroxiphia caudata* x *Antilophia galeata*) no sul de Minas Gerais. *Atualidades Ornitológicas*, 66: 14.
- Packer, C. 1992. Captives in the wild. *National Geographic*, 181 (4): 122 - 136.
- Pires, A. S. 2000. Apostila: Efeitos da fragmentação florestal sobre populações animais. Departamento de Ecologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- Primack, R. B. & Rodrigues, E. 2001. *Biologia da Conservação*. Londrina - PR.
- Prum, R. O. 1990a. A Test of the Monophyly of the Manakins (Pipridae) and of the Cotingas (Cotingidae) Based on Morphology. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, The university of Michigan*. 723: 1 - 44.
- Prum, R. O. 1990b. Phylogenetic Analysis of the Evolution of Display Behavior in the Neotropical Manakins (Aves: Pipridae). *Ethology*, 84: 202 - 231.
- Prum, R. O. 1992. Syringeal Morphology, Phylogeny, and Evolution of the Neotropical Manakins (Aves: Pipridae). *American Museum Novitates*, 3043: 1 - 65.
- Rêgo, P. S.; Araripe, J.; Marceliano, M. L. V.; Sampaio, I. & Schneider, H. 2007. Phylogenetic analyses of the genera *Pipra*, *Lepidothrix* and *Dixiphia* (Pipridae, Passeriformes) using partial cytochrome *b* and 16S mtDNA genes. *Zoologica Scripta*, 36: 565 - 575.
- Sanjayan, M. A., Crooks, K., Zegers, G. & Foran, D. 1996. Genetic variation and the immune response in natural populations of pocket gophers. *Conservation Biology* 10(6): 1519 - 1527.
- Shaffer, M. L. 1981. Minimum population sizes for species conservation. *BioScience*, 31: 131 - 134.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira SA, Rio de Janeiro - RJ.
- Silva, W. A. S. & Rêgo, P. S. 2004. Conservação do soldadinho-do-araripe *Antilophia bokermanni* (Aves: Pipridae): subsídios para a elaboração do plano de manejo. Recife:

Observadores de Aves de Pernambuco; Curitiba: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza.

Soulé, M. E. 1983. What do we really know about extinction. In: Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B. & Thomas, W.L. (Eds.), *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*, The Benjamin / Cummings publishing Company, Inc., California.

Soulé, M. E. 1985. What is conservation biology?. *BioScience*, 35: 727 - 734.

Soulé, M. E. 1987. Where do we go from here? *In*: Soulé (ed). *Viable populations for conservation*. Cambridge, England: Cambridge University Press: 175 - 183.

Tello, J. G.; Moyle, R. G.; Marchese, D. J.; Cracraft, J. 2009. Phylogeny and phylogenetic classification of the tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannides). *Cladistics*. 25: 429 - 467.

Thomas, C. D. 1990. What do real populations tell us about minimum viable population sizes? *Conservation Biology*. 4: 324 - 327.

Traylor, M. A. 1977. A classification of the tyrant flycatchers (Tyrannidae). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 148: 128 - 184.

Vasconcelos, M. F.; Neto, S. D.; Nemésio, A. 2005. Observações sobre o rei-dos-tangarás *Chiroxiphia caudata* X *Antilophia galeata* em Minas Gerais, Brasil. *Cotinga*, 23: 65 - 69.

Veloso, H. P.; Rangel Filho, A. L. R.; Lima, J. C. A. 1991. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

CAPÍTULO 1

**POPULATION GENETIC STUDIES OF MITOCHONDRIAL PSEUDO-CONTROL
REGION IN THE ENDANGERED ARARIPE MANAKIN (*ANTILOPHIA
BOKERMANNI*)**

Péricles S. Rêgo, Juliana Araripe, Weber A. G. Silva, Ciro Albano, Thieres Pinto, Alberto Campos, Marcelo Vallinoto, Iracilda Sampaio & Horacio Schneider

Artigo publicado no periódico científico *The Auk*, vol. 127(2): 335 – 342, 2010.

DOI: 10.1525/auk.2009.09052



POPULATION GENETIC STUDIES OF MITOCHONDRIAL
 PSEUDO-CONTROL REGION IN THE ENDANGERED
 ARARIPE MANAKIN (*ANTILOPHIA BOKERMANI*)

PÉRICLES S. RÉGO,^{1,2,5} JULIANA ARARIPE,¹ WEBER A. G. SILVA,³
 CIRO ALBANO,³ THERES PINTO,³ ALBERTO CAMPOS,³ MARCELO VALLINOTO,^{1,4}
 IRACILDA SAMPAIO,¹ AND HORACIO SCHNEIDER¹

¹Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, Brazil;

²Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brazil;

³Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos, Fortaleza, Brazil; and

⁴Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão,
 Universidade do Porto, Vairão, Portugal

ABSTRACT.—The Araripe Manakin (Passeriformes: Pipridae: *Antilophia bokermanni*) is the most threatened passeriform species and is classified as critically endangered. With an estimated population of only 800 individuals, this species is endemic to a small area (~30 km²) of forest on the slopes of the Araripe Plateau in northeastern Brazil. The urgent need to implement an effective conservation program for the Araripe Manakin has stimulated intensive research into various aspects of its biology. We sequenced a segment of the mtDNA between the genes ND6 and 12S rDNA, which includes a pseudo-control region. This region was analyzed in 30 specimens of *A. bokermanni* with the aim of measuring intraspecific genetic diversity and population structure. Although the segment's position is the same as described in other bird species, *A. bokermanni* differs in some aspects, such as its length of 200 base pairs and the absence of indels or tandem repeats. Our analysis provides no evidence of population substructuring or a history of population expansion. The species' genetic variability is slightly reduced in comparison with its sister species *A. galeata*, but their similarity indicates a relatively recent process of separation. Received 17 December 2008, accepted 27 August 2009.

Key words: *Antilophia bokermanni*, Araripe Manakin, conservation, population genetics, pseudo-control region.

Estudios de Genética Poblacional sobre la Falsa Región de Control en la Especie Amenazada *Antilophia bokermanni*

RESUMEN.—*Antilophia bokermanni* (Passeriformes: Pipridae) es la especie de paseriforme más amenazada y está clasificada como en peligro crítico. Con una población estimada de sólo 800 individuos, esta especie es endémica de un área pequeña (~30 km²) de bosque en las faldas de la meseta de Araripe en el noreste de Brasil. La necesidad de implementar de forma urgente un programa de conservación efectivo para *A. bokermanni* ha estimulado intensas investigaciones sobre varios aspectos de su biología. Secuenciamos un segmento del ADNmt ubicado entre los genes ND6 y 12S rDNA, el cual incluye una falsa región de control. Esta región fue analizada en 30 especímenes de *A. bokermanni* con el objeto de medir la diversidad genética intraespecífica y la estructura poblacional. Aunque la posición del segmento es la misma que ha sido descrita en otras especies de aves, *A. bokermanni* difiere en algunos aspectos, como su longitud de 200 pares de bases y la ausencia de inserciones o deleciones y de repeticiones en tándem. Nuestros análisis no brindan evidencia de subestructura poblacional ni de una historia de expansión poblacional. La variabilidad genética de la especie es ligeramente reducida en comparación con su especie hermana *A. galeata*, pero su similitud indica un proceso de separación relativamente reciente.

THE ARARIPE MANAKIN (Passeriformes: Pipridae: *Antilophia bokermanni*) was described in 1998 by Galileu Coelho and Weber Silva in what has been considered one of the most important ornithological finds of the past few decades. Although very similar to its sister species the Helmeted Manakin (*Antilophia galeata*

Lichtenstein, 1823), which is found in the gallery forests of the central Brazilian Cerrado biome, the Araripe Manakin differs principally in its vocalizations and the predominantly whitish coloration of the adult males (Coelho and Silva 1998). Although most other piprids have lek mating systems, these two species differ in

⁵Present address: Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Campus Universitário de Bragança, Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 68600-000, Brazil
 E-mail: periclesena@yahoo.com.br

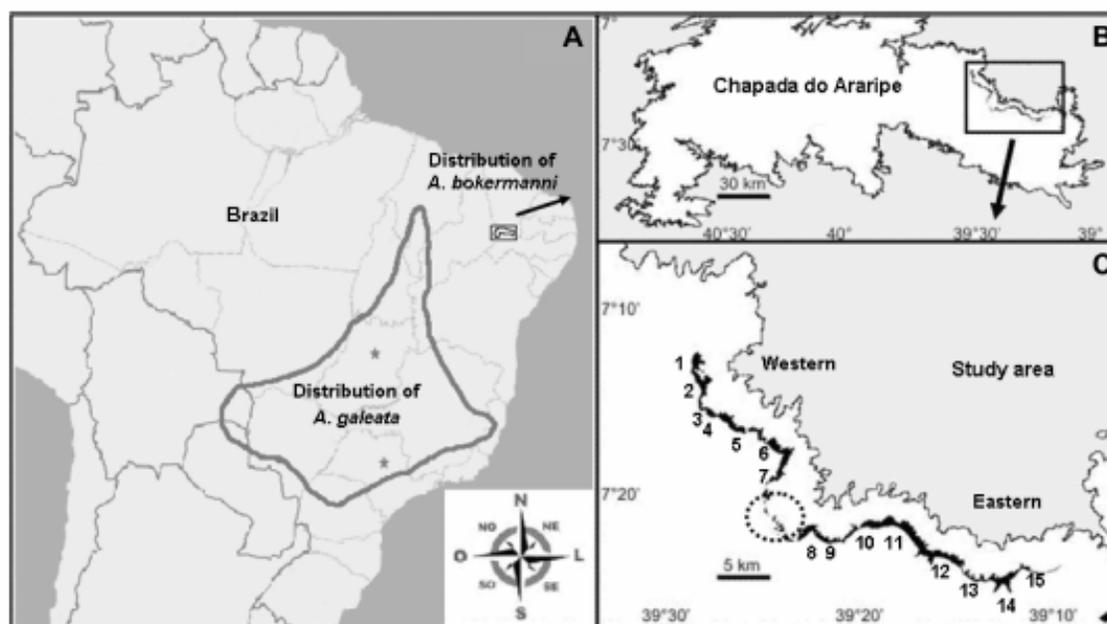


FIG. 1. (A) Collecting localities for *Antilophia bokermanni* (rectangle) and *A. galeata* (stars). (B) Distribution of *A. bokermanni* on the Araripe Plateau (Chapada do Araripe), Brazil. (C) Location of the collecting sites for *A. bokermanni* (numbers) and the lacuna (dotted circle) within its geographic range.

having a socially monogamous mating system that lacks elaborate courtship rituals (Prum 1990, 1992).

The Araripe Manakin, which is endemic to the Brazilian state of Ceará, has been classified as being in critical danger of extinction by both Brazilian and international organizations (Ministério do Meio Ambiente 2003, Hirschfeld 2008) because of its restricted distribution, the reduced size of its population, and habitat loss. The most recent study of the species indicated that its current geographic distribution covers no more than 30 km² of the forests on the slopes of the Araripe Plateau (Hirschfeld 2008). This area, which contains the best-conserved tracts of habitat, consists of a narrow strip of forest <500 m wide that stretches <60 km between the extremes of the species' range on the plateau's northeastern slope (Fig. 1A). The Araripe Manakin is found only in the plateau's humid forests, including the less well-preserved areas, which indicates a degree of tolerance of anthropogenic habitat disturbance. The presence of running water from mountain springs and the microclimate of the slope have been identified as the primary factors that influence habitat selection.

Field data from 2001 through 2004 indicate that the species is absent from the center of its distribution (dotted circle in Fig. 1C), which means that the population is divided into a western subpopulation and an eastern subpopulation. Preliminary surveys indicated a population of 50 to 250 individuals (BirdLife International 2000). More recently, population size was assessed more systematically by determining the number of adult males per spring and extrapolating this value according to the number and quality of springs within the known distribution. This resulted in a probably more realistic estimation of total population size (including adults and juveniles) of ~800 individuals, which is still low enough to be of considerable concern for conservation (Hirschfeld 2008).

Studies of the viability of endangered species have increasingly included the application of genetic tools to aid in identifying and understanding the factors that influence their survival (Frankham et al. 2002). Phenomena such as loss of genetic variability, inbreeding, and subpopulation structuring are problematic for species with highly reduced ranges or population size (Saccheri et al. 1998, Westemeier et al. 1998, Primack and Rodrigues 2001). Mitochondrial DNA (mtDNA) has been widely used as a molecular marker because of its usefulness in analyzing genetic diversity, population structure, and demographic history (Avice 2000). In the present study, we sequenced the segment of mtDNA between the genes ND6 and 12S rRNA in 30 specimens of *A. bokermanni*. In many species of birds, this segment is known as the pseudo-control region (ψ CR; Mindell et al. 1998, Haring et al. 1999, Bensch and Härdig 2000). For comparison, we also analyzed samples from the sister species, *A. galeata*, which is distributed in the Cerrado and Pantanal of Brazil, northeastern Paraguay, and northeastern Bolivia (del Hoyo et al. 2004). Although both species occur in the Cerrado biome, there is no evidence of sympatry or contact between the species. As part of a baseline effort to develop effective conservation strategies, we used our genetic data to evaluate the demographic history of *A. bokermanni* and to evaluate the hypothesis that the eastern and western subpopulations differ genetically.

METHODS

Sampling.—Samples were collected between May 2003 and February 2004 in the northeastern portion of the Araripe Plateau (Chapada do Araripe) in the Brazilian state of Ceará (39°18'08"S, 7°18'18"W). The locations of collecting sites were determined by confirming the presence of the species through observations or

records of vocalizations (Fig. 1C). Our analysis did not include sexing of samples, but the sex ratio for *A. bokermanni* appears to be 1:1 (P. S. Rêgo unpubl. data). The specimens were captured in mist nets set up adjacent to the springs, and samples of blood or feather bulbs were collected and stored in 70% ethanol. Once each bird was processed, a wing feather was clipped in a unique manner to prevent resampling. Tissue samples of *A. galeata* from São Carlos in the Brazilian state of São Paulo (22°00'51"S, 47°53'28"W) and from Brasília (15°46'36"S, 47°55'41"W) (see stars in Fig. 1A) were provided by researchers from the Federal University of São Carlos and the University of Brasília, respectively.

Extraction, amplification, and sequencing of DNA.—The samples were registered according to the regulations of the Genetics and Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Pará and were stored in freezers until analysis. DNA was extracted by ribonuclease digestion for 1 h at 37°C, and then proteinase K was added for 2–4 h (or overnight) at 55°C. The product was washed liberally in phenol-chloroform and precipitated with isopropanol (Sambrook et al. 1989).

Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the control region (D-loop) of the mitochondrial genome, including the flanking segments of the genes ND6 and 12S rRNA. The primers used in the present study were those described by Sorenson et al. (1999): ND6 L-16525 (5'-ACA AAC ACC ACT AAC ATT CCA CC-3') and 12S rRNA H-1858 (5'-TCG ATT ACA GAA CAG GCT CCT CTA G-3'). Each reaction was conducted in a final volume of 50 μ L containing 8 μ L of the mixture of deoxynucleotides (1.25 mM), 5 μ L of the 10 \times Taq buffer, 2 μ L of MgCl₂ (25 mM), 1 μ L of each primer (200 ng μ L⁻¹), ~150 ng of the total DNA, 0.5 μ L of the Taq polymerase enzyme (5 U μ L⁻¹; Invitrogen, Carlsbad, California), and sterile distilled water to complete the final reaction volume. Amplification conditions consisted of an initial 5-min step for denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 2 min at 72°C. Final extension took 5 min at 72°C.

The products of the amplification were purified using the ExoSAP-IT kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, United Kingdom), for which 2 μ L of the enzymatic solution was added to each 5 μ L aliquot of the PCR reaction, and then incubated at 37°C for 15 min and then a further 15 min at 80°C. The products of this purification were submitted to a new PCR reaction, this time by the dideoxyterminal method (Sanger et al. 1977), with reagents of the Big Dye kit (ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, Applied Biosystems, Foster City, California). Sequencing reactions were conducted in a final volume of 10 μ L, containing 1 μ L of the purified samples, 0.5 μ L of one of the primers (concentration of 200 ng μ L⁻¹), 3 μ L of buffer (Tris 0.4 M pH 9.0/MgCl₂ 25 mM), 1 μ L of Big Dye mix, and 4.5 μ L of sterile distilled water to complete the final volume. This volume was submitted to a program of different temperatures: 25 cycles of 50 s at 96°C, 5 s at 50°C, and 4 min at 60°C. Reagents not incorporated during the reaction were eliminated by washing with isopropanol. The nucleotide sequences of the gene fragments produced by this reaction were determined in an ABI 377 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) automated sequencer.

Sequence alignment and population analyses.—The sequences obtained were subjected to automatic multiple alignment with the CLUSTAL-W application (Thompson et al. 1994), using the penalty parameters suggested by Schneider (2003). The file thus generated

was converted into the FASTA format and transferred to the BIO-EDIT sequence editor (Hall 1999) for visual inspection of the alignment and possible correction of the coding of any observed insertions or deletions. Nucleotide composition, the number of haplotypes and polymorphic sites, and the rates of divergence between the sequences of the two species were computed using MEGA, version 3.1 (Kumar et al. 2004). Phylogenetic arrangements of the haplotypes of the two species were obtained through the PAUP* program, version 4.10 (Swofford 2002), using the neighbor-joining (NJ), maximum-parsimony (MP), and maximum-likelihood (ML) methods. The significance and robustness of the arrangements obtained were estimated on the basis of bootstrap values with 1,000 pseudoreplications. The possible presence of the hypothesized barrier to gene flow across the center of the distribution was tested using Monmonier's Maximum Differentiation Algorithm, run in ALLELES IN SPACE, version 1.0 (Miller 2005).

The programs DNASP, version 3.51 (Rozas et al. 2003), and ARLEQUIN, version 3.01 (Excoffier et al. 2005), were used to calculate the following parameters of genetic diversity and population structuring in *A. bokermanni*: haplotype (h ; Nei 1987) and nucleotide (π ; Nei 1987) diversity; the fixation index, F_{ST} (Weir and Hill 2002); hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) and the number of migrants per generation ($M = Nm$). NETWORK, version 4.5 (Bandelt et al. 1999), was used to produce a haplotype network through the method of median vectors. This allows a comparison between the observed distribution of haplotypes and that generated by the analysis of population structuring.

Population growth, stability, or decline was evaluated by analyzing the distribution of the number of observed pairwise haplotype differences, known as the mismatch distribution (Rogers and Harpending 1992), for the population as a whole and for the two hypothesized subpopulations, using DNASP. Values expected according to the sudden-population-expansion model were computed and plotted together with the observed values, and the significance of the sum of the squared deviations (SSD) was used to test the hypothesis of expansion. Three parameters of the sudden-expansion model were also tested using ARLEQUIN: Harpending's raggedness (r), the values of θ before and after the expansion process (θ_0 and θ_1), and the estimate of the time of expansion measured in mutational units ($\tau = \tau$). The last is a statistical parameter applied to the mismatch plot to assess robustness and significance, as well as the time course of population expansion (t).

Deviations from the model of neutral evolution of infinite sites were tested using Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's F_s (Fu 1997), run in ARLEQUIN. These neutrality tests are designed to assess whether the population is evolving under the influence of some selective pressure or experiencing demographic events (expansion or reduction), if the null hypothesis of neutrality is rejected ($P < 0.05$).

RESULTS

A total of 30 samples of *A. bokermanni* were collected from 15 sites and analyzed together with 20 samples of *A. galeata* from Brasília ($n = 5$) and São Carlos ($n = 15$) (Table 1). In contrast to results in most other birds, the segments obtained by amplification and sequencing were much smaller than expected for the control region (D-loop). By comparing sequences deposited in GenBank,

TABLE 1. Sample information and collecting sites in Ceará (*Antilophia bokermanni*) and in São Paulo and Brasília (*A. galeata*), Brazil.

Species	Collecting site ^a	Number of samples	Sample codes
<i>A. bokermanni</i>	(1) Sítio Vale Verde	2	CLU_01, CLU_02
	(2) Fazenda Bebida Nova	2	CVV_01, CVV_02
	(3) Nascente da AABEC	2	CAA_01, CAA_02
	(4) Nascente do Grangeiro	2	CPI_01, CPI_02
	(5) Sítio Melo	2	BME_01, BME_02
	(6) Nascente do Céu	2	BCE_01, BCE_02
	(7) Nascente do Farias	2	BFA_01, BFA_02
	(8) Nascente dos Guaribas	1	BGA_01
	(9) Nascente Riacho do Meio	2	BRM_01, BRM_02
	(10) Nascente Santa Rita	2	BSR_01, BSR_02
	(11) Nascente do Silvério	2	BSI_01, BSI_02
	(12) Fazenda Serra do Mato	2	MHE_01, MHE_02
	(13) Nascente do Furtado	3	MFU_01, MFU_02, MFU_03
	(14) Nascente do Cafundó	1	MCA_01
	(15) Sítio Valentim	3	MVA_01, MVA_02, MVA_03
<i>A. galeata</i>	São Carlos-SP	5	AGA_39, AGA_40, AGA_41, AGA_42, AGA_43
	Brasília-DF	15	AGA_75, AGA_78, AGA_131, AGA_134, AGA_410
			AGA_454, AGA_519, AGA_545, AGA_612, AGA_639
			AGA_761, AGA_795, AGA_822, AGA_906, AGA_1010

^aNumbers refer to the sites marked in Figure 1C.

we were able to confirm that the fragment obtained here did not correspond to the control region but rather to a pseudo-control region (ΨCR; Haring et al. 1999). The genus *Antilophia* is therefore consistent with the arrangement of the mitochondrial genome already described in the Passeriformes and other bird orders (Mindell et al. 1998, Bensch and Härlid 2000, Haring et al. 2001), in which a ΨCR, rather than the D-loop, is found between the genes ND6 and 12S rRNA.

Once the sequences were edited, the segment comprised 788 base pairs (bp), of which 200 correspond to the pseudo-control region. The rest of the amplified segment corresponded to parts of the 12S rDNA (~290 bp) and ND6 genes (~150 bp), in addition to tRNA^{GLU} and tRNA^{PHE}. No indels (insertions or deletions) were observed, with the exception of a sequence found in *A. galeata* (specimen Aga_75), in which three bases had been deleted. No evidence was found (e.g., no stop codons in the 12S rDNA and ND6 genes, no double bands in the PCR, and no double peaks in the chromatogram) to suggest that the segment is a nuclear copy of a segment of the avian mitochondrial genome (NUMT; Quinn 1997). The sequences that we obtained were deposited in GenBank (accession numbers GQ849229–GQ849258 for *A. bokermanni* and GQ849259–GQ849278 for *A. galeata*).

Seven variable sites (~1% of the total) were identified in the *A. bokermanni* sequences, resulting in 6 distinct haplotypes distributed among the collecting sites (Table 2). Of these 7 polymorphic sites, one was located in the ND6 segment, 3 in the region of the ΨCR, and the remaining 3 in the 12S rDNA, with no variation found in the tRNAs. Seven haplotypes were identified in the 20 specimens of the sister species (*A. galeata*), resulting from 12 variable sites and the deletion in Aga_75. The nucleotide composition of the sequences of both species was highly similar, with a predominance of adenine and cytosine (37.4% and 29.2% of bases, respectively) and a deficiency of guanine (11.7%), which corresponds to the known pattern of mitochondrial sequences in birds (Baker

and Marshall 1997, Haring et al. 2001, Ruokonen and Kvist 2002). In all samples from both species, all changes at the variable sites were transitions.

The observed rates of nucleotide divergence in the haplotypes of the two species were very similar (<1.5%, mean = 0.5 ± 0.2 [SD]). The consensus phylogenetic arrangement produced by the three methods (NJ, MP, and ML) revealed a star-like tree with no node resolution (data not shown). This similarity between the two sister species is even more evident in the haplotype network (Fig. 2), which reveals two principal and divergent mitochondrial lineages (H_1 and H_3), which represent 50% of the specimens analyzed. The remaining specimens have haplotypes that diverge by only a few mutations, probably derived from the more abundant lineages. The presence of most of the different haplotypes in each of the two hypothesized subpopulations (east and west) is a further indication of the overall homogeneity within the species and the absence of any differentiation. The most common haplotype in the population of *A. bokermanni* (H_3) was also recorded in *A. galeata* (Fig. 2 and Table 2), albeit at a lower frequency. The second-most-common haplotype in *A. bokermanni* (H_1) was absent in *A. galeata*.

The indices of intraspecific genetic diversity were slightly lower in *A. bokermanni* (Table 3) than in *A. galeata*, even though the latter was represented by a smaller sample. Both haplotype (*h*) and nucleotide (π) diversity in *A. bokermanni* were moderate in comparison with results of other avian studies, although the values were higher than those recorded for some endangered species (Questiau et al. 1998, Asai et al. 2006, Lopes et al. 2007). No differences in diversity indices were found between the eastern and western subpopulations.

A negative, nonsignificant value was obtained for the fixation index ($F_{ST} = -0.00471$) between "east" and "west" samples of *A. bokermanni*, corroborating the lack of differentiation between the eastern and western subpopulations. The AMOVA analysis indicated that all the molecular variability occurred at the level of

TABLE 3. Indices of genetic diversity for *Antilophia bokermanni* and *A. galeata* obtained from 788 base pairs of mtDNA between the ND6 and 12S rRNA genes (n = number of individuals, Nh = number of haplotypes, h = haplotype diversity, and π = nucleotide diversity).

Species	Population	n	Nh	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$
<i>A. bokermanni</i>	Western subpopulation	14	4	0.659 \pm 0.090	0.0046 \pm 0.0006
	Eastern subpopulation	16	5	0.758 \pm 0.080	0.0037 \pm 0.0006
	Whole population	30	6	0.722 \pm 0.062	0.0041 \pm 0.0004
<i>A. galeata</i>	Whole population	20	7	0.884 \pm 0.031	0.0049 \pm 0.0005

the whole population (100%) rather than among subpopulations, which further contradicts the hypothesis of differentiation between the eastern and western subpopulations. Monmonier's algorithm was consistent with the hypothesis that the east-west gap serves as a potential barrier to gene flow (data not shown).

The mismatch plots were multimodally distributed (Fig. 3), confirming the results of the haplotype network, which indicated two common but divergent haplotypes. Graphs with a multimodal distribution contradict the hypothesis of a process of expansion in panmictic populations and instead suggest other processes, such as hitchhiking effects or retention of ancestral polymorphisms (Rogers and Harpending 1992). The P value for the comparison of observed and expected values (SSD) did not differ for any analyzed group (Table 4).

The values of θ_0 and θ_1 for both the total population and the two subpopulations overlapped (Table 4), which indicates no expansion. This conclusion is further corroborated by the lack of differences in the raggedness index (Table 4). Similarly, although the values of both Tajim's D and Fu's F_s were positive for all groupings (Table 4), none was significant ($P > 0.01$).

DISCUSSION

Because little more than a decade has passed since the discovery of *A. bokermanni*, data on population structure and dynamics are still scarce. The principal, integrated study of the characteristics of this bird was conducted by the nongovernmental organization Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (Association for Research and Preservation of Aquatic Ecosystems). The project was supported by prominent Brazilian and international institutions and resulted in the Araripe Manakin Conservation Plan (Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos 2006), which presents information on home range, population size, reproduction, and dispersal.

In the present study, we sequenced the ψ CR, a small segment of ~200 bp with no repetitions or indels in either *A. bokermanni* or *A. galeata*. The utility of the ψ CR for both inter- and intraspecific studies of birds remains to be determined because of (1) the limited number of species in which it has been described, (2) the lack of reliable estimates of its rate of evolution, and (3) the difficulties of sequence alignment between distinct species (Riesing et al. 2003, Kruckenhauser et al. 2004, Nittinger et al. 2005).

The indices of genetic diversity in *A. bokermanni* ($\pi = 0.0041$ and $h = 0.722$) were moderate and differed little from those in *A. galeata* (Table 3). Given the differences between the two species in sample size and geographic distribution, the relative lack of differentiation found between them is intriguing. Considering the

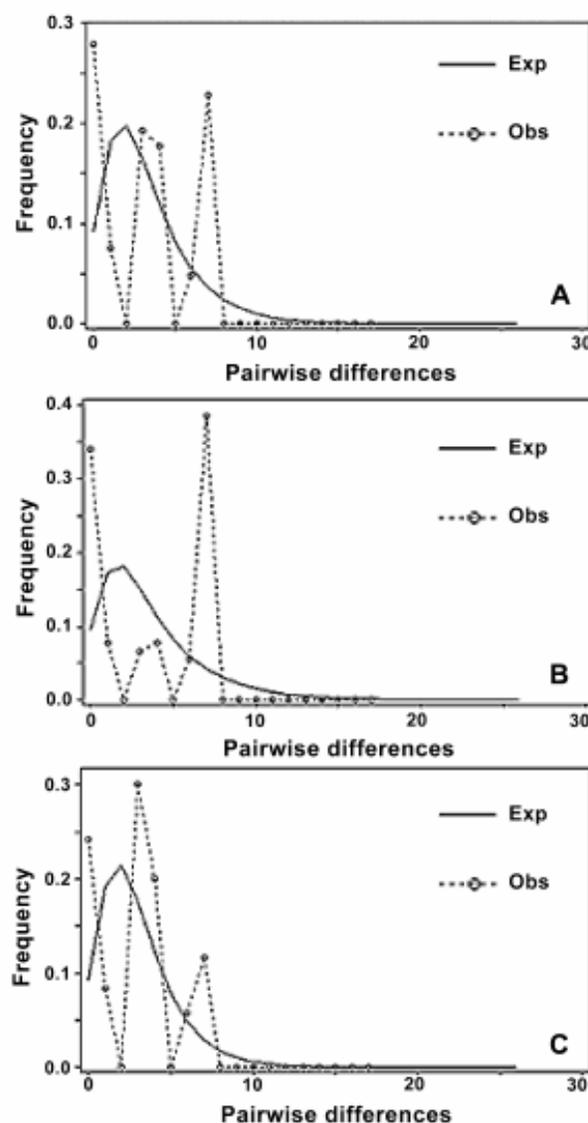


FIG. 3. Mismatch distribution of the sequences of the pseudo-control region of *Antilophia bokermanni*, based on the sudden-expansion model. Frequency is expressed as a fraction of all comparisons. Expected and observed values are marked "Exp" and "Obs," respectively.

TABLE 4. Statistics for mismatch distribution and neutrality tests in *Antilophia bokermanni* and *A. galeata* (n = number of haplotypes; τ = estimate of the time of expansion in mutational units; θ_0 and θ_1 = estimate of population size before and after the expansion, respectively; r = raggedness index).

Species	Statistical parameter of the mismatch distribution					Neutrality tests		
	n	τ	θ_0	θ_1	r	SSD	Tajima's D	Fu's F_s
<i>A. bokermanni</i>								
Western subpopulation	14	7.975	0.000–4.986	1.495–56.841	0.3455*	0.159*	2.35233*	2.95544*
Eastern subpopulation	16	4.702	0.000–4.399	0.991–28.922	0.1924*	0.077*	1.40378*	1.37835*
Whole population	30	7.080	0.000–6.281	1.047–109.775	0.2018*	0.080*	2.4732*	2.05445*
<i>A. galeata</i>								
Whole population	20	2.013	0.000–13.893	5.042–705.962	0.1020*	0.035*	1.2370*	0.98955*

*Not significant ($P < 0.05$).

combination of factors that have led *A. bokermanni* to the brink of extinction, these levels of diversity might be considered relatively high in comparison with other endangered bird species (Moum and Arnason 2001, Van Den Bussche et al. 2003, Martínez-Cruz et al. 2004, Asai et al. 2006). The results of the mismatch distribution (multimodal) and the haplotype network (small number of unique haplotypes) argue against a hypothesis of demographic expansion and for a hypothesis of retention of ancestral polymorphisms that predate the separation of the two species. Similarly, the results of the tests for deviations from neutrality (D and F_s) were positive, although not significant, providing further evidence against population expansion. This could also indicate a recent bottleneck. It will be necessary to use other, more sensitive markers (e.g., microsatellites) to test this hypothesis.

We also found basically the same haplotypes in both species of *Antilophia* (Fig. 2), which suggests incomplete lineage sorting. Our results therefore indicate a surprising degree of similarity between the species, given their disjunct ranges and pronounced morphological (plumage color) divergence.

We found no evidence of population differentiation within *A. bokermanni*, despite the fairly large gap in its distribution. The AMOVA and F_{ST} tests indicated that the gap has not yet resulted in any significant substructuring of the population, at least in the mitochondrial sequence analyzed here. Given that the present study is the first to use the pseudo-control region as a population marker in Passeriformes, our results should be interpreted with caution, and we advise against making comparisons between this marker and other mitochondrial markers commonly used in the literature. Additional mitochondrial or nuclear markers may help reveal additional patterns of variation within *A. bokermanni* and *A. galeata*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)/Universidade Federal do Pará (UFPA) through a Ph.D. scholarship. We are very grateful to M. R. Francisco (Universidade Federal de São Carlos, São Carlos), A. Aleixo (Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém), and A. A. Ferreira (Universidade de Brasília, Brasília), for providing tissue samples. We also thank S. Ferrari for revision of the manuscript and D. McDonald for his editing. Samples were collected with the approval of the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (license no. 027/2005).

LITERATURE CITED

- ASAI, S., Y. YAMAMOTO, AND S. YAMAGISHI. 2006. Genetic diversity and extent of gene flow in the endangered Japanese population of Hodgson's Hawk-eagle, *Spizaetus nipalensis*. *Bird Conservation International* 16:113–129.
- ASSOCIAÇÃO DE PESQUISA E PRESERVAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS. 2006. Plano de Conservação do Soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni*). [Online.] Available at www.aquasis.org/.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- BAKER, A. J., AND H. D. MARSHALL. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. Pages 51–82 in *Avian Molecular Evolution and Systematics* (D. P. Mindell, Ed.). Academic Press, San Diego, California.
- BANDELT, H.-J., P. FORSTER, AND A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.
- BENSCH, S., AND A. HÄRLID. 2000. Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Molecular Biology and Evolution* 17:107–113.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2000. *Threatened Birds of the World*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain, and BirdLife International, Cambridge, United Kingdom.
- COELHO, A. G. M., AND W. A. G. SILVA. 1998. A new species of *Antilophia* (Passeriformes: Pipridae) from Chapada do Araripe, Ceará, Brazil. *Ararajuba* 6:81–84.
- DEL HOYO, J., A. ELLIOTT, AND J. SARGATAL, Eds. 2004. *Handbook of the Birds of the World, vol 9: Cotingas to Pipits and Wagtails*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. ARLEQUIN (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- EXCOFFIER, L., P. E. SMOUSE, AND J. M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, AND D. A. BRISCOE. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- FU, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.

- HALL, T. A. 1999. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- HARING, E., L. KRUCKENHAUSER, A. GAMAUF, M. J. RIESING, AND W. PINSKER. 2001. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) indicates an early split in the phylogeny of raptors. *Molecular Biology and Evolution* 18:1892–1904.
- HARING, E., M. J. RIESING, W. PINSKER, AND A. GAMAUF. 1999. Evolution of a pseudo-control region in the mitochondrial genome of Palearctic buzzards (genus *Buteo*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 37:185–194.
- HIRSCHFELD, E., ED. 2008. *Rare Birds Yearbook 2008: The World's 189 Most Threatened Birds*. BirdLife International, Cambridge, United Kingdom.
- KRUCKENHAUSER, L., E. HARING, W. PINSKER, M. J. RIESING, H. WINKLER, M. WINK, AND A. GAMAUF. 2004. Genetic vs. morphological differentiation of Old World buzzards (genus *Buteo*, Accipitridae). *Zoologica Scripta* 33:197–211.
- KUMAR, S., K. TAMURA, AND M. NEI. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150–163.
- LOPES, I. F., C. I. MIÑO, AND S. N. DEL LAMA. 2007. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. *Brazilian Journal of Biology* 67 (Supplement):849–857.
- MARTÍNEZ-CRUZ, B., J. A. GODOY, AND J. J. NEGRO. 2004. Population genetics after fragmentation: The case of the endangered Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology* 13:2243–2255.
- MILLER, M. P. 2005. Alldes in space (AIS): Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96:722–724.
- MINDELL, D. P., M. D. SORENSON, AND D. E. DIMCHEFF. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:10693–10697.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2003. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. [Online.] Available at www.meioambiente.es.gov.br/download/NovaListaFaunaAmeacaMMA2003.pdf.
- MOUM, T., AND E. ÁRNASON. 2001. Genetic diversity and population history of two related seabird species based on mitochondrial DNA control region sequences. *Molecular Ecology* 10:2463–2478.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NITTINGER, F., E. HARING, W. PINSKER, M. WINK, AND A. GAMAUF. 2005. Out of Africa? Phylogenetic relationships between *Falco biarmicus* and the other hierofalcons (Aves: Falconidae). *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research* 43:321–331.
- PRIMACK, R. B., AND E. RODRIGUES. 2001. *Biologia da conservação*. Midiograf Press, Londrina.
- PRUM, R. O. 1990. A test of the monophyly of the manakins (Pipridae) and of the cotingas (Cotingidae) based on morphology. *Occasional Papers of the Museum of Zoology of the University of Michigan*, no. 723.
- PRUM, R. O. 1992. Syringeal morphology, phylogeny, and evolution of the Neotropical manakins (Aves: Pipridae). *American Museum of Natural History Novitates* 3043:1–65.
- QUESTIAU, S., M.-C. EYBERT, A. R. GAGINSKAYA, L. GIELLY, AND P. TABERLET. 1998. Recent divergence between two morphologically differentiated subspecies of blue throat (Aves: Muscicapidae: *Luscinia svecica*) inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Molecular Ecology* 7:239–245.
- QUINN, T. W. 1997. Molecular evolution of the mitochondrial genome. Pages 3–28 in *Avian Molecular Evolution and Systematics* (D. P. Mindell, Ed.). Academic Press, San Diego, California.
- RIESING, M. J., L. KRUCKENHAUSER, A. GAMAUF, AND E. HARING. 2003. Molecular phylogeny of the genus *Buteo* (Aves: Accipitridae) based on mitochondrial marker sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:328–342.
- ROGERS, A. R., AND H. HARPENDING. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9:552–569.
- ROZAS, J., J. C. SÁNCHEZ-DEL BARRIO, X. MESSEGUER, AND R. ROZAS. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497.
- RUOKONEN, M., AND L. KVIST. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23:422–432.
- SACCHERI, L., M. KUUSAAARI, M. KANKARE, P. VIKMAN, W. FORTELIUS, AND I. HANSKI. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392:491–494.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, AND T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANGER, F., S. NICHLEN, AND A. R. COULSON. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:5463–5468.
- SCHNEIDER, H. 2003. *Método de Análise Filogenética: Um Guia Prático*. Editora Holos—Sociedade Brasileira de Genética Press, Ribeirão Preto.
- SORENSON, M. D., J. C. AST, D. E. DIMCHEFF, T. YURI, AND D. P. MINDELL. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:105–114.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version V4.10b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, AND T. J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680.
- VAN DEN BUSSCHE, R. A., S. R. HOCFER, D. A. WIEDENFELD, D. H. WOLFE, AND S. K. SHERRD. 2003. Genetic variation within and among fragmented populations of Lesser Prairie-Chickens (*Tympanuchus pallidicinctus*). *Molecular Ecology* 12:675–683.
- WEIR, B. S., AND W. G. HILL. 2002. Estimating F-statistics. *Annual Review of Genetics* 36:721–750.
- WESTEMEIER, R. L., J. D. BRAWN, S. A. SIMPSON, T. L. ESKER, R. W. JANSEN, J. W. WALK, E. L. KERSHNER, J. L. BOUZAT, AND K. N. PAIGE. 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science* 282:1695–1698.

CAPÍTULO 2

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO *Antilophia* (REICHENBACH 1850)
SUGERE RECENTE SEPARAÇÃO ENTRE *A. bokermanni* E *A. galeata* EVIDENCIADO
POR SEPARAÇÃO INCOMPLETA DE LINHAGENS**

Péricles S. Rêgo, Juliana Araripe, Weber A. G. Silva, Ciro Albano, Paulo Thieres, Alberto Campos, Marcelo Vallinoto, Iracilda Sampaio & Horacio Schneider

Variabilidade genética do gênero Antilophia

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO *Antilophia* (REICHENBACH 1850)
SUGERE RECENTE SEPARAÇÃO ENTRE *A. bokermanni* E *A. galeata* EVIDENCIADO
POR SEPARAÇÃO INCOMPLETA DE LINHAGENS**

Péricles S. Rêgo^{1,2,5}, Juliana Araripe¹, Weber A. G. Silva³, Ciro Albano³, Paulo Thieres³, Alberto Campos³, Marcelo Vallinoto^{1,4}, Iracilda Sampaio¹ & Horacio Schneider¹

¹Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, Brasil;

²Centro de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brasil;

³Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos, Fortaleza, Brasil; e

⁴Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, Universidade do Porto, Vairão, Portugal.

⁵Endereço para contato: Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Campus Universitário de Bragança, Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 68600-000, Brasil. E-mail: periclessena@yahoo.com.br

Resumo

O gênero *Antilophia* é formado por duas espécies de aves, cuja principal diferença morfológica está na plumagem dos machos. *A. galeata* é uma espécie bem conhecida e amplamente distribuída nas matas de galeria do bioma Cerrado. Já *A. bokermanni* foi descoberta a pouco mais de uma década, possuindo apenas uma pequena população restrita as matas de encosta do sul do Estado do Ceará - Brasil, sendo uma das aves mais ameaçadas do planeta. A necessidade de medidas urgentes para a preservação desta espécie ameaçada fez com que vários aspectos de sua biologia e ecologia fossem explorados, incluindo os genéticos por serem fundamentais para a compreensão de sua história evolutiva e avaliação de seu potencial de viabilidade. Neste trabalho nós comparamos a diversidade genética entre exemplares das duas espécies, com o intuito de avaliar o nível de variabilidade encontrada em *A. bokermanni* comparando-a com sua espécie-irmã, que se encontra em uma situação de conservação distinta. Foram analisados fragmentos mitocondriais (rRNA 16S, Cyt-B, ND6/Pseudo-Dloop/rDNA 12S) e um segmento nuclear do íntron I7BF. Os resultados mostraram uma grande similaridade nos padrões de diversidade genética das duas espécies, sendo relatado compartilhamento de haplótipos em todos os fragmentos analisados. Este perfil genético impossibilitou a estimativa do tempo de divergência e do tamanho populacional efetivo das duas. Tais resultados apontam para uma recente separação entre os dois táxons, evidenciado pelo sortimento incompleto das linhagens. O cenário biogeográfico observado na história evolutiva do gênero *Antilophia* corrobora com eventos paleoclimáticos sul-americanos envolvendo o bioma Cerrado durante o Quaternário Superior.

Palavras-chave: *Antilophia bokermanni*, *Antilophia galeata*, manakins, diversidade genética, sortimento incompleto de linhagens.

O gênero *Antilophia* (Reichenbach 1850) pertence à família dos manakins (Pipridae, Passeriformes), um grupo de aves neotropicais (Ridgely and Tudor 1994, del Hoyo et al. 2004). Este gênero foi por muito tempo um táxon monotípico, sendo composto somente pela espécie *Antilophia galeata* (Lichtenstein, 1823) até o final da década de 90. Neste período, uma nova espécie foi descoberta e descrita para a comunidade científica - *Antilophia bokermanni* (Coelho and Silva 1998). Como principal diferença morfológica que distingue as duas espécies está a coloração da plumagem dos machos adultos, sendo *A. galeata* predominantemente de cor preta, enquanto que a nova espécie apresenta a cor branca dominante (Coelho and Silva 1998). Estes mesmos autores também perceberam diferenças no padrão de vocalização de ambas, tendo sido confirmado através de comparação de seus sonogramas. Além destas características, ressalta-se a separação da área de ocorrência atual das duas espécies (**Figura 1a**), onde o ponto mais próximo dista cerca de 300 km.

Atualmente, as duas espécies de *Antilophia* apresentam status de conservação distintos. *A. galeata* é uma das espécies de aves mais abundante de seu habitat, sendo avistada com facilidade nas matas ciliares do bioma Cerrado no Brasil (Marini and Cavalcanti 1993, Marini et al. 1997), e ocorrendo também em alguns pontos do Paraguai e Bolívia (del Hoyo et al. 2004). Já *A. bokermanni* é o representante mais ameaçado de extinção de sua família, sendo considerado “criticamente em perigo” (BirdLife International 2008). Com uma população estimada em menos de 800 exemplares, esta espécie de ave é encontrada apenas em uma área de aproximadamente 30 km² nas matas de encosta da Chapada do Araripe - Brasil (AQUASIS 2006, BirdLife International 2008).

Devido à situação de perigo de extinção na qual se encontra *A. bokermanni*, pesquisas que auxiliem no processo de conservação desta espécie têm sido desenvolvidas (Girão and Souto 2005, AQUASIS 2006). Mais recentemente, Rêgo e colaboradores (2010) realizaram um estudo

através de ferramentas moleculares enfocando principalmente características populacionais de *A. bokermanni*, incluindo também sua espécie-irmã em algumas análises comparativas. Dentre os resultados obtidos, observou-se que ambas são geneticamente bastante similares, não tendo sido possível realizar um processo de distinção entre as duas espécies com o marcador mitocondrial utilizado devido ao compartilhamento de haplótipos moleculares.

Estudos com genética de populações têm revelado incongruência entre algumas árvores evolutivas (baseadas em seqüências de DNA) e eventos de especiação, onde o arranjo gênico observado não necessariamente concorda ou reflete os processos de evolução dos organismos (Pamilo and Nei 1988, Lyons-Weiler and Milinkovitch 1997, Avise 2000). Quanto mais recente for a separação das populações ou espécies, maiores as chances de haver ainda compartilhamento de haplótipos gênicos, sendo este estado chamado de Separação Incompleta de Linhagens (“*Incomplete Lineage Sorting*”) (Pamilo and Nei 1988, Avise 2000, Takahashi et al. 2001). Desta forma, mesmo apresentando distribuição, morfologia ou comportamentos distintos, o tempo de separação entre duas linhagens pode não ser suficiente para torná-las geneticamente distintas para alguns marcadores genéticos, tornando-as espécies não distintas segundo algumas definições de espécie (Sites and Marshall 2004, Aleixo 2007). Estudos com populações em estágios intermediários de divergência têm possibilitado o aumento do entendimento de padrões de especiação geográfica e delimitação de espécies (Omland et al. 2006). Ter conhecimento deste fato torna-se imprescindível em programas de conservação de espécies ameaçadas, pois o status taxonômico deve ser bem definido para que não seja negada proteção às espécies em perigo, e nem esforços sejam perdidos com espécies abundantes (Frankham et al. 2002).

Índices de diversidade genética são bons indicadores da viabilidade populacional de uma espécie (Hoelzel et al. 1993, O’Brien 1994, Groombridge et al. 2000, Sequeira et al. 2005), sendo um dos aspectos que vem sendo avaliado em programas de conservação. Além de permitir o

acesso a informações cruciais para o entendimento da dinâmica populacional, a variabilidade genética também pode auxiliar na reconstrução de partes da história evolutiva, a comparação ou validação de táxons proximalmente relacionados e estimativa do tamanho populacional efetivo (Barrowclough et al. 1999, Sequeira et al. 2005, Omland et al. 2006). A análise de diferentes loci, que evoluem em distintas taxas, aumenta a probabilidade de reconstrução da verdadeira história dos organismos (Pamilo and Nei, 1988; Hare, 2001; Hudson and Turelli, 2003; McCormack et al, 2008), apesar de trabalhos mostrarem que o uso de um único locus não-recombinante apresenta resolução suficiente para diferenciar isolamento e migração em alguns casos (Nielsen and Wakeley, 2001; Griswold and Baker, 2002; Peters et al, 2005).

No presente trabalho, nós objetivamos reconstruir parte da história evolutiva das duas espécies que compõem o gênero *Antilophia* através de dados moleculares, enfocando principalmente a espécie ameaçada *A. bokermanni*. Para isto, avaliamos seus níveis de variabilidade genética através de seqüências de DNA para marcadores mitocondriais e nucleares, com diferentes taxas de evolução. Em posse dos resultados, buscamos cruzar os dados moleculares com informações ecológicas e paleoambientais já existentes que possibilitassem a compreensão do processo de separação, da atual distribuição e de flutuações demográficas ocorridas para as duas espécies de aves, que atualmente apresentam distintos status de preservação.

Materiais e Métodos

Amostragem.-Amostras de tecido de *A. bokermanni* foram obtidas através de coletas realizadas entre os meses de Maio de 2005 e Fevereiro de 2006 (Licença nº 027/2005 - IBAMA), na porção nordeste da Chapada do Araripe no Estado do Ceará – Brasil (lat -7.304974 / lon -

39.302090) (**Figura 1b, 1c**). Os exemplares foram capturados com o uso de redes de neblina montadas próximo às nascentes nas matas de encosta e amostras de sangue ou bulbo de penas foram coletadas e acondicionadas em álcool 70%. Amostras da espécie-irmã *A. galeata* provenientes de São Carlos (lat -22.014303 / lon -47.891112) no Estado brasileiro de São Paulo (n=15) e também de Brasília - DF (lat -15.776605 / lon -47.928118) (n=5) foram obtidas através de intercâmbio com pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e da Universidade de Brasília (UnB), respectivamente (**Figura 1a**).

Extração do DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento.-As amostras receberam identificação de tombamento segundo critérios adotados pelo Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGMB) - UFPA, sendo acondicionadas em freezers até o momento de seu uso. O material genético (DNA) foi extraído através de digestão com ribonuclease por 1 hora a 37 °C, seguido da adição de proteinase K por 2-4 horas (ou “overnight”) a 55 °C. O produto foi então tratado com lavagens de fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol (Sambrook et al. 1989).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para a amplificação de três diferentes segmentos: parte do gene mitocondrial Citocromo B (Cyt-B) e de uma porção do rRNA 16S, além de um fragmento nuclear referente ao íntron-7 do Beta-fibrinogênio (I7BF). Os primers para Cyt-B utilizados no presente trabalho foram descritos por Sorenson et al. (1999): L-15560 (5' - CCG ATA AAA TCC CAT TCC ACC C - 3') e H-16064 (5' - CTT CGA TCT TTG GCT TAC AAG ACC - 3') e para 16S descritos por Palumbi et al. (1991): 5'- GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC - 3' (L-1987) e 5'- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3' (H-2609). Para obtenção de parte do I7BF foram usados iniciadores descritos por Prychitko and Moore (1997): FIB-BI7U (5'- GGA GAA AAC AGG ACA ATG ACA ATT CAC - 3') e

FIB-BI7L (5' - TCC CCA GTA GTA TCT GCC ATT AGG GTT - 3'). Cada reação foi realizada para um volume final de 25 μL , contendo 4 μL da mistura dos desoxinucleotídeos (1,25 mM), 2,5 μL do tampão da enzima *Taq* (10X), 1 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL de cada primer (200 ng/ μL), aproximadamente 80 ng do DNA total extraído, 0,25 μL da enzima *Taq* polimerase (5 U/ μL – Invitrogen) e água destilada estéril para completar o volume final da reação. As condições de amplificação para os fragmentos do Cyt-B e do 16S foram as mesmas, consistindo de uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos por 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C e 2 minutos a 72 °C, terminando com um passo de 5 minutos a 72 °C. Já os segmentos do I7BF foram obtidos com um programa de amplificação de 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 2 minutos a 74 °C, terminando com um passo de 15 minutos a 74 °C para extensão final.

Os produtos da amplificação foram purificados usando o kit ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., UK), onde em cada alíquota de 5 μL da reação de PCR foi adicionada 2 μL da solução enzimática, sendo então incubados a temperatura de 37 °C por 15 minutos e depois mais 15 minutos a 80 °C. Os purificados foram submetidos a uma nova reação de PCR, agora pelo método didesoxiterminal (Sanger et al. 1977), com reagentes do kit Big Dye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems, USA). As reações de seqüenciamento foram feitas para um volume final de 10 μL , contendo 1 μL do purificado, 0,5 μL de um dos primer (concentração de 200 ng/ μL), 3 μL do tampão (Tris 0,4 M pH 9,0 / MgCl_2 25 mM), 1 μL do mix Big Dye e 4,5 μL de água destilada estéril para completar o volume, sendo submetidas a um programa de temperaturas variadas que consistiu em: 25 ciclos de 96 °C por 50 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Reagentes não incorporados durante a reação foram eliminados através de lavagens com isopropanol. Os fragmentos gênicos resultantes

da reação de seqüenciamento tiveram suas seqüências nucleotídicas determinadas em um Seqüenciador Automático ABI 377 (Perkin Elmer).

Seqüências referentes ao segmento da ND6/ Ψ CR/12S (Rêgo et al. 2010) foram também utilizadas nesta análise, obtidas a partir do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), com número de acesso entre GQ84229 – GQ84278 (**Tabela 1**). Para as amostras usadas no presente trabalho que não tinham seqüências desta região já disponibilizadas, os segmentos foram amplificados seguindo-se o mesmo protocolo adotado pelos autores citados acima.

Alinhamento das Seqüências e Análise da Diversidade Genética Populacional.-As seqüências obtidas foram submetidas ao alinhamento múltiplo de forma automática pelo aplicativo Clustal-W (Thompson et al. 1994), com parâmetros de penalidades sugeridos por Schneider (2003). O arquivo gerado foi então convertido para o formato Fasta e transferido para o editor de seqüências Bioedit (Hall 1999), para inspeção visual do alinhamento produzido e possíveis correções na codificação das inserções ou deleções presentes.

Valores de composição nucleotídica, número de haplótipos e de sítios polimórficos, e as taxas de divergência entre as seqüências das duas espécies foram computados usando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar et al. 2004). Utilizando os programas DnaSP (versão 3.51; Rozas et al. 2003) e Arlequin (versão 3.01; Excoffier et al. 2005) foram calculados os seguintes parâmetros de diversidade genética: diversidade haplotípica (Nei 1987) e nucleotídica (Nei 1987) para cada espécie e entre suas populações, além do índice de fixação (F_{ST}) (Weir and Hill 2002) e análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). A rede de haplótipos foi construída pelo método dos vetores medianos para cada marcador, utilizando o programa NETWORK (versão 4.5; Bandelt et al. 1999).

Com o programa Isolation with Migration (IM - Hey and Nielsen 2004), que usa teoria da coalescência e método de análise bayesiana para diferenciação entre processos de isolamento e migração, foram estimados cinco parâmetros que podem afetar os níveis de diversidade genética entre populações, considerando neste trabalho que cada espécie compõe uma população: θ_{ABO} (número efetivo de *A. bokermanni*), θ_{AGA} (número efetivo de *A. galeata*), θ_{ANC} (número efetivo da população ancestral no período de separação das populações), m (m_1 e m_2 , número efetivo de migrantes por geração entre as populações), t (tempo de divergência das populações). A confiabilidade da probabilidade *a posteriori* dos parâmetros foi obtida por simulações de cadeias Markovianas, sendo os parâmetros escalados por uma taxa mutacional neutra. O procedimento inicial objetivou realizar simulações até que o estado (valores) das cadeias tenham tornado-se independentes do ponto inicial, onde foi determinado o ponto-de-corte (*burn-in*) que correspondeu a 10% do número de passos. Simulações continuaram sendo realizadas por um longo número de passos (10 milhões), enquanto medidas dos parâmetros foram reproduzidas e registradas a cada hora ao longo da corrida. Convergência entre diferentes simulações sobre a distribuição estacionária foi obtida pela análise de múltiplas cadeias independentes, iniciadas em diferentes pontos e por autocorrelação dos valores dos parâmetros no final do curso das corridas. Nós também adotamos o procedimento de permuta (*swapping*) entre múltiplas cadeias aquecidas (*Metropolis coupling*) para assegurar mais ainda que as distribuições obtidas reflitam uma ampla amostragem e produza uma distribuição estacionária (Geyer 1992). Cada marcador molecular foi designado segundo uma escala: 1.0 para autossomos e 0.25 para mtDNA. Por final, o programa foi rodado com 10.000.000 de passos para que os menores valores de ESS (*effective sample size* - Hey and Nielsen 2004) de cada parâmetro fossem superiores a 200. Os picos das distribuições resultantes foram tomados como estimativas dos parâmetros (Nielsen and Wakeley 2001). Para intervalos de credibilidade, nós adotamos para cada parâmetro o intervalo de 90% das maiores

densidades a posteriori - HPD (*highest posterior densities*), os quais são os limites que incluem 90% da confiabilidade da probabilidade a posteriori dos parâmetros. Como forma de facilitar o processo de interpretação dos parâmetros que apresentaram resultados confiáveis, nós convertimos as estimativas para unidades de mais fácil análise, segundo o sugerido para o programa Isolation with Migration (IM - Hey and Nielsen 2004, Won and Hey 2005).

Resultados

A identificação de cada exemplar e de seu número de depósito no GenBank é apresentado na **Tabela 1**. Os quatro segmentos seqüenciados totalizaram 2.615 pares de bases, dos quais 1.750 são de marcadores mitocondriais e 865 pertencem ao segmento nuclear I7BF (**Tabela 2**). Não foi encontrado nenhum indício de que os segmentos mitocondriais aqui obtidos fossem cópias nucleares de segmentos do genoma mitocondrial de aves - NUMTs (Quinn 1997, Rêgo et al. 2010). A composição nucleotídica das seqüências mitocondriais das espécies mostraram-se bastante similares, com uma maior presença das bases adenina e citosina, e menor de guanina, o que corrobora com o descrito para segmentos mitocondriais em aves (Baker and Marshall 1997, Haring et al. 2001, Ruokonen and Kvist 2002). A grande maioria das mudanças ocorridas nos segmentos mitocondriais foi do tipo transição. Já no segmento nuclear I7BF houve equilíbrio entre os tipos de mudanças ocorridas ($ts/tv = 1.5$), sendo a sua composição de bases composta principalmente por conteúdo AT (64%).

Os níveis de diversidade genética analisadas para os quatro segmentos são apresentados detalhadamente na **Tabela 2**. De uma forma geral, quando comparado os valores encontrados para cada espécie (intraespecíficos), os resultados mostraram que as duas possuem perfis de

variabilidade genética similares para todos os marcadores. Em todos os parâmetros, a espécie *A. galeata* apresentou valores levemente superiores aos encontrados para *A. bokermanni*, com exceção dos relatados para o fragmento do CytB (**Tabela 2**).

Quando comparado os níveis de diversidade genética para estimar a divergência entre as populações das duas espécies, os resultados mostraram que a variação molecular dentro do gênero (interespecífica) é muito similar a encontrada dentro de cada espécie (intraespecífica), chegando em alguns marcadores a ser até menor. Em todos os marcadores, mitocondrial ou nuclear, resultados similares apontaram para uma diferenciação incompleta entre as duas espécies (**Tabela 2**). Através da construção de redes de haplótipos para cada marcador (**Figura 2**), pôde-se constatar que a maioria dos haplótipos de alta frequência apareceram compartilhados entre as duas espécies, em todos os marcadores. Foram também observados haplótipos únicos para cada espécie, mas a maioria com baixa frequência e em pequeno número.

Os resultados do índice de fixação (F_{ST}) e da AMOVA (**Tabela 3**) mostraram que as duas populações apresentam indícios de diferenciação. Apesar de grande parte da variação observada nos quatro marcadores se encontrar entre todos os indivíduos e não separada nas espécies (populações), os índices de fixação para três marcadores (exceto do CytB) mostraram valores que sugerem diferenciação entre as duas populações ($p < 0.05$), mesmo com a grande similaridade genética e o compartilhamento de haplótipos.

Com relação aos resultados dos parâmetros estimados pelo método de coalescência no IM, dentre as distribuições obtidas (**Figura 3**), somente o θ_{ABO} e o θ_{AGA} apresentaram distribuições *a posteriori* fortemente unimodais e similares (**Figura 3a e 3b**, respectivamente). Já o θ_{ANC} (**Figura 3c**) apresentou uma distribuição no qual os valores não tenderam ao zero, impossibilitando realizar inferências a respeito do tamanho efetivo da população ancestral, em consequência de não se poder determinar o intervalo de confiança. Entretanto, se o mesmo for

levado em consideração, observa-se que houve um aumento no N_e a partir da população ancestral. O gráfico da **Figura 3d** une as distribuições obtidas para as estimativas dos θ , permitindo uma comparação visual dos valores. A distribuição para o parâmetro de migração m (**Figura 3e**) mostrou valores máximos iguais a zero em ambas as direções (m_1 = migração da população de *A. galeata* para *A. bokermanni*; m_2 = migração da população de *A. bokermanni* para *A. galeata*), evidenciando não haver contribuição de migrantes entre as duas espécies. Da mesma forma que o valor de θ_{ANC} , o gráfico com a distribuição da probabilidade *a posteriori* do tempo de divergência entre as duas populações (**Figura 3f**) apresentou-se de forma a não tocar o eixo do x, impossibilitando realizar de forma estatisticamente confiável a transformação para estimativa de separação em unidade de anos.

Discussão

Diversidade genética no gênero Antilophia.-Mesmo apresentando coloração de plumagem distintas nos machos adultos, as duas espécies do gênero *Antilophia* compartilham mais semelhanças do que diferenças, principalmente no que diz respeito a dados morfométricos, comportamentais e reprodutivos (Marini and Cavalcanti 1993, Marini et al. 1997, AQUASIS 2006). De forma similar, nós encontramos perfis genéticos semelhantes entre as espécies de *Antilophia*, apesar de outras análises mostrarem que as populações de ambas já se encontram em processo de diferenciação (F_{ST} e parâmetro de migração m). Inicialmente pensávamos encontrar índices de diversidade que pudessem distinguir *A. bokermanni* de *A. galeata*, onde as duas apresentariam também valores destoantes de variabilidade devido ao status de conservação atual em que cada uma se encontra. Contudo, marcadores com diferentes taxas evolutivas e de diferentes origens (mitocondrial e nuclear) mostraram valores semelhantes para as duas espécies,

revelando também que a divergência que separa as duas populações (interespecífica) chega a ser em alguns marcadores menor do que a divergência populacional (intraespecífica).

Os valores das estimativas de máxima-verossimilhança (MLE) e intervalos de 90% das maiores densidades *a posteriori* (HPD) dos parâmetros demográficos obtidos entre *A. bokermanni* e *A. galeata* são mostrados na **Tabela 4**, onde nenhuma conversão dos valores dos parâmetros foi realizada para obtenção de estimativas em unidades de fácil interpretação. Os valores de MLE de θ_{ABO} e o θ_{AGA} bastante similares apontam para um valor próximo de tamanho efetivo (N_e) entre as espécies, mas que provavelmente é um artefato de uma recente separação com incompleta separação de linhagens dos marcadores. Com o θ_{ANC} e também com a probabilidade *a posteriori* do tempo de separação das populações, os valores encontrados para o HPD 90% apontaram para uma ausência credibilidade estatística, impossibilitando o uso do valor MLE para conversão. Para os parâmetros de migração (m_1 e m_2), como os valores de MLE de ambos correspondem a zero, nós rejeitamos a hipótese da existência de indivíduos migrantes em ambos os sentidos, não havendo necessidade de cálculo de taxa de migrantes populacionais. Este último parâmetro além de completar os dados do índice de fixação, que evidencia uma diferenciação genética já presente entre as duas espécies, são também apoiados pela distância geográfica que separa as duas populações.

Todos estes resultados, somados a rede de haplótipos, nos reportaram a um novo cenário para a compreensão da história evolutiva e da diversidade populacional, principalmente da espécie *A. bokermanni*. Embora morfologicamente as duas espécies sejam diagnosticáveis, filogeneticamente as mesmas ainda apresentam mistura (*intermixed*) de haplótipos para os marcadores analisados, não podendo ser chamados de ramos monofiléticos. Isto coincide possivelmente com o que Omland e colaboradores (2006) denominaram de “estágios de divergência”, onde duas populações isoladas passariam por uma série de estágios de

diferenciação até que se tornem espécies válidas com perfis moleculares bem definidos. No presente caso, achamos que o evento de cladogênese que originou as duas populações foi muito recente, não tendo havido tempo suficiente para uma completa distinção das linhagens dos marcadores moleculares utilizados.

Embora os resultados mostrem que o tempo de separação entre *A. bokermanni* e *A. galeata* não tenha sido suficiente para resultar em monofilia recíproca das duas, os valores do índice de fixação e da análise de taxa de migrantes obtidos com os dados moleculares são fortes evidências do processo de especiação em andamento. Essas informações somadas a aspectos biológicos e ecológicos (Coelho and Silva, 1998), como diferenciação do fenótipo e isolamento geográfico, reforçam a tese que ambas já estão seguindo caminhos evolutivos independentes e que devem continuar sendo considerados táxons válidos, apesar de geneticamente ainda compartilharem haplótipos devido a separação incompleta de linhagens.

No contexto de análise da diferenciação das duas espécies de *Antilophia*, a aplicação do conceito de espécie é um ponto crítico, uma vez que pode interferir diretamente no processo de conservação das espécies estudadas. Dependendo da definição a ser adotada, o gênero *Antilophia* pode ou não conter duas espécies válidas. Na ornitologia, dois conceitos de espécies têm sido mais amplamente utilizados (o biológico e o filogenético), apesar de ambos apresentarem conflitos de definição e serem extremamente polarizados (Aleixo 2007). Contudo, dentro de uma nova perspectiva, surgiu o conceito filético geral de espécie (CFGE) (de Queiroz 1998), como uma síntese de diferentes conceitos, e adotando critérios ao invés de conceitos para definição de espécie, onde o componente temporal passou a ocupar um importante papel no seu entendimento (Aleixo 2007). Aqui preferimos adotar o CFGE na avaliação das duas espécies de *Antilophia*. Mesmo sabendo que o critério de monofilia para dados moleculares não se aplicou entre as duas espécies, a avaliação da diagnose por outros caracteres (plumagem, vocal) e a importância dada

para a atual ausência do fluxo gênico, nos faz aceitar que ambas são segmentos de linhagens evolutivas de nível populacional separadas por um evento de cladogênese, no qual o fator temporal ainda não permitiu a completa distinção em alguns marcadores moleculares.

Passando para uma análise comparativa dos valores de diversidade genética encontrados em *Antilopha* com outros estudos, algumas considerações devem ser feitas. O caso de *A. bokermanni* pode ser considerado atípico, uma vez que sua população ainda engloba grande parte da variabilidade também encontrada em sua espécie-irmã, mesmo estando em situação de reduzido número populacional e restrita área de ocorrência. Assim, mesmo estando na lista das espécies mais ameaçadas do planeta (IUCN 2008), *A. bokermanni* possui um nível moderado de diversidade, sendo bem mais elevado quando comparado ao de outras espécies ameaçadas (Questiau et al. 1998, Groombridge et al. 2000, Asai et al. 2006, Lopes et al. 2007).

Tanto no que diz respeito aos níveis de variabilidade, quanto no cálculo do N_e , cuidados especiais devem haver no momento das interpretações desses dados para *A. bokermanni*. Apesar de possuir níveis de variabilidade considerados bons para uma espécie ameaçada, uma população com as características desta ave sempre estará mais susceptível a processo de perda de potencial evolutivo, devido a processos como deriva genética, endogamia e principalmente pela ação antrópica. Assim, efeitos deletérios de uma pequena população restrita a uma limitada área de ocorrência com problemas de perda de habitat devem estar constantemente sendo monitorados. Manter os níveis de diversidade genética é uma das medidas necessárias para garantir a capacidade de perpetuação desta ave, sendo fortemente sugerido para o seu plano de conservação. Quanto ao cálculo do tamanho efetivo populacional de *A. bokermanni* através de dados moleculares, tal variante está sobre influência direta do processo incompleto de linhagens. Consequentemente, o N_e obtido será referente ao “pool” gênico de ambas as espécies, uma vez que *A. bokermanni* compartilha os níveis de diversidade de *A. galeata*.

Separação Incompleta de Linhagens em Antilophia.-Em algumas circunstâncias, a separação incompleta de linhagens pode ser confundida com eventos de introgressão mitocondrial (Morando et al. 2004, McGuire et al. 2007). Contudo, essa dúvida pôde ser eliminada utilizando concomitantemente marcadores nucleares, assim como pela alta probabilidade deste processo ocorrer em especiações recentes, onde a bifurcação da árvore gênica acontece antes do evento de separação das espécies (Avice 2000, Takahashi et al. 2001). Quando presente em estudos moleculares, o *incomplete lineage sorting* pode confundir inferências filogenéticas e estudos populacionais (Leaché and McGuire 2006, McGuire et al. 2007), dificultando o processo de identificação de táxons válidos. Contudo, se os sinais deste processo são reconhecidos, sua ocorrência pode proporcionar informações de eventos evolucionários que não poderiam ser detectados com outros dados (McGuire et al. 2007).

A utilização de marcadores mitocondriais e nuclear permitiu a confirmação do fenômeno de *incomplete lineage sorting* no gênero *Antilophia*, em despeito de seu perfil fenotípico e de sua distribuição geográfica distinta. As redes de haplótipos encontradas para os quatro marcadores também apóiam o processo de separação incompleta dos mesmos, reforçando a hipótese de recente separação, na escala de tempo evolutivo. Esse compartilhamento de haplótipos impossibilitou a determinação da estimativa do tempo de separação entre as espécies através do cálculo da probabilidade *a posteriori* do parâmetro t no programa IM, uma vez que a distribuição encontrada (**Figura 3f**) não apresentou base estatística para sua aplicação.

No caso apresentado neste trabalho, todos os marcadores moleculares mostraram o mesmo perfil, apesar de suas diferentes taxas evolutivas. Desta forma, outro aspecto importante é ressaltado ao tentar mostrar que este perfil de semelhança molecular é o resultado de um processo de separação recente. Segundo a definição de espécie aqui adotada (CFGE - de Queiroz 1998), estas espécies estariam passando por um segundo momento temporal no processo de especiação

(denominado T2), no qual várias gerações já se passaram após a cladogênese, as duas populações já fixaram diferenças em alguns caracteres e o fluxo genético pode estar interrompido (Aleixo 2007). Neste momento também é possível que ainda exista compatibilidade reprodutiva (invalidando o conceito de espécie biológica - Mayr 1982) e sendo filogeneticamente muito próximas, o que no presente caso mostra ainda uma monofilia incompleta (rejeitando o conceito de espécie filogenética - Cracraft 1983).

Cenário Biogeográfico.-A distribuição atual de *A. galeata* e *A. bokermanni* (**Figura 1a**) mostram algumas peculiaridades em comum, apesar de estarem inseridas em biomas distintos. Em ambas as espécies observa-se uma forte dependência a ambientes de floresta ou mata, com a presença obrigatória de fontes de água corrente (AQUASIS 2006). No caso de *A. galeata*, mesmo estando distribuída somente no bioma Cerrado que se caracteriza por ser predominantemente áreas de savanas tropicais, sua ocorrência limita-se as matas ciliares junto à córregos. De forma similar, mas localizada dentro do bioma Caatinga que se caracteriza por ser um ambiente mais seco com vegetação predominantemente xerófila, encontra-se *A. bokermanni* na encosta de uma chapada. Seu habitat, diferentemente do que acontece nas áreas de caatinga, é formado por uma vegetação de mata úmida remanescente na encosta, mantida por conta da dinâmica hidrogeológica da Chapada do Araripe, que favorece o aparecimento de nascentes em sua porção norte-oriental (AQUASIS 2006).

Trabalhos relacionados à biogeografia dos biomas de ocorrência das duas espécies ainda são escassos, apesar de serem reconhecidas como importantes áreas sul-americanas de endemismo de diversos grupos de organismos (Cracraft 1985, Haffer 1985, Sampaio 1995, Stotz et al. 1996, Pennington et al. 2000, Olmos et al. 2005). Flutuações climáticas-vegetacionais do Período Quaternário teriam possibilitado o aumento da biodiversidade, principalmente no Cerrado, através do intercâmbio entre biomas adjacentes (Silva 1995). Espécies amazônicas e

atlânticas teriam expandido seus territórios para o Cerrado durante os períodos úmidos, seguindo a expansão das matas de galeria (Silva 1995), enquanto que espécies da Caatinga e Chacos teriam colonizado o Cerrado durante períodos secos do Quaternário (Pennington et al. 2000). Mas foi o trabalho de padrões biogeográficos do bioma Cerrado realizado por Silva and Bates (2002), que possibilitou um maior entendimento do assunto para diversos grupos de organismos, mas tendo como foco principal as aves. Através de estudos com espécies endêmicas que possuíssem espécies-irmãs em outros biomas, como foi o caso do gênero *Antilophia*, avaliou-se a relação entre seu ambiente vegetacional ocupado (florestal ou não florestal) e tempo de evolução dos grupos (neoendêmicas – surgiram antes da transição Plioceno-Pleistoceno; ou paleoendêmicas - originadas antes deste período). Como resultado, observou-se que a maior parte das espécies florestais (caso da *Antilophia*) eram neoendêmicas, apoiando a hipótese de Cole (1986) que sugere que dentro do Cerrado, a vegetação de savana é mais velha que a floresta, baseando-se em informações geomorfológicas (Silva and Bates 2002). Segundo estes mesmos autores, existiu em algum momento da história geológica da Terra, uma conectividade entre o Cerrado e savanas ao Norte da América do Sul devido a similaridade biótica. Neste cenário, as savanas sul-americanas teriam seus territórios expandidos e retraídos durante ciclos climáticos do Quaternário, sendo este um dos mais importantes fatores que direcionou os processos de especiação.

Fazendo associação das informações descritas para o Cerrado com o ambiente onde se encontra *A. bokermanni*, ressalta-se duas informações que permitem hipotetizar uma antiga conectividade. O primeiro vem do fato de que no alto da Chapada do Araripe - CE, a estrutura vegetacional predominante é o denominado Cerradão, uma variação fisionômica e de composição do Cerrado (Eiten 1972, Ribeiro and Walter 1998), que caracteriza-se por possuir uma densidade maior de árvores altas, com o dossel completamente fechado. Outro ponto reside nas hipóteses de conectividade entre as áreas de savana na América do Sul (Silva and Bates 2002). Dentre as três

hipóteses avaliadas pelos autores, a de um Corredor Costeiro (pelo litoral) foi o que apresentou maior número de evidências através do legado deixado pelo padrão de distribuição de alguns gêneros de aves.

Assim, durante eventos paleoclimáticos-vegetacionais ocorridos no Quaternário, os períodos secos teriam permitido o avanço do Cerrado, com provável expansão também das matas de galeria. Em algum momento deste período, a população ancestral das duas espécies de *Antilophia* teria ocupado uma extensão bem maior do que a atual, englobando inclusive áreas onde se encontra a encosta da Chapada do Araripe. Então, após o último evento de retração do Cerrado, uma separação física, recente na escala de tempo geológica, teria isolado uma população às matas de encosta. Uma população que mesmo isolada a uma restrita área e com um pequeno tamanho populacional, aparentemente não sofreu processos de perda de variabilidade genética, como os provocados por gargalos-de-garrafa (*bottleneck*) ou efeito-fundador. O aparecimento de um fenótipo distinto deve ter ocorrido em um segundo momento após o evento de cladogênese, onde por conta da peculiaridade de uma seleção sexual atuante na espécie e também devido ao reduzido tamanho populacional, possibilitou a fixação de um novo caráter morfológico expressado nos machos adultos.

A tentativa de se estimar o tempo de separação das duas populações através do cálculo da probabilidade a posteriori do parâmetro t foi impossibilitada por falta de suporte estatístico. Por não termos uma garantia nos valores de HDL 90%, o valor encontrado de MLE não se tornou confiável. Contudo, análises preliminares utilizando somente marcadores CytB e I7BF (dados não apresentados) apontaram para uma separação entre 45 a 70 mil anos atrás. Esses valores apontam para uma separação ocorrida no Pleistoceno Superior. Segundo dados palinológicos e palioclimáticos disponíveis, um período de seca teriam acontecido anteriormente a 60.000 anos para a região central do Brasil (Ledru et al. 1996), que coincide com evidências no testemunho de

gelo Vostok (Antártida) que apontam para um período de frio e com baixos teores de CO₂ atmosférico (Suguio 1999).

Referências Citadas

- Aleixo, A. 2007. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia* 15(2):297-310.
- AQUASIS - Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos. 2006. Plano de Conservação do Soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni*). Available at www.aquasis.org.
- Asai, S., Y. Yamamoto, and S. Yamagishi. 2006. Genetic diversity and extent of gene flow in the endangered Japanese population of Hodgson's Hawk-eagle, *Spizaetus nipalensis*. *Bird Conservation International* 16:113-129.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Baker, A., and H. Marshall. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. Pages 51-82 in *Avian molecular evolution and systematics* (D. P. Mindell, Ed). Academic Press, San Diego.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37-48.
- Barrowclough, G. F., R. J. Gutierrez, and J. G. Groth. 1999. Phylogeography of spotted owl (*Strix occidentalis*) populations based on mitochondrial DNA sequences: gene flow, genetic structure, and a novel biogeographic pattern. *Evolution* 53:919-928.

- BirdLife International. 2008. Rare Birds Yearbook 2008: The World's 189 Most Threatened Birds.
- Coelho, A. G. M., and W. A. G. Silva. 1998. A new species of *Antilophia* (Passeriformes: Pipridae) from Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. *Ararajuba* 6(2):81-84.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- Cracraft J. 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South America avifauna areas of endemism. *Ornithological Monographs* 36:49-84.
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations, p. 57- 75. *In*: Howard, D. J. and S. H. Berlocher (eds.) *Endless forms: species and speciation*. Oxford: Oxford University Press.
- del Hoyo, J., A. Elliott, and J. Sargatal. 2004. *Handbook of the Birds of the World, Vol. 9. Cotingas to Pipits and Wagtails*. Barcelona: Lynx Editions Press.
- Drummond, A. J., A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38:201-341.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2):479-491.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. University Press, Cambridge, UK.
- Geyer, C. J. 1992. Practical Markov chain Monte Carlo. *Statistical Science* 7:473-511.

- Girão, W., and A. Souto. 2005. Breeding period of Araripe Manakin *Antilophia bokermanni* inferred from vocalisation activity. *Cotinga* 24:35-37.
- Griswold, C., and A. J. Baker. 2002. Time to most recent common ancestor and divergence times of populations of common chaffinches (*Fringilla coelebs*) in Europe and north Africa: insights into Pleistocene refugia and current levels of migration. *Evolution* 56:143-153.
- Groombridge, J. J., C. G. Jones, M. W. Bruford, and R. A. Nichols. 2000. 'Ghost' alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* 403:616.
- Haffer J. 1985. Avian zoogeography of the Neotropical lowlands. *Ornithological Monographs* 36: 113-146.
- Hall, T. A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hare, M. P. 2001. Prospects for nuclear phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution* 16:700-706.
- Haring, E., L. Kruckenhauser, A. Gamauf, M. J. Riesing, and W. Pinsker. 2001. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) indicates an early split in the phylogeny of raptors. *Molecular Biology and Evolution* 18:1892-1904.
- Hey, J., and R. Nielsen. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167:747-760.
- Hoelzel, A. R., J. Halley, S. J. O'brien, C. Campagna, T. Arnbom, B. J. Le Boeuf, K. Ralls, and G. A. Dover. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity* 84:443-449.

- Hudson, R. R., and M. Turelli. 2003. Stochasticity overrules the "three-times rule": Genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution* 57:182-190.
- IUCN (2008). (<http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist2006/redlist2006.htm>), acessado em 18-04-2008.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Leaché, A. D., and J. A. McGuire. 2006. Phylogenetic relationships of horned lizards (*Phrynosoma*) based on nuclear and mitochondrial data: evidence for a misleading mitochondrial gene tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:628-644.
- Ledru, M. P., P. I. S. Braga, F. Soubiès, M. Fournier, L. Martin, K. Suguio, and B. Turcq, 1996. The last 50.000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 123:239-257.
- Lopes, I. F., C. I. Miño, and S. N. Del Lama. 2007. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. *Brazilian Journal of Biology* 67(4):849-857.
- Lyons-Weiler, J., and M. Milinkovitch. 1997. A phylogenetic approach to the problem of differential lineage sorting. *Molecular Biology and Evolution* 14:968-975.
- Marini, M.Â., and R. B. Cavalcanti. 1993. Foraging behavior, diet, and possible monogamy of a sexually dichromatic manakin *Antilophia galeata*. *The Auk* 109:911-913.
- Marini, M.Â., G. M. Oliveira and M. F. Pereira. 1997. The Helmeted Manakin (*Antilophia galeata*): a dichromatic, frugivorous, nonpromiscuous manakin. pp. 443 *In: Abstracts of V Neotropical Ornithological Congress (1995)*. Assunción, Paraguai.

- Mayr, E. 1982. The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance. Cambridge: Harvard University Press.
- McCormack, J. E., A. T. Peterson, E. Bonaccorso, and T. B. Smith. 2008. Speciation in the highlands of Mexico: genetic and phenotypic divergence in the Mexican jay (*Aphelocoma ultramarina*). *Molecular Ecology* 17:2505-2521.
- McGuire, J. A., C. W. Linkem, M. S. Koo, D. W. Hutchison, A. K. Lappin, D. I. Orange, J. Lemos-Espinal, B. R. Riddle, and J. R. Jaeger. 2007. Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution* 61(12):2879-2897.
- Morando, M., L. J. Avila, J. Baker, and J. W. Sites Jr. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution* 58:842–861.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nielsen, R., and J. Wakeley. 2001. Distinguishing migration from isolation: A markov chain monte carlo approach. *Genetics* 158:885-896.
- O'Brien, S. J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 91:5748-5755.
- Olmos, F., W. A. G. Silva, and C. G. Albano. 2005. Aves em oito áreas de Caatinga no sul do Ceará e Oeste de Pernambuco, Nordeste do Brasil: composição, riqueza e similaridade. *Papéis Avulsos de Zoologia* 45(4):179-199.
- Omland, K. E., J. M. Baker, and J. L. Peters. 2006. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of old and new world holarctic ravens (*Corvus corax*). *Molecular Ecology* 15:795-808.

- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillian, L. Stice, and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR. Honolulu: University of Hawaii Press.
- Pamilo, P., and M. Nei. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* 5:568-583.
- Pennington, R. T., D. E. Prado, C. A. Pendry. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27:261-273.
- Peters, J. L., W. Gretes, and K. E. Omland. 2005. Late Pleistocene divergence between eastern and western populations of wood ducks (*Aix sponsa*) inferred by the 'isolation with migration' coalescent method. *Molecular Ecology* 14:3407-3418.
- Prum, R. O. 1992. Syringeal morphology, phylogeny, and evolution of the Neotropical manakins (Aves: Pipridae). *American Museum of Natural History Novitates* 3043:1-65.
- Prychitko, T. M. and W. S. Moore. 1997. The utility of DNA sequences of an intron from the b-fibrinogen gene in phylogenetic analysis of Woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8(2):193-204.
- Questiau, S., M. C. Eybert, A. R. Gaginskaya, L. Gielly, and P. Taberlet. 1998. Recent divergence between two morphologically differentiated subspecies of bluethroat (Aves: Muscicapidae: *Luscinia svecica*) inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Molecular Ecology* 7:239-245.
- Quinn, T. W. 1997. Molecular evolution of the mitochondrial genome. Pages 3-28 in *Avian molecular evolution and systematics* (D. P. Mindell, Ed). Academic Press, San Diego.
- Rêgo, S. P., J. Araripe, M. L. V. Marceliano, I. Sampaio and H. Schneider. 2007. Phylogenetic analyses of the genera *Pipra*, *Lepidothrix* and *Dixiphia* (Pipridae, Passeriformes) using partial cytochrome b and 16S mtDNA genes. *Zoologica Scripta* 36(6):565-575.

- Rêgo, P. S., J. Araripe, W. A. G. Silva, C. Albano, T. Pinto, A. A. Campos, M. Vallinoto, I. Sampaio, and H. Schneider. 2010. Population genetic studies of mitochondrial pseudo-control region in the endangered araripe manakin (*Antilophia bokermanni*). *The Auk* 127(2): 335-342.
- Ribeiro, J. F., and B. M. T. Walter. 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. pages 91-166 in Sano, S. M., and S. P. Almeida, eds. *Cerrado: Ambiente e Flora*. Brasília: EMBRAPA.
- Ridgely, R. S., and G. Tudor. 1994. *The Birds of South America. The Suboscine Passerines*, Vol. 2. Austin: University of Texas Press.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Ruokonen, M., and L. Kvist. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23:422-432.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sampaio, E. V. S. B. 1995. Overview of the Brazilian Caatinga. In.: Bullock, S. H. Mooney; Medina, E. *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press.
- Sanger, F., S. Nichlen, and A. R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 74:5463-5468.
- Schneider, H. 2003. *Método de Análise Filogenética: Um Guia Prático*. Editora Holos - Sociedade Brasileira de Genética Press, Ribeirão Preto.
- Sequeira, F., J. Alexandrino, R. Rocha, J. W. Arntzen, and N. Ferrand. 2005. Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Molecular Ecology* 14:245-254.

- Silva, J. M. C. 1995. Biogeographic analysis of the South American avifauna. *Steenstrupia* 21:49-67.
- Silva, J. M. C., and J. M. Bates. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna Hotspot. *BioScience* 52:225-233.
- Sites Jr., J. W., and J. C. Marshall. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35:199-277
- Sorenson, M. D., J. C. Ast, D. E. Dimcheff, T. Yuri, and D. P. Mindell. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:105-114.
- Stotz, D. F., J. W. Fitzpatrick, T. A. Parker III, and D. K. Moskovits. 1996. *Neotropical Birds, ecology and conservation*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Suguió, K. 1999. *Geologia do quaternário e mudanças ambientais: passado + presente = futuro?*. São Paulo: Paulo's Comunicação e Artes Gráficas, 366p.
- Swofford, D. L. 2002. *PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Beta Version V4.10b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takahashi, K., Y. Terai, M. Nishida, and N. Okada. 2001. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in lake tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons. *Molecular Biology and Evolution* 18(11):2057–2066.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Weir, B. S., and W. G. Hill. 2002. Estimating F-statistics. *Annual Review of Genetics* 36:721-750.

Won, Y. J., and J. Hey. 2005. Divergence population genetics of chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 22:297-307.

Tabela 1. Lista das espécies analisadas com o código de identificação de cada exemplar e o número de acesso do GenBank para os quatro segmentos analisados.

Espécie (número de amostras)	Código de Identificação	Cyt-B	16S	ND6/ΨCR/12S	I7BF
<i>A. bokermanni</i> (n = 20)					
	AboCCA01	XXXX	XXXX	GQ849233**	XXXX
	AboCLU03	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboCLU05	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboCPI03	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboCPI04	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboBME01	XXXX	XXXX	GQ849237**	XXXX
	AboBME02	XXXX	XXXX	GQ849238**	XXXX
	AboBCE02	XXXX	XXXX	GQ849240**	XXXX
	AboBFA01	XXXX	XXXX	GQ849241**	XXXX
	AboBFA02	XXXX	XXXX	GQ849242**	XXXX
	AboBRM01	XXXX	XXXX	GQ849244**	XXXX
	AboBSR02	XXXX	XXXX	GQ849247**	XXXX
	AboBSR03	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboBSR04	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboBCR01	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
	AboMHE02	XXXX	XXXX	GQ849251**	XXXX
	AboMFU01	XXXX	XXXX	GQ849252**	XXXX
	AboMFU02	XXXX	XXXX	GQ849253**	XXXX
	AboMFU03	XXXX	XXXX	GQ849254**	XXXX
	AboMFU04	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
<i>A. galeata</i> (n = 20)					
	Aga39	EF633389*	EF633343*	GQ849259**	XXXX
	Aga40	XXXX	XXXX	GQ849260**	XXXX
	Aga41	EF633390*	EF633344*	GQ849261**	XXXX
	Aga42	XXXX	XXXX	GQ849262**	XXXX
	Aga43	XXXX	XXXX	GQ849263**	XXXX
	Aga78	XXXX	XXXX	GQ849265**	XXXX
	Aga131	XXXX	XXXX	GQ849266**	XXXX
	Aga134	XXXX	XXXX	GQ849267**	XXXX
	Aga410	XXXX	XXXX	GQ849268**	XXXX
	Aga454	XXXX	XXXX	GQ849269**	XXXX
	Aga519	XXXX	XXXX	GQ849270**	XXXX
	Aga545	XXXX	XXXX	GQ849271**	XXXX
	Aga621	XXXX	XXXX	GQ849272**	XXXX
	Aga639	XXXX	XXXX	GQ849273**	XXXX
	Aga761	XXXX	XXXX	GQ849274**	XXXX
	Aga795	XXXX	XXXX	GQ849275**	XXXX
	Aga822	XXXX	XXXX	GQ849276**	XXXX
	Aga906	XXXX	XXXX	GQ849277**	XXXX
	Aga1010	XXXX	XXXX	GQ849278**	XXXX
	Aga1130	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX

* Sequências obtidas do trabalho de Rêgo e colaboradores (2007)

** Sequências obtidas do trabalho de Rêgo e colaboradores (2010).

Tabela 2. Valores dos índices de diversidade genética para os quatro fragmentos analisados, dentro de cada espécie e entre as espécies do gênero *Antilophia*.

Índice / Marcador Molecular	<i>A. bokermanni</i>	<i>A. galeata</i>	<i>A. bokermanni</i> <i>X A. galeata</i>
Sítios variáveis / total			
16S	2 / 517	4 / 517	4 / 517
CytB	7 / 425	7 / 425	8 / 425
ND6/ΨCR/12S	8 / 788	10 / 788	12 / 788
I7BF	6 / 865	9 / 865	12 / 865
Número médio de diferenças			
16S	0.984 ± 0.591	1.847 ± 0.891	1.536 ± 0.638
CytB	2.758 ± 1.524	1.754 ± 1.061	2.311 ± 1.292
ND6/ΨCR/12S	3.416 ± 1.145	3.816 ± 1.172	3.930 ± 1.244
I7BF	1.184 ± 0.586	1.932 ± 0.762	1.820 ± 0.740
Diversidade nucleotídica			
16S	0.0019 ± 0.0008	0.0036 ± 0.0019	0.0030 ± 0.0013
CytB	0.0065 ± 0.0040	0.0041 ± 0.0028	0.0054 ± 0.0034
ND6/ΨCR/12S	0.0043 ± 0.0025	0.0049 ± 0.0031	0.0048 ± 0.0028
I7BF	0.0013 ± 0.0009	0.0022 ± 0.0013	0.0020 ± 0.0011
Número de haplótipos			
16S	4	8	9
CytB	6	6	9
ND6/ΨCR/12S	7	7	13
I7BF	5	8	11
Diversidade haplotípica			
16S	0.626 ± 0.097	0.805 ± 0.051	0.778 ± 0.038
CytB	0.842 ± 0.039	0.811 ± 0.047	0.871 ± 0.020
ND6/ΨCR/12S	0.768 ± 0.080	0.868 ± 0.032	0.865 ± 0.040
I7BF	0.695 ± 0.070	0.863 ± 0.048	0.819 ± 0.039

Tabela 3. Análise de Variação Molecular (AMOVA) e Índice de Fixação (F_{ST}) com as populações das duas espécies do gênero *Antilophia*, para os quatro marcadores seqüenciados.

Fonte da Variação	CytB		16S		ND6/ΨCR/12S		I7BF	
	% de Variação	F_{ST}	% de Variação	F_{ST}	% de Variação	F_{ST}	% de Variação	F_{ST}
Entre Populações	4.64	0.04640 *	14.19	0.1419 **	7.70	0.07701 **	14.40	0.14401 **
Dentro da População	95.36		85.81		92.30		85.60	

* Valor não-significante ($p > 0.05$)

** Valor significativo ($p < 0.05$)

Tabela 4. Estimativas de máxima-verossimilhança (MLE) e intervalos de 90% das maiores densidades a posteriori (HPD) dos parâmetros demográficos obtidos no IM entre *A. bokermanni* e *A. galeata*, usando os quatro marcadores moleculares.

<i>A. bokermanni</i> X <i>A. galeata</i>	θ_{ABO}	θ_{AGA}	θ_{ANC}	m_1	m_2	t
MLE	4.8022	5.1002	0.7908	0.0050 ^a	0.0050 ^a	1.3150
HPD 90%	2.4188 – 8.8823	2.7392 – 9.3866	0.0115? – 21.2144?	0.0050 – 3.0805	0.0050 – 2.5550	0.3250? – 9.0450?

^a Os valores de estimativa de m_1 e m_2 apresentam-se no menor limite de resolução, correspondendo ao primeiro ponto na escala de probabilidade, sendo igual a zero.

? Distribuições onde os intervalos de confiabilidade não podem ser confirmados devido aos valores não tocarem o eixo X no gráfico de probabilidade *a posteriori*.

Legenda das Figuras

Fig 1. Área de ocorrência de *A. bokermanni* e *A. galeata*. (a) Posicionamento dos dois pontos de obtenção de amostras *A. galeata* (estrelas) dentro de sua área de ocorrência. (b) Posicionamento da área de ocorrência de *A. bokermanni* dentro na Chapada do Araripe - CE. (c) Imagem detalhada da extensão das matas de encosta que correspondem à área de distribuição de *A. bokermanni*, onde foram realizadas as coletas de amostras (modificada de Rêgo et al. 2010 - prelo).

Fig 2. Rede de haplótipos encontrado entre *A. bokermanni* e *A. galeata* para os quatro marcadores: (a) 16S; (b) CytB; (c) ND6/ΨCR/12S; (d) I7BF. Os haplótipos são representados por círculos, sendo o seu tamanho proporcional à sua frequência. Cor branca corresponde a amostras de *A. bokermanni* e cor preta a amostras de *A. galeata*. Os traços representam uma única mutação, com exceção dos mais longos que possuem o número correspondente de mutações. Os símbolos “mv” correspondem a vetores medianos que representam haplótipos não amostrados.

Fig 3. Distribuição da probabilidade a posteriori dos parâmetros estimados a partir do IM, utilizando os quatro marcadores populações com escala para taxa mutacional neutra. (a) θ_{ABO} , (b) θ_{AGA} e (c) θ_{ANC} correspondem aos tamanhos efetivos de *A. bokermanni*, de *A. galeata* e da população ancestral, respectivamente; (d) são os três parâmetros anteriormente descritos juntos em um único gráfico; (e) m_1 e m_2 representam a escala do número efetivo de migrantes por geração entre as populações; (f) t é a escala de tempo de divergência das populações.

Figuras

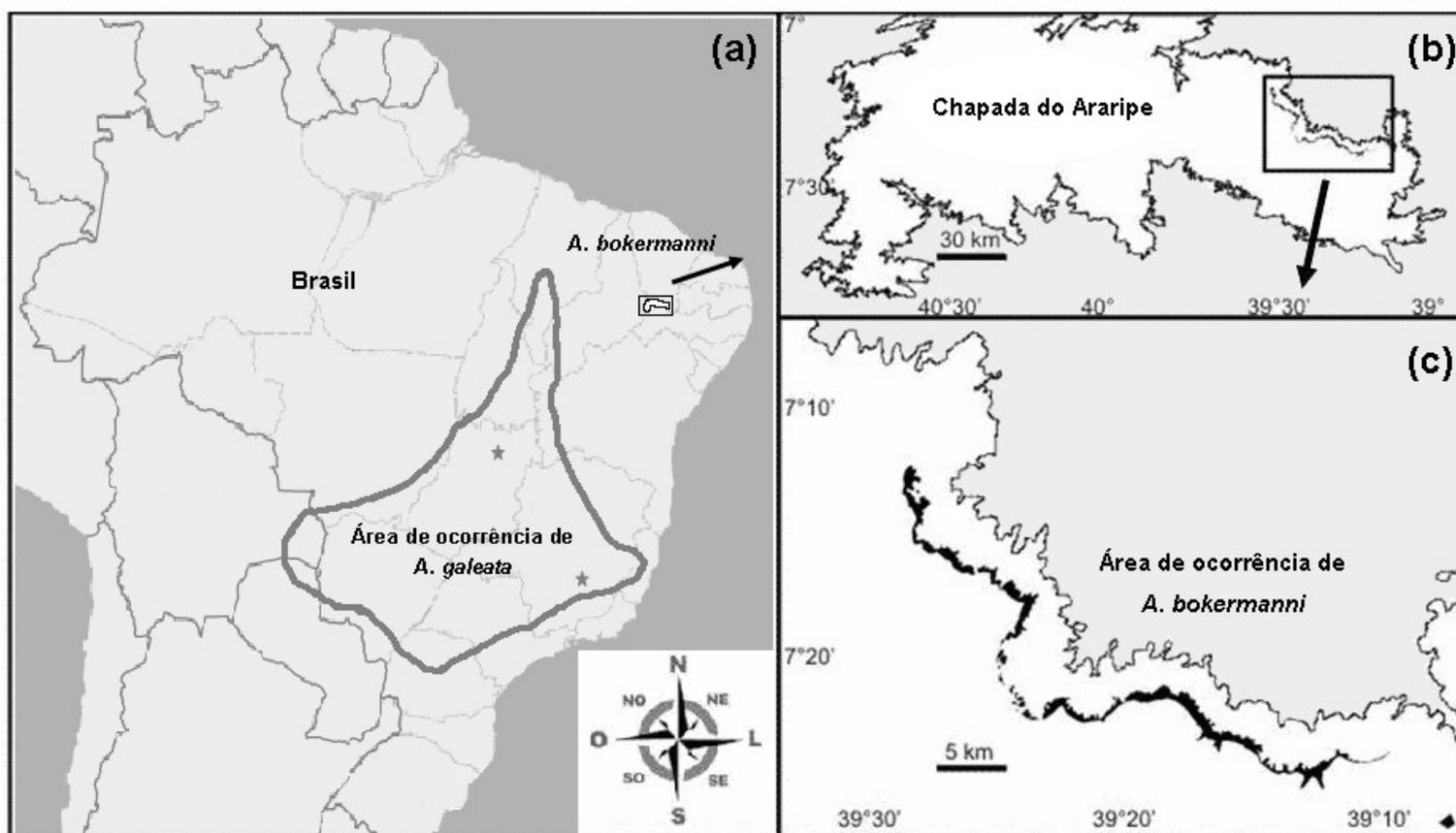


Fig. 1.

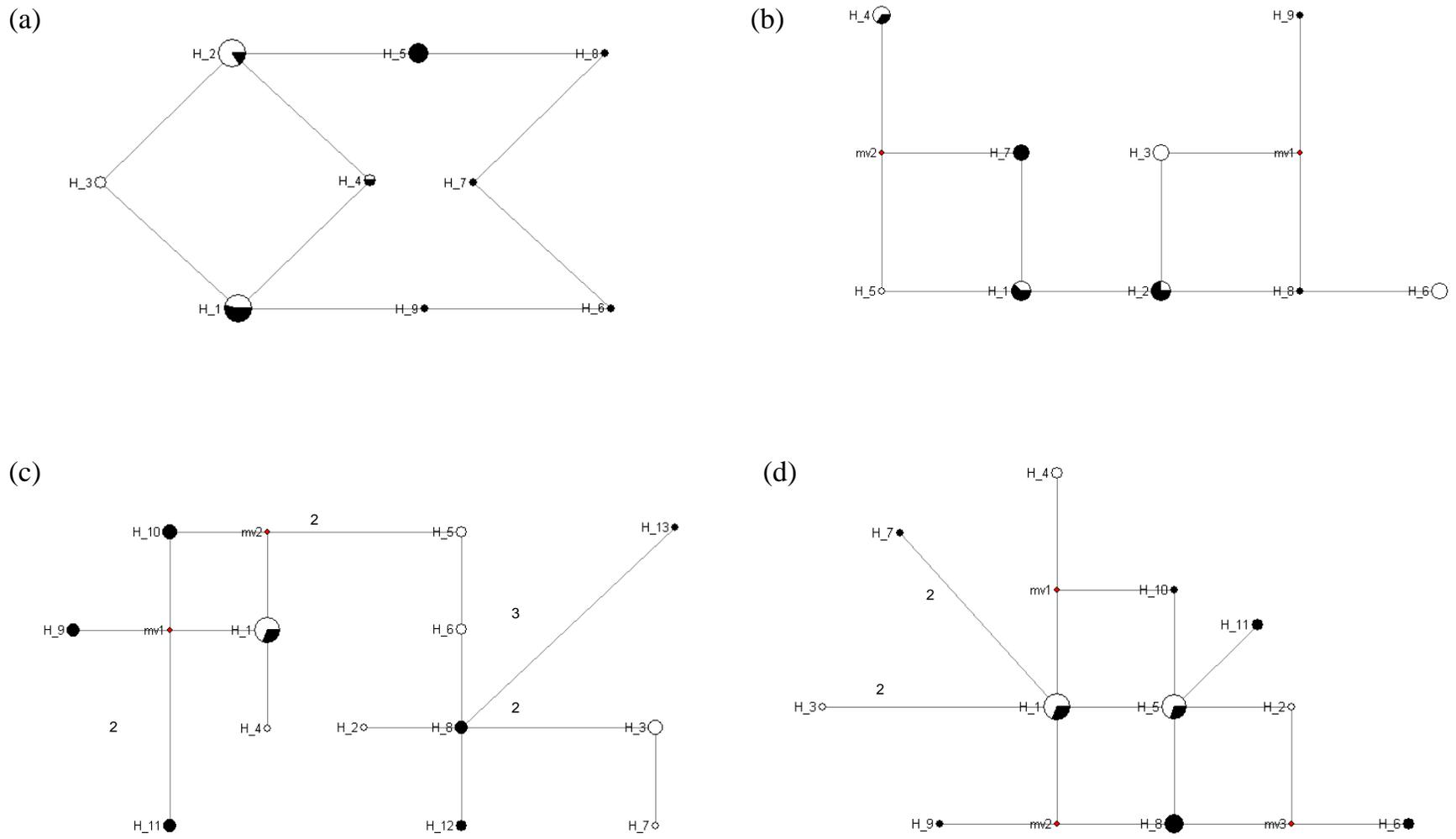


Fig. 2.

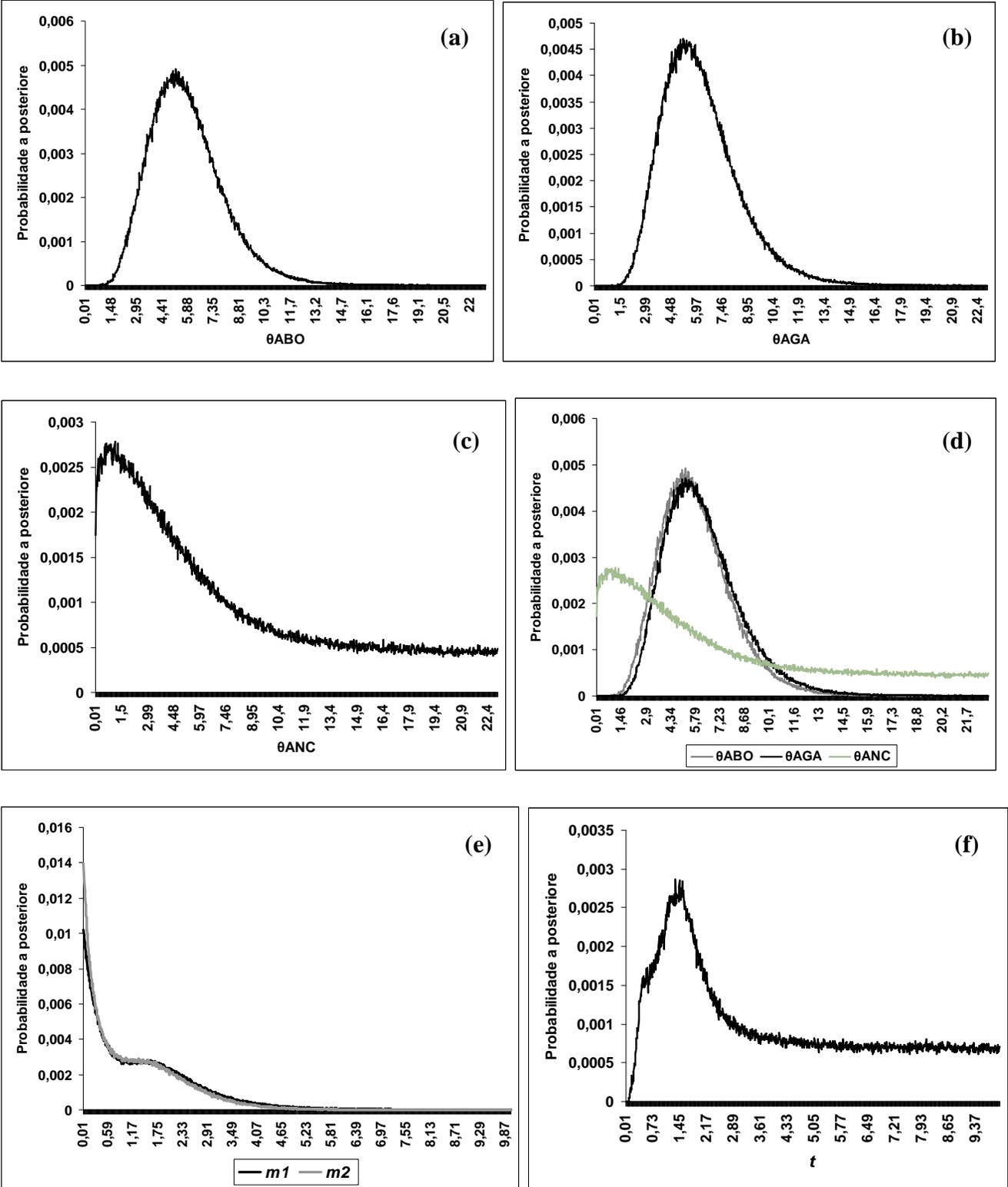


Fig. 3.

CAPÍTULO 3

**VARIABILIDADE DO GENE RECEPTOR DA MELANOCORTINA-1 (*MC1R*) NÃO
EXPLICA DIFERENÇAS NO PADRÃO DE PLUMAGEM ENTRE *Antilophia*
bokermanni E *Antilophia galeata***

Péricles S. Rêgo, Juliana Araripe, Weber A. G. Silva, Fernando M. d'Horta, Iracilda Sampaio
& Horacio Schneider

Variabilidade do gene MC1R em Antilophia

**VARIABILIDADE DO GENE RECEPTOR DA MELANOCORTINA-1 (MC1R) NÃO
EXPLICA DIFERENÇAS NO PADRÃO DE PLUMAGEM ENTRE *Antilophia*
bokermanni E *Antilophia galeata***

Péricles S. Rêgo^{1,2,5}, Juliana Araripe¹, Weber A. G. Silva³, Fernando M. d`Horta⁴, Iracilda
Sampaio¹ & Horacio Schneider¹

¹Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, Brasil;

²Centro de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brasil;

³Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos, Fortaleza, Brasil;

⁴Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.

⁵Endereço para contato: Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Campus Universitário de Bragança, Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 68600-000, Brasil. E-mail: periclesena@yahoo.com.br

Resumo

A grande variedade de cores e padrões de plumagens das aves representa um importante mecanismo no processo de especiação deste grupo. Atualmente, sabe-se que parte da variação de cor da plumagem dentro e entre espécies possui um forte componente genético. Neste contexto, o gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*) tem sido o marcador gênico mais testado devido ao seu reconhecido papel nos padrões melânicos de plumagem. Estudos com diferentes espécies de aves selvagens têm mostrado pontos de associações entre mudanças não-sinônimas no gene *MC1R* e a presença de variações melânicas. O gênero *Antilophia* pertencente à família dos piprídeos é formado apenas por duas espécies de aves: *A. galeata* e *A. bokermanni*. A principal diferença morfológica entre estas duas espécies está na coloração da plumagem dos machos adultos, sendo a primeira predominantemente de cor preta, enquanto que a última a cor branca é dominante. Neste trabalho nós objetivamos conhecer o processo de evolução do principal caráter que distingue as duas espécies do gênero *Antilophia*, investigando a possibilidade de associar mutações existentes no marcador *MC1R* com os dois diferentes padrões de plumagem encontrados neste gênero. Foram analisadas cerca de 700 pares de bases do fragmento do gene *MC1R* em representantes das duas espécies e comparadas as variações nucleotídicas observadas. Os resultados mostraram seis pontos de variação, resultando em sete haplótipos distintos, mas que não obedeceram a um padrão de distinção entre as duas espécies quando associado a plumagem de ambas. Cinco substituições foram não-sinônimas entre os sítios analisados, mas não refletiram mudanças nos fenótipos, levando-nos a concluir que no gênero *Antilophia*, outro mecanismo de controle da expressão dos padrões de cores nas penas entre as duas espécies esteja atuando.

Palavras-chave: *Antilophia*, *MC1R*, plumagem, variação genética.

A grande variedade de cores e padrões de plumagens das aves tem sempre atraído à atenção de pesquisadores em diversas áreas da biologia, em especial na ecologia e evolução. A coloração da plumagem pode estar relacionada à seleção natural e sexual, diferenciação geográfica, evolução de polimorfismo, representando desta forma um importante mecanismo na especiação de aves (Price 1998, Mundy 2005). Espécies proximamente relacionadas podem diferir grandemente neste caráter (Omland and Lanyon 2000), sugerindo uma evolução mais rápida do que em outros traços morfológicos. Sabe-se que parte da variação de cor da plumagem dentro e entre espécies possui um forte componente genético (Mundy 2005), porém, o entendimento do mecanismo genético envolvido ainda permanece pouco conhecido, principalmente para espécies selvagens. Grande parte do conhecimento genético a respeito da pigmentação das penas em aves tem sido realizada com galinhas (Takeuchi et al. 1996a, Takeuchi et al. 1996b).

Somente após alguns anos do advento da tecnologia do DNA recombinante foi que alguns grupos de pesquisa começaram a explorar as adaptações fenotípicas ocorridas na natureza em organismos não-modelos. Dentre os padrões de coloração observados em aves, o polimorfismo de plumagem melânica é encontrado de forma independente em algumas famílias (Le Corre 1999, Baião et al. 2007), sendo similarmente relatado em outros grupos de vertebrados, como mamíferos e répteis (Andersson 2003, Eizirik et al. 2003, Hoekstra et al. 2004, Rosenblum et al. 2004). O melanismo em aves tem sido relacionado com várias funções ecológicas adaptativas, incluindo proteção física, proteção contra parasitas, camuflagem e uma variedade de sinalizações visuais (Mundy 2005).

Neste contexto, o gene receptor melanocortina-1 (*MC1R*) tem sido o marcador gênico mais testado devido ao seu reconhecido papel nos padrões melânicos de plumagem (Takeuchi et al. 1996b, Kerje et al. 2003), bem como na pelagem de outros vertebrados (Andersson 2003, Eizirik et al. 2003, Hoekstra et al. 2004). Este é responsável pela codificação da

proteína MC1R, a qual é expressa nos melanócitos das penas e pêlos em desenvolvimento, realizando um importante papel no controle da síntese de melanina (Cone et al. 1996, Jackson 1997). A proteína MC1R é uma proteína-G receptora com sete domínios transmembrânicos, a qual é ativada pelo hormônio estimulador de melanócitos (MSH). A alta atividade da proteína MC1R aumenta a produção de eumelanina (responsável pela cor preta ou marrom), enquanto que sua baixa atividade estimula a produção de pheomelanina (responsável pela cor amarela ou vermelha) (García-Barrón et al. 2005). Mutações no gene da *MC1R* causando um aumento na atividade receptora são dominantes e associados com coloração preta, enquanto mutações provocando perda de função são recessivas e associadas com fenótipos amarelos ou vermelhos (Kerje et al. 2003). Em aves, o *MC1R* foi primeiro clonado em galinhas (Takeuchi et al. 1996a) e posteriormente, um ponto de substituição não-sinônima no gene foi encontrado e associado com o melanismo em exemplares desta espécie (Takeuchi et al. 1996b).

O primeiro caso de variação no gene *MC1R* associada com melanismo em uma ave selvagem foi relatado para um pequeno pássaro tropical, *Coereba flaveola* (Theron et al. 2001). Esta espécie possui dois morfotipos baseados na coloração predominante da plumagem (preto e amarelo), tendo sido encontrado uma perfeita associação entre uma variação provocada por uma mutação não-sinônima no gene da *MC1R* e as duas variações fenotípicas. Posteriormente, outros trabalhos com aves selvagens encontraram outros pontos de associações entre mudanças não-sinônimas na *MC1R* e a presença de variações melânicas (Mundy et al. 2004, Doucet et al. 2004, Baião et al. 2007). Neste contexto, também já foram relatados casos em que mais de um ponto de mutação pode ser relacionado aos padrões de coloração fenotípicos, podendo a mutação ocorrer no mesmo sítio e ao mesmo tempo em espécies de aves não relacionadas (Baião et al. 2007). Contudo, nos últimos anos um número crescente de trabalhos tem mostrado que nem sempre variações da seqüência da *MC1R* podem ser associadas a padrões de coloração distintos em aves (MacDougall-Shackleton et al. 2003;

Cheviron et al. 2006, Haas et al. 2009), devendo haver outras regiões gênicas ou mecanismos de regulação envolvidos com esta característica.

O gênero *Antilophia* (Reichenbach 1850) pertence à família dos manakins (Pipridae, Passeriformes), formada por pássaros neotropicais que se destacam por seus comportamentos de exibição no período reprodutivo e pela variedade de cores de suas plumagens, principalmente nos machos (Ridgely and Tudor 1994, del Hoyo et al. 2004). Este gênero é formado apenas por duas espécies: *Antilophia galeata* (Lichtenstein, 1823) e *Antilophia bokermanni* (Coelho and Silva 1998), cuja principal diferença que distingue as duas está na coloração da plumagem dos machos adultos, sendo *A. galeata* predominantemente de cor preta, enquanto que *A. bokermanni* apresenta a cor branca dominante (Coelho and Silva 1998) (**Figura 1**). A distribuição atual das duas espécies é do tipo alopátrica, onde o ponto mais próximo dista cerca de 300 km (**Figura 2**), diminuindo as chances de contatos secundários entre ambas. Em diversas outras características, as duas espécies são bastante similares (vocalização, dimensões morfométricas, comportamentos reprodutivos) (Marini and Cavalcanti 1993, Marini et al. 1997, Coelho and Silva 1998, AQUASIS 2006). Mais recentemente, análises de diversidade molecular utilizando um marcador mitocondrial mostraram que o perfil genético de ambas as espécies de *Antilophia* são muito parecidos, não tendo sido possível a distinção entre as duas (Rêgo et al. 2010). Segundo estes autores, a mistura de haplótipos observada entre as espécies seria um artefato de uma separação incompleta de linhagens por conta de um recente processo de especiação.

Assim, com o intuito de melhor conhecer o processo de evolução do principal caráter que distingue as duas espécies do gênero *Antilophia*, nós avaliamos o nível de diferenciação genética encontrada nas seqüências do gene *MC1R* para ambas as espécies, investigando a possibilidade de associar as mutações existentes neste marcador com os dois diferentes padrões de plumagem encontrados neste gênero. Buscamos também verificar se o padrão de

variabilidade e diferenciação encontrado para este marcador coincide ou não com o já descrito para marcadores mitocondriais e nucleares entre as duas espécies.

Materiais e Métodos

Amostragem.-Amostras de tecido de *A. bokermanni* foram obtidas através de coletas realizadas, na porção nordeste da Chapada do Araripe no Estado do Ceará – Brasil (lat - 7.304974 / lon -39.302090) (**Figura 2**). Os exemplares foram capturados com o uso de redes de neblina e amostras de sangue ou bulbo de penas foram coletadas e acondicionadas em álcool 70% (Licença nº 027/2005 - IBAMA). Amostras da espécie-irmã *A. galeata* provenientes de São Carlos (lat -22.014303 / lon -47.891112) no Estado brasileiro de São Paulo (n=9) e de Brasília (lat -15.776605 / lon -47.928118) (n=5) no Distrito Federal foram obtidas através de intercâmbio com pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e da Universidade de Brasília (UnB), respectivamente (**Figura 2**).

Extração do DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento.-As amostras receberam identificação de tombamento segundo critérios adotados pelo Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGMB) - UFPA, sendo acondicionadas em freezers até o momento de seu uso. O material genético (DNA) foi extraído através de digestão com ribonuclease por 1 hora a 37 °C, seguido da adição de proteinase K por 2-4 horas (ou “overnight”) a 55 °C. O produto foi então tratado com lavagens de fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol (Sambrook et al. 1989).

Para obtenção de parte do gene *MC1R*, reações de PCR para cada exemplar foram realizadas utilizando os seguintes primers descritos por Cheviron e colaboradores (2006): lcorMSHR9 (5' - CTG GCT CCG GAA GGC RTA GAT - 3') e lcorMSHR72 (5' - AYG CCA GYG AGG GCA ACC A - 3'). Este fragmento-alvo corresponde às bases entre 70-880

do gene *MC1R* de galinha (Kerje et al. 2003), o qual inclui todos os sítios previamente associados com fenótipos melânicos em aves. Cada reação foi realizada para um volume final de 25 μL , contendo 4 μL da mistura dos desoxinucleotídeos (1,25 mM), 2,5 μL do tampão da enzima *Taq* (10X), 1 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL de cada primer (200 ng/ μL), aproximadamente 50 ng do DNA total extraído, 0,25 μL da enzima *Taq* polimerase (5 U/ μL – Invitrogen) e água destilada estéril para completar o volume final da reação. As condições de amplificação para o fragmento do *MC1R* foram as mesmas descritas por Cheviron e colaboradores (2006), consistindo de uma etapa inicial de desnaturação por 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos por 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62,5 °C e 90 segundos a 72 °C, terminando com um passo de 5 minutos a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram purificados usando o kit ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., UK), onde em cada alíquota de 5 μL da reação de PCR foi adicionada 2 μL da solução enzimática, sendo então incubados a temperatura de 37 °C por 15 minutos e depois mais 15 minutos a 80 °C. Os purificados foram submetidos a uma nova reação de PCR, agora pelo método didesoxiterminal (Sanger et al. 1977), com reagentes do kit Big Dye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems, USA). As reações de seqüenciamento foram feitas para um volume final de 10 μL , contendo 1 μL do purificado, 0,5 μL de cada um dos primers, separadamente (concentração de 200 ng/ μL), 3 μL do tampão (Tris 0,4 M pH 9,0 / MgCl_2 25 mM), 1 μL do mix Big Dye e 4,5 μL de água destilada estéril para completar o volume, sendo submetidas a um programa de temperaturas variadas que consistiu em: 25 ciclos de 96 °C por 50 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Reagentes não incorporados durante a reação foram eliminados através de lavagens com isopropanol. Os fragmentos gênicos resultantes da reação de seqüenciamento tiveram suas seqüências nucleotídicas determinadas em um Seqüenciador Automático ABI 377 (Perkin Elmer).

As seqüências obtidas foram submetidas ao alinhamento múltiplo de forma automática pelo aplicativo Clustal-W (Thompson et al. 1994), com parâmetros de penalidades sugeridos por Schneider (2003). O arquivo gerado foi então convertido para o formato Fasta e transferido para o editor de seqüências Bioedit (Hall 1999), para inspeção visual do alinhamento produzido e possíveis correções na codificação das inserções ou deleções presentes. Nós codificamos indivíduos como heterozigotos no caso de picos duplos serem confirmados nos cromatográficos, em ambas as fitas. Todas as seqüências geradas neste estudo foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), com número de acesso de XXXX – XXXX (**Tabela 1**).

Análise Genética-As seqüências obtidas foram posteriormente alinhadas com seqüências de *MC1R* existentes no GenBank referentes às espécies: *Lepidothrix coronata* (número de acesso DQ388308 e DQ388310), *Lepidothrix serena* (DQ388331) e *Gallus gallus* (NM_001031462), com o objetivo de confirmar o posicionamento do fragmento amplificado e comparar a tradução para seqüência de aminoácidos, além de examinar a existência de códons de parada e indels que são indicativos de pseudogenes. Esta análise comparativa também possibilitou a identificação dos sítios de variação nucleotídica que já foram previamente associados com a plumagem melânica em aves.

A associação dos morfotipos para plumagem que caracterizam cada espécie com os sítios variáveis encontrados foi realizada através de interpretação visual do alinhamento das seqüências. Utilizando o programa DnaSP (versão 3.51; Rozas et al. 2003) foi calculado o parâmetro de diversidade nucleotídica (Nei 1987) para cada espécie. Rede de haplótipos foi construída pelo método dos vetores medianos, utilizando o programa NETWORK (versão 4.5; Bandelt et al. 1999). Nós também testamos a existência de seleção sobre o gene *MC1R* através do cálculo do parâmetro estatístico Tajima's *D* (Tajima 1999) usando o programa DnaSP (versão 3.51).

Resultados

Um total de 702 pares de bases foram seqüenciados para o gene da *MC1R* de 16 exemplares de *A. bokermanni* e 14 de *A. galeata*, correspondendo às posições 156 a 858 do gene *MC1R* de *G. gallus* (Kerje et al. 2003). A região seqüenciada engloba todos os sítios variáveis onde já foram confirmados a relação com distintos padrões melânicos de coloração em aves. Cerca de 99% dos sítios analisados foram similares entre as duas espécies do gênero *Antilophia*. Esta similaridade foi menor quando comparado com as seqüências das espécies *Lepidothrix serena* e *L. coronada*, pertencentes a mesma família (97 e 96%, respectivamente), e mais baixa quando comparado com a de *G. gallus* (89%), todas obtidas do GenBank.

Seis sítios foram variáveis dentro das seqüências das duas espécies, resultando em um total de seis alelos para o gene *MC1R*, onde somente um exemplar, da espécie *A. galeata* (amostra Aga_519), foi heterozigoto (**Tabela 1**). Três sítios variáveis foram exclusivos de *A. bokermanni* (posições 244, 328 e 695) e três exclusivos de *A. galeata* (posições 189, 529, 629), sendo esta numeração referente ao posicionamento de cada sítio no gene *MC1R* de *G. gallus* (Kerje et al. 2003). Todas as substituições observadas entre as duas espécies aconteceram separadamente e em indivíduos diferentes, com exceção do sítio 629, no qual foi relatado o exemplar com genótipo heterozigoto (**Tabela 1**). Cinco substituições provocaram mudanças de aminoácido a ser codificado e apenas uma substituição foi sinônima (sítio 189), encontrada na amostra Aga_43. Nenhuma evidência de variações nas seqüências do gene *MC1R* que pudessem explicar a variação de plumagem foi observada entre os exemplares das duas espécies de *Antilophia*. Os sítios variáveis e associados com mudanças no padrão de plumagem em outras aves mostraram-se conservados entre as duas espécies de *Antilophia* (colunas cinzas – **Tabela 1**).

As variações encontradas no *MC1R* entre as duas espécies de *Antilophia* resultaram na formação de sete distintos haplótipos (**Tabela 1**) a partir dos seis alelos encontrados. O haplótipo H_1 (referente ao genótipo 1/1) apresentou uma frequência de 80% das amostras analisadas, enquanto que os demais haplótipos foram únicos e todos com uma frequência de 3,33%. O haplótipo H_1 foi encontrado em ambas as espécies, enquanto que os haplótipos H_2 e H_3 foram exclusivos de *A. bokermanni* e os quatro restantes (H_4, H_5, H_6, H_7) exclusivos de *A. galeata* (**Tabela 1**). O único exemplar heterozigoto para este marcador (genótipo 1/5) foi encontrado na espécie *A. galeata*. A rede de haplótipos do gene *MC1R* obtida entre as duas espécies é mostrada na **Figura 3**, evidenciando a alta frequência do haplótipo H_1 e sua ocorrência nas duas espécies, além de mostrar a baixa representatividade dos demais haplótipos. Nela também fica evidenciado que os haplótipos de baixa frequência são todos muito similares e provavelmente originados do haplótipo H_1, sendo diferenciados apenas por uma ou duas mutações em suas seqüências de nucleotídeos.

Os índices de diversidade nucleotídicas encontradas para as duas espécies para o segmento do *MC1R* mostraram-se similares e baixos. Em *A. bokermanni* o valor de diversidade foi de 0.00053 (± 0.00033), sendo menor que o de *A. galeata*, que foi de 0.00078 (± 0.00028), mas não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$). Quando avaliado as duas espécies juntas, o valor encontrado foi de 0.00066 (± 0.00024), mostrando não haver distinção significativa para as seqüências de *MC1R* das duas espécies. O teste de neutralidade de Tajima's *D* foi calculado para cada espécie separadamente. Os valores de Tajima's *D* não permitiram rejeitar a hipótese nula de variação neutra, tanto para *A. bokermanni* (-1.6965, $p > 0.05$), quando para *A. galeata* (-1.2782, $p > 0.05$).

Discussão

Casos já documentados de padrões melânicos em aves nos quais existe a associação com variações presentes no gene *MCIR* mostram que sua totalidade ocorre entre exemplares de uma mesma espécie, as quais apresentam morfotipos distintos (Theron et al. 2001, Doucet et al. 2004, Mundy 2005). Mesmo nos casos onde ocorre a formação de agrupamento de indivíduos pertencentes a um dos padrões de plumagem, como nos exemplares melânicos de *Coereba flaveola* (Theron et al. 2001), os mesmos continuam compondo uma única espécie juntamente com o outro morfotipo. Similarmente, este fato também ocorre com outros grupos animais, como mamíferos e répteis (Andersson 2003, Eizirik et al. 2003, Hoekstra et al. 2004), não tendo ocorrido a descrição de processo de especiação associado à forma melânica. MacDougall-Shackleton e colaboradores (2003) realizaram estudo dos padrões de plumagem entre espécies do gênero *Phylloscopus* com o marcador *MCIR*, mas não encontraram associação com as variações deste marcador, reforçando a hipótese de que o melanismo não está envolvido diretamente com processos de especiação.

A despeito de que nosso trabalho lidou com duas espécies válidas, o relato de que entre *A. bokermanni* e *A. galeata* existem uma grande similaridade para diversos aspectos biológicos e comportamentais, levou-nos a questionar a possibilidade de existência de variações no gene *MCIR* que pudesse explicar os dois distintos padrões de plumagem. Tal questionamento foi reforçado quando, através de análises genéticas, mostrou-se que as duas espécies ainda apresentam separação incompleta de linhagens (Rêgo et al. 2010). Contudo, os resultados aqui apresentados revelaram a ausência de evidências para associação entre as variações nas seqüências do segmento do *MCIR* e os dois padrões de plumagem dentro do gênero *Antilophia*. Os sítios variáveis do gene *MCIR* associados aos padrões melânicos já descritos na literatura mostraram-se conservados nos representantes das duas espécies de

Antilophia (**Tabela 1**), apesar de termos encontrado mutações não-sinônimas em alguns representantes, mas sem refletirem em diferenças nos fenótipos dos exemplares. Tais mutações não-sinônimas foram relatadas de forma individualizada nas duas espécies (exceção do haplótipo H_2), enquanto que o haplótipo H_1 (genótipo 1/1), compartilhado por ambas (**Figura 3**), confirmou através de sua alta frequência a inexistência da influência do gene *MC1R* com os distintos padrões de plumagem.

Relatos de casos de variações melânicas em aves que não puderam ser associadas com diferenças nas seqüências do gene *MC1R* continuam sendo noticiados, inclusive em estudos com representantes da família Pipridae (Chevion et al. 2006). Pelo fato de não haver um padrão filogenético dos grupos de aves onde existe a associação do padrão melânico e variações no marcador *MC1R*, sugeri-se que possa haver diferenças no mecanismo de controle e expressão desta característica em diferentes grupos, como mudanças nas regiões reguladoras para este gene (Mandy 2005). Como observado em *Lepidothrix coronata* (Chevion et al. 2006), os indivíduos jovens das duas espécies de *Antilophia* também permanecem com a plumagem de cor verde até atingirem a maturidade sexual, o que acontece por volta do segundo ano de vida. Neste período, os machos começam a adquirir novas cores em sua plumagem, enquanto a fêmea continua verde-oliva. Relacionar o controle deste mecanismo com algum fator genético ligado ao sexo, como dosagens hormonais ou genes ligados aos cromossomos sexuais, poderá apontar para uma nova forma de avaliação desta característica com esta família aves, uma vez que somente nos machos adultos ocorre a diferenciação nos padrões de plumagem.

Outra questão interessante que reside no aspecto de plumagem entre as duas espécies de *Antilophia* está na determinação de qual fenótipo seria o derivado. Em aves, os relatos de morfotipos melânicos são mostrados como o resultado de mudanças num padrão básico já existente. Tomando como apoio os dados de tamanho populacional e área de distribuição

atual das duas espécies, nos reportamos para uma hipótese de cenário mais parcimonioso onde o fenótipo branco (*A. bokermanni*) seria o mais derivado, uma vez que o surgimento e fixação deste seria mais provável em uma população isolada e de pequeno tamanho. Tal hipótese apontaria então para um fenótipo ancestral melânico para o gênero *Antilophia*, sendo corroborado por uma maior diversidade genética presente em *A. galeata*, quando avaliado os marcadores moleculares já estudados.

Referências Citadas

- Andersson, L. 2003. Melanocortin variants with phenotypic effects in horse, pig, and chicken. *Annals of the New York Academy of Sciences* 994:313-318.
- AQUASIS - Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos. 2006. Plano de Conservação do Soldadinho-do-araripe (*Antilophia bokermanni*). Available at www.aquasis.org.
- Baião, P. C., E. A. Schreiber, and P. G. Parker. 2007. The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed boobies (*Sula sula*): a melanocortin-1 receptor (*MC1R*) analysis. *The Journal of Heredity* 98:287-292.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37-48.
- Cheviron, Z. A., S. J. Hackett, R. T. Brumfield. 2006. Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*) is not associated with plumage variation in the blue-crowned manakin (*Lepidothrix coronata*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 273:1613-1618.
- Coelho, A. G. M., and W. A. G. Silva. 1998. A new species of *Antilophia* (Passeriformes: Pipridae) from Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. *Ararajuba* 6(2):81-84.

- Cone, R. D., D. Lu, S. Koppula, D. I. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. N. Orth, C. Pouton, and R. A. Kesterson. 1996. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Progress in Hormone Research* 51:287-317.
- del Hoyo, J., A. Elliott, and J. Sargatal. 2004. *Handbook of the Birds of the World, Vol. 9. Cotingas to Pipits and Wagtails*. Barcelona: Lynx Editions Press.
- Doucet, S. M., M. D. Shawkey, M. K. Rathburn, H. L. Mays, and R. Montgomerie. 2004. Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271:1663-1670.
- Eizirik, E., N. Yuhki, W. E. Johnson, M. Menotti-Raymond, S. S. Hannah, and S. J. O'Brien. 2003. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology* 13:448-453.
- García-Barrón, J. C, B. L. Sánchez-Laorden, and C. Jiménez-Cervantes. 2005. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Research* 18:393-410.
- Haas, F., M. A. Pointer, N. Saino, A. Brodin, N. I. Mundy, and B. Hansson. 2009. An analysis of population genetic differentiation and genotype–phenotype association across the hybrid zone of carrion and hooded crows using microsatellites and *MC1R*. *Molecular Biology and Evolution* 18:294-305.
- Hall, T. A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hoekstra, H. E., K. E. Drumm, and M. W. Nachman. 2004. Ecological genetics of adaptive color polymorphism in pocket mice: geographic variation in selected and neutral genes. *Evolution* 58(6):1329-1341.

- Jackson, I. 1997 Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Human Molecular Genetics* 6:1613-1624.
- Kerje, S., J. Lind, K. Schutz, P. Jensen, and L. Andersson. 2003 Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Animal Genetics* 34:241-248.
- Le Corre, M. 1999. Plumage polymorphism of red-footed-boobies (*Sula sula*) in the western islands in the western Indian Ocean: an indicator of biogeographic isolation. *Journal of Zoology - London* 249:411-415.
- MacDougall-Shackleton, E. A., L. Blanchard, S. A. Igdoura, and H. L. Gibbs. 2003. Unmelanized plumage patterns in Old World leaf warblers do not correspond to sequence variation at the melanocortin-1-receptor locus (*MC1R*). *Molecular Biology and Evolution* 20:1675-1681.
- Marini, M.Â., and R. B. Cavalcanti. 1993. Foraging behavior, diet, and possible monogamy of a sexually dichromatic manakin *Antilophia galeata*. *The Auk* 109:911-913.
- Marini, M.Â., G. M. Oliveira and M. F. Pereira. 1997. The Helmeted Manakin (*Antilophia galeata*): a dichromatic, frugivorous, nonpromiscuous manakin. pp. 443 *In: Abstracts of V Neotropical Ornithological Congress (1995)*. Assunción, Paraguai.
- Mundy, N. I. 2005. A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage colouration in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:1633-1640.
- Mundy, N. I., N. S. Badcock, T. Hart, K. Scribner, K. Janssen, and N. J. Nadeau. 2004. Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science* 303:1870-1873.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Omland, K. E. and S. M. Lanyon. 2000. Reconstructing plumage evolution in orioles (*Icterus*): repeated convergence and reversal in patterns. *Evolution* 54:2119-2133.

- Price, T. D. 1998. Sexual selection and natural selection in bird speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 353:251-260.
- Rêgo, P. S., J. Araripe, W. A. G. Silva, C. Albano, T. Pinto, A. A. Campos, M. Vallinoto, I. Sampaio, and H. Schneider. 2010. Population genetic studies of mitochondrial pseudo-control region in the endangered araripe manakin (*Antilophia bokermanni*). *The Auk* 127(2): 335-342.
- Ridgely, R. S., and G. Tudor. 1994. *The Birds of South America. The Suboscine Passerines, Vol. 2.* Austin: University of Texas Press.
- Rosenblum, E. B., H. E. Hoekstra, and M. W. Nachman. 2004. Adaptive reptile color variation and the evolution of the *MC1R* gene. *Evolution* 58:1794-1808.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., S. Nichlen, and A. R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 74:5463-5468.
- Schneider, H. 2003. *Método de Análise Filogenética: Um Guia Prático.* Editora Holos - Sociedade Brasileira de Genética Press, Ribeirão Preto.
- Takeuchi, S., H. Suzuki, M. Yabuuchi, and S. Tahahashi. 1996b. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta* 1308:164-168.
- Takeuchi, S., H. Suzuki, S. Hirose, M. Yabuuchi, C. Sato, H. Yamamoto, and S. Takahashi. 1996a. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1306:122-126.

- Theron, E., K. Hawkins, E. Bermingham, R. E. Ricklefs, N. I. Mundy. 2001. The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Current Biology* 11:550-557.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Tabela 1. Lista das espécies analisadas com o código de identificação de cada exemplar, sítios variáveis presente no gênero *Antilophia* e sítios (destaque em cinza) onde já foram registrados associações de variações nucleotídicas e fenótipos melânicos em aves. Asterisco indica igualdade com a seqüência inicial (amostra AboCAA01). Sítio heterozigoto é denominado com o código de letras padronizado pela IUPAC (R = C / T). Genótipo refere-se à combinação dos dois alelos. Haplótipo refere-se à simbologia dos diferentes genótipos. Número de acesso do GenBank das amostras analisadas.

Espécie (plumagem)	Identificação das amostras	Posição dos sítios ¹										Genótipo	Haplótipo	Número de acesso GenBank		
		1	2	2	2	2	3	5	6	6	6					
		8	0	4	5	7	2	2	2	8	9					
		9	7	4	3	4	8	9	9	9	9					
<i>A. bokermanni</i> (branca)	AboCAA01	G	A	G	G	G	A	C	C	A	G	1/1	H_1	XXXX		
	AboCAA02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboCLU01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboCLU02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboCLU03	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboCLU04	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboCLU05	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboCVV01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboBCE01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	2/2	H_3	XXXX		
	AboBCE02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboBCE03	*	*	A	*	*	T	*	*	*	*	3/3	H_2	XXXX		
	AboBME01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboBME02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboBME03	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboMHE02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	AboMFU01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
	<i>A. galeata</i> (negra)	Aga39	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX	
Aga40		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga41		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga42		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga43		A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	4/4	H_4	XXXX		
Aga410		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga519		*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	1/5	H_6	XXXX		
Aga545		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga761		*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	5/5	H_5	XXXX		
Aga795		*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	6/6	H_7	XXXX		
Aga822		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga906		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga1010		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		
Aga1130		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1/1	H_1	XXXX		

¹Sítios nucleotídicos numerados de acordo com o posicionamento da seqüência de MC1R de galinha (*G. gallus* – número de acesso NM_001031462).

Legenda das Figuras

Fig 1. Foto dos dois exemplares de machos adultos das espécies do gênero *Antilophia*. *A. galeata* (à esquerda) e *A. bokermanni* (à direita).

Fig 2. Área de ocorrência de *A. bokermanni* e *A. galeata*. Posicionamento dos dois pontos de obtenção de amostras *A. galeata* (estrelas) dentro de sua área de ocorrência (modificada de Rêgo et al. 2010 - prelo).

Fig 3. Rede de haplótipos encontrado entre *A. bokermanni* e *A. galeata* as seqüências de *MC1R* obtidas neste estudo. Os haplótipos são representados por círculos, sendo o seu tamanho proporcional à sua frequência. Cor branca corresponde amostras de *A. bokermanni* e cor preta amostras de *A. galeata*. Os números nos traços que separam os círculos representam o posicionamento dos sítios que diferem os respectivos haplótipos.

Figuras



Fig. 1.



Fig. 2.

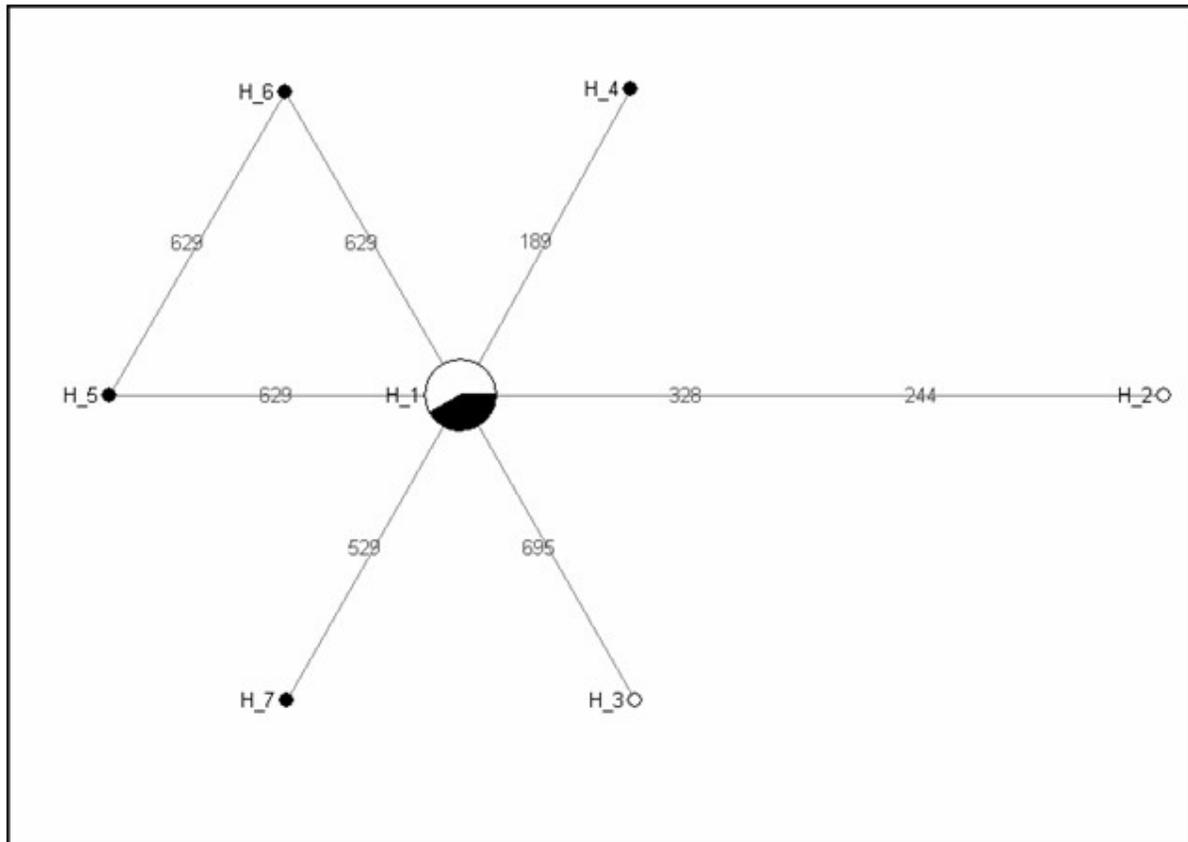


Fig. 3.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Durante a execução desta pesquisa com *Antilophia bokermanni*, uma das preocupações sempre foi como transformar os dados produzidos com a ferramenta da genética molecular em informações que pudessem ser utilizadas por agentes tomadores de decisão em programas voltados para sua conservação.

O material produzido no Plano de Conservação do Soldadinho-do-araripe (AQUASIS, 2006) conseguiu, com muita perspicácia, sintetizar os objetivos principais e específicos que, de acordo com o nível de prioridade e prazos de execução, seriam necessários para garantir a perpetuação da *A. bokermanni*, como também a conservação e o uso racional de todo o ecossistema envolvido.

De forma similar, tentamos aqui complementar o planejamento estratégico sugerido pelo Plano de Conservação através dos dados moleculares, associando os resultados encontrados com a sua importância nas medidas de proteção para *A. bokermanni*:

- 1) **Níveis de diversidade genética de *A. bokermanni* similares aos de sua espécie-irmã não-ameaçada (*A. galeata*)** – Para garantir a manutenção e ampliação da variabilidade genética da população de *A. bokermanni*, as medidas de conservação devem focar o uso sustentável dos recursos naturais, protegendo principalmente as matas úmidas de encosta e também as nascentes, pois esses compõem as condições básicas para a sobrevivência da ave;
- 2) **Ausência de sub-estruturação populacional** – Evitar processos de fragmentação populacional está diretamente ligado com as medidas de preservação contínua das matas úmidas

de encosta da Chapada do Araripe, mas também com a recuperação de áreas já impactadas. Garantir que a reduzida população de *A. bokermanni* não sofra às conseqüências de sub-estruturamento, aumenta a viabilidade da espécie;

3) **Diversidade distribuída de maneira homogênea (fluxo gênico)** – O fluxo gênico é reflexo direto do deslocamento de indivíduos dentro da área de ocorrência (fluxo de indivíduos). Tal evento além de garantir que a variabilidade esteja distribuída por toda população, também ajuda a diminuir as chances de cruzamentos endogâmicos, o que poderia provocar uma diminuição do sucesso reprodutivo. Tal aspecto também é beneficiado pela preservação dos recursos naturais em sua área de distribuição como comentado nos itens anteriores;

4) **Similaridade genética com sua espécie-irmã (*A. galeata*)** – Com certeza o aspecto mais delicado a ser tratado neste estudo, por envolver aspectos de validação de espécie. O achado de uma separação incompleta de linhagens entre as duas espécies do gênero *Antilophia* para todos os marcadores moleculares utilizados (mitocondriais e nucleares), leva-nos ao questionamento: Numa situação extrema de diminuição da população de *A. bokermanni*, seria indicada a inclusão de exemplares de *A. galeata* para reprodução? Levando em consideração que neste momento as duas espécies já seguem caminhos evolutivos distintos, apoiados por diferentes dados (separação física das populações; padrão de plumagem dos machos; ausência de migração segundo dados moleculares), cruzar exemplares das duas populações seria desfazer o processo natural de separação. Desta forma, as medidas a serem adotadas devem concentrar-se em fornecer condições ambientais para que *A. bokermanni* possa se manter sem a interferência de “pool” gênico de uma segunda espécie.

5) **Monitoramento com a ferramenta molecular** – Este trabalho permitiu ter o primeiro conjunto de informações genéticas da espécie *A. bokermanni*. A realização de monitoramentos futuros far-se-á necessária para indicar se as medidas de conservação adotadas no seu Plano de Conservação estão surtindo efeito sobre a viabilidade populacional e, caso seja necessário, indicarem novas estratégias de sustentabilidade para os recursos naturais da região.

Os dados moleculares aqui relatados mostram que a conservação do soldadinho-do-araripe está diretamente relacionada com a manutenção de seu habitat (matas e nascentes), havendo a necessidade de políticas de proteção voltadas para este aspecto. Desta forma, serão as atitudes tomadas nos próximos anos que nos dirão até que ponto conseguimos colaborar efetivamente para a conservação e perpetuação deste endemismo da avifauna brasileira que é *Antilophia bokermanni*.

ANEXO

Normas para publicação na revista AUK: (<http://www.aou.org/auk/authors.php>)

The Auk

Instructions to Authors

These instructions are also available as a PDF document (127K, 4pp) that may be viewed or printed using Adobe Reader software.

Manuscripts up to 40 pages, including title page, abstract (maximum 250 words), text, tables and figures, will be considered for publication. All submissions to *The Auk* must be made online using the American Ornithologists' Union author portal in ScholarOne Manuscripts™ (<http://mc.manuscriptcentral.com/ucpress-auk>), the online manuscript submission and peer-review system of *The Auk*.

Authors will be asked to register the first time they enter the site. After receiving a password, authors can proceed to upload their manuscripts through a step-by-step process. Help is always available in the "Get Help Now" link found in the top right corner of the ScholarOne page and the "Resources" menu on the right side of the logon page. Additional help is available from the Review Manager (managingeditor@aou.org).

Text files must be submitted as Word or WordPerfect files. Suitable graphic formats include TIFF, EPS, or JPEG. Mixed text and graphics are acceptable in MS Word or WordPerfect with embedded graphics formats. Manuscripts that do not conform to the following guidelines either will be returned or will experience protracted delays in the review process.

I. General Instructions

- Format your manuscripts for 8.5- × 11-inch paper, 12-point font, double-spaced throughout, including tables, figure legends, and literature cited. In general, manuscripts should be formatted similar to papers in a recent issue of *The Auk*.
- Leave at least a 1-inch (25-mm) margin on all sides. Do not hyphenate words at ends of lines.
- Use italic type instead of underlining words to be italicized.
- Only the following Latin terms should be italicized: *in vivo*, *in vitro*, *in utero*, *in situ*, *ad libitum*, *a priori*, and *a posteriori*. All other Latin terms (except scientific names) should be left unitalicized.
- Cite each figure and table in the text. Tables and figures must be sequenced in the order cited.
- Use "Figure" only outside of parentheses; otherwise, use "Fig." if singular, "Figs." if plural (e.g., Fig. 2; Figs. 2 and 3; Figs. 3-6).}

- To cite figures or tables from another work, write figure or table in lowercase (e.g., figure 2 in Smith 1980; table 5 in Jones 1987).
- All measurements are to be given in SI units.
- Use continental dating (e.g., 29 September 1992), the 24-hour clock (e.g., 0800 and 2300 hours), and standard time (not daylight savings time). Specify that it is Standard Time (e.g., EST for Eastern Standard Time) at first reference to time of day.
- English names of bird species that occur in North America and Middle America should follow the 7th edition of the AOU *Check-list of North American Birds* and its supplements. English names of birds should be capitalized. Names for other species should follow an appropriate standard. English names of other organisms should be capitalized.
- Use the following abbreviations: s (second), min (minute), h (hour); designate temperature as 36°C. Do not abbreviate day, week, month, or year.
- For user-defined abbreviations, write out words in full the first time a term is used in the text. Abbreviate thereafter: "Second-year (SY) birds . . . We found SY birds in large numbers."
- Use the following statistical abbreviations: ANOVA, SD, SE, df, CV, NS, *n*, *P*, *r*, *F*, *G*, χ^2 , *t*-test, *U*-test. Other statistical abbreviations, in general, should conform to sixth edition of *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (1994, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom).
- Numbers: Write out one to nine unless a measurement, but use numerals for larger numbers (e.g., three birds, 6 mm, 12 days, 2 min). If number is in a series with at least one number being 10 or more, then use all numerals (e.g., 6 males and 13 females). Use 1,000 not 1000, 0.01 not .01, and 50% instead of 50 percent.
- All gene or amino acid sequences must be deposited in GenBank or an equivalent repository, and the accession number(s) reported in the Methods.
- Five to seven key words, which summarize the major findings of the study, should be placed after the English abstract.
- Each reference cited in the text must be listed in the Literature Cited section and vice versa. Please use original publications to check references when the manuscript is complete.
- Literature citations in text are to be as follows:
 1. One author: Able (1989) or (Able 1989).

2. Two authors: Able and Baker (1989) or (Able and Baker 1989).
 3. Three or more authors: Able et al. (1989) or (Able et al. 1989). In Literature Cited section, give names of all authors.
 4. Manuscripts that are accepted for publication but not yet published: Able (1996) if date known.
 5. Unpublished materials: (K. P. Able unpubl. data); (K. P. Able pers. obs.); or (K. P. Able pers. comm.).
 6. Within parentheses: (Charley 1980; Able 1983, 1990; Able and Baker 1984); (Baker 1989, Able 1992, Charley 1996); (Able 1988a, b, c).
- Assemble manuscript in following order: (1) Title Page; (2) Abstract; (3) Key Words; (4) Text; (5) Acknowledgments; (6) Literature Cited; (7) Tables; (8) Figure Legends; (9) Figures; and (10) Appendices, if needed.
 - When submitting your manuscript, do not attach or upload your Cover Letter and Rebuttal. The Cover Letter and Rebuttal are to be inserted in the boxes provided on the Submission Form.

II. Title Page

Number Title Page as page 1, and present items in following order:

- Running head (36 characters or less). Use italics and capitalize significant words. Running head not needed for Commentaries.
- Title in capital letters.
- Author names.
- Author addresses at time research was carried out. Current addresses, if different, should be indicated as footnotes at bottom of title page. Footnotes are not used except to indicate current addresses of authors, author's current e-mail address, or death of an author.
- Name, current address, and e-mail address of corresponding author.

III. Text (page 2, etc.)

- Follow the instructions in section I.
- Do not repeat information given on title page.
- The following are typical main headings: ABSTRACT, Key Words, METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGMENTS, and LITERATURE CITED. There is no heading for the Introduction and because there is an Abstract, there is no "Conclusions" or "Summary" section.
- There is a maximum of 250 words for the Abstract.

- Keep headings to a minimum. Most manuscripts have two levels of headings: (1) centered caps and small caps, (2) indented italics with only the first word capitalized followed by a period, a dash, and the text. If three levels of headings are required use: (1) centered caps and small caps, (2) flush left caps and lower case, (3) indented italics with only the first word capitalized followed by a period, a dash, and the text.

IV. Literature Cited (continue page numbering)

- Verify all entries against original sources, especially journal titles, volume and page numbers, accents, diacritical marks, and spelling in languages other than English. Capitalize all nouns in German.
- Cite references in alphabetical order by first author's surname and then his/her initials. References by a single author precede multi-authored works by same first author, regardless of date. Listings with multiple authors are done by first author's name (surname and then initials), second author's name, etc.
- List works by the same author(s) in chronological order, beginning with earliest date of publication. If author has two works in same year, place in order of first citation in text; these works should be lettered consecutively (e.g., 1991a, b).
- "In press" citations must have been accepted for publication, with the name of journal or publisher included with year and volume number.
- Do not write author names in uppercase. Use "normal" case (e.g., Hendricks, D. P.) or the "small caps" command. Insert a period and space after each initial of an author's name, and note that a comma always precedes the "and" in a list of authors' names.
- Journal titles should be written in full and not abbreviated. Book titles should be capitalized.
- Citations should follow formats given below:

Papers

Browne, R. A., C. R. Griffin, P. R. Chang, M. Huble, and A. E. Martin. 1993. Genetic divergence among populations of the Hawaiian Duck, Laysan Duck, and Mallard. *Auk* 110:49-56.

Fahrig, L., and G. Merriam. 1994. Conservation of fragmented populations. *Conservation Biology* 8:50-59.

Roth, R. R., and R. K. Johnson. 1993. Long-term dynamics of a Wood Thrush population breeding in a forest fragment. *Auk* 110:37-48.

Willis, E. O., and Y. Oniki. 1978. Birds and army ants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 9:243-263.

Dissertations, Books, Chapters

American Ornithologists' Union. 1998. Check-list of North American Birds, 7th ed. American Ornithologists' Union, Washington, D.C.

Freeman, S. 1990. Molecular systematics and morphological evolution in the blackbirds. Ph.D. dissertation, University of Washington, Seattle.

Gaunt, A. S. 1988. Interaction of syringeal structure and airflow in avian phonation. Pages 915-924 *in* *Acta XIX Congressus Internationalis Ornithologici* (H. Ouellet, Ed.). National Museum of Natural Sciences, Ottawa, Ontario.

Kear, J. 1970. The adaptive radiation of parental care in waterfowl. Pages 357-392 *in* *Social Behaviour in Birds and Mammals* (J. H. Crook, Ed.). Academic Press, London.

Lack, D. 1954. *The Natural Regulation of Animal Numbers*. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.

Lowther, P. E. 1993. Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*). *In* *The Birds of North America*, no. 47 (A. Poole and F. Gill, Eds.). Academy of Natural Sciences, Philadelphia, and American Ornithologists' Union, Washington, D.C.

Walsberg, G. E. 1983. Avian ecological energetics. Pages 161-220 *in* *Avian Biology*, vol. 7 (D. S. Farner, J. R. King, and K. C. Parkes, Eds.). Academic Press, New York.

Electronic Sources

Due to the transitory nature of many websites, avoid using electronic sources wherever possible. If an electronic source is used, it must be accessible and not password protected. Please double-check that the source is still available at the time of submission.

Keitt, T. H., D. L. Urban, and B. T. Milne. 1997. Detecting critical scales in fragmented landscapes. *Conservation Ecology* 1, article 4. [Online.] Available at www.consecol.org/vol1/iss1/art4.

V. Tables (continue page numbering)

- Tables are to be submitted as editable Word files in Table format or tab-delimited format, not as pictures.
- Each table must start on separate page and be double-spaced throughout (header, table body, footnotes). Table numbers should be Arabic numerals followed by a period.
- Capitalize first word of the table heading; all other words should be lowercase unless a proper noun. Include a period at end of the heading. See recent issues for examples.
- Indicate footnotes by lowercase superscript letters (a, b, c, etc.).
- Do not use vertical lines in tables.
- Include horizontal lines above and below boxhead, and at end of table. Follow details of style used in *The Auk* for headings in boxhead.

VI. Figure Legends (continue page numbering)

- Start with "Fig.". Indent and double space legends. Type legends in paragraph form.
- Do not include "exotic symbols" (lines, dots, triangles, etc.) in figure legends; either label them in figure or refer to them by name in legend.

VII. Preparation of Illustrations

- Figures intended for final production (not for reviewing purposes) must be uploaded as separate files in ScholarOne. They must have a minimum resolution of 600 dpi. For line art, the preferred resolution is 1200 dpi. Acceptable file formats include EPS, TIF, JPG, and BMP.
- Routine illustrations are black and white halftones (photographs), drawings, or graphs. Figures in *The Auk* are virtually identical to those submitted (little degradation occurs, but flaws will show). Therefore, illustrations should be prepared to professional standards. Illustrations should be prepared for one- (3.5") or two-column width (7"), keeping in mind the overall dimensions of a page in *The Auk*.
- Color reproduction in figures is accepted only where necessary and at the expense of the authors (\$300 per page). Color images must be saved in CMYK mode.
- Group multiple, related illustrations as panels in a single figure (Fig. 1A, B, etc.) so that they can be placed on the same page.

- Helvetica or a similar *sans serif* typeface is recommended for figures. Handwritten or typed symbols are unacceptable. Halftone figures and plates must be of good quality for review purposes.
- Contact the Managing Editor (managingeditor@aou.org) if you have difficulties with your figures.

VIII. What and Where to Submit

Initial Submission

- All manuscripts must be submitted electronically online using ScholarOne (<http://mc.manuscriptcentral.com/ucpress-auk>). Authors will be asked to register the first time they enter the site. After receiving a password, authors can proceed to the Author Center and upload their manuscripts through a step-by-step process. Help with this procedure can be obtained online or by contacting the Review Manager (managingeditor@aou.org). NOTE: Only fields with the tag "req" need to be completed.
- A cover letter must accompany all new submissions. This letter can be typed directly into ScholarOne or uploaded as a file. This letter should include any special instructions and any address changes during the next several months, as well as a daytime phone number, fax, and e-mail address for the corresponding author. This letter should include a statement indicating that the manuscript reports on original research not published elsewhere and that it is submitted exclusively to *The Auk*.

Revisions

- Revisions must be submitted online through the author's ScholarOne account.
- The cover letter and rebuttal should be entered directly into the ScholarOne online submission form and should address all comments from reviewers, Associate Editor, and Editor. If the rebuttal file is too large for the box on the submission form, it may be submitted as a Supplemental File.

IX. Preproofs, Proofs, Reprints, and Charges

- Authors will receive copyedited and page proofs for approval, which must be returned by e-mail within 48 hours to avoid publication delays. Because changes in proofs are time-consuming, authors should not expect to make major modifications in their work at this stage. Authors should update their ScholarOne accounts and keep the Managing Editor (managingeditor@aou.org) informed of e-mail address changes, so proofs will not be delayed.
- Authors will receive a gratis final PDF and information on ordering reprints of their article with the page proofs.

- Color reproduction in figures is accepted only where necessary and at the expense of the authors (\$300 per page).
- The AOU requests that authors bear all or part of the cost of publishing their papers when grant, institutional, or personal funds are available for this purpose. Current costs per printed page are US \$75. Authors who do not have access to publication funds may request a waiver of a portion of this payment from Scott Gillihan, the AOU Executive Officer (executiveofficer@aou.org).

If you have questions, contact the Editor by e-mail (murphym@pdx.edu), telephone (503-725-8734), or fax (503-725-3888) or contact the Review Manager (managingeditor@aou.org).

[Revised: June 2009]

© 2009 American Ornithologists' Union

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.