

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

**ANÁLISE GENÉTICA DA DINÂMICA SOCIAL DO TANGARÁ-DE-CABEÇA-BRANCA
(*Dixiphia pipra*) EM PAISAGENS FRAGMENTADAS DA AMAZÔNIA CENTRAL**

JAQUELINE RIZZI FORTUNA

Manaus-Amazonas

2011

JAQUELINE RIZZI FORTUNA

**ANÁLISE GENÉTICA DA DINÂMICA SOCIAL DO TANGARÁ-DE-CABEÇA-BRANCA
(*Dixiphia pipra*) EM PAISAGENS FRAGMENTADAS DA AMAZÔNIA CENTRAL**

ORIENTADORA: Dra. Marina Anciães

CO-ORIENTADORA: Dra. Izeni Pires Farias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em Genética,
Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus-Amazonas

2011

F745

Fortuna, Jaqueline Rizzi

Análise genética da dinâmica social do tangará-de-cabeça-branca (*Dixiphia pipra*) em paisagens fragmentadas da Amazônia Central / Jaqueline Rizzi

Fortuna. --- Manaus : [s.n.], 2011.

2011 ix, 69 f. : il. color.

Sinopse

Foi realizada a amplificação cruzada de 21 pares de microssatélites para *Dixiphia pipra*. Utilizamos seis marcadores para o estudo do efeito da fragmentação florestal na dinâmica social desta espécie através da análise de parentesco. A fragmentação florestal causou tênues alterações nos índices mensurados.

Palavras-chave: *Dixiphia pipra*, microssatélites, amplificação heteróloga, fragmentação florestal.

DEDICO

A Clarice Rizzi,

por todo amor e incentivo aos
meus sonhos acadêmicos-científicos.

*O índio chorou, o branco chorou
Todo mundo está chorando
A Amazônia está queimando
Ai, ai, que dor
Ai, ai, que horror
O meu pé de sapopema
Minha infância virou lenha
Ai, ai, que dor
Ai, ai, que horror
Lá se vai a saracura correndo dessa queitura
E não vai mais voltar
Lá se vai onça pintada fugindo dessa queimada
E não vai mais voltar
Lá se vai a macacada junto com a passarada
Para nunca mais, voltar
Para nunca mais, nunca mais voltar
Virou deserto o meu torrão
Meu rio secou, pra onde vou?
Eu vou convidar a minha tribo
Pra brincar no Garantido
Para o mundo declarar
Nada de queimada ou derrubada
A vida agora é respeitada todo mundo vai cantar
Vamos brincar de boi, tá Garantido
Matar a mata, não é permitido*

“Lamento de raça”

Emerson Maia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de estudar no Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a bolsa de mestrado do CNPq. À Dra. Vera Margarete Scarpassa e ao Dr. Jorge Ivan Porto (ex-coordenadores do PPG-GCBEv) pela atenção, interesse e apoio com o custeio de transporte para as áreas de coleta. E as secretárias Alessandra Marques, Elci Batista e Tamara Araújo, sempre muito prestativas e atenciosas comigo.

A Dra. Marina Anciães e Dra. Izeni Pires Farias por acreditarem no meu potencial e pela orientação. Ao Dr. Tomas Hrbek pelo auxílio com as análises.

A Shizuka Hashimoto por toda garra nos campos exaustivos, auxílio no laboratório e conversas sobre as “*Pipra*”. A Andrew Whittaker por solidariamente unir-se a nós, otimizar o esforço amostral e a localização dos leques de *Dixiphia pipra*.

Agradeço a Clarice, Solange, Maria Helena, Geni, Cristiane, Rafael, Christian e Jéssica Rizzi por todo amor, incentivo, apoio psicológico e financeiro para morar longe de casa em busca deste sonho.

Ao Thiago V.V. Costa, Rafael Boldrini, Nicole Dutra, Pedro Ivo Simões, Mauro Ortiz, Fabrício Baccaro pelas idéias e revisões do meu projeto de mestrado.

Aos revisores do plano de dissertação, Dra. Cristina Miyaki, Dra. Silvia Nassif Del Lama e Dra. Camila Cherem Ribas. A banca da aula de qualificação, composta pelo Dr. Charles R. Clement, Dr. Renato Cintra e Dra. Vera Margarete Scarpassa. E a banca da defesa pública da dissertação, composta pela Dra. Vera Margarete Scarpassa, Dra. Cintia Cornelius Frische e Dra. Joselita Mendes dos Santos.

Ao Dr. Mario Cohn-Haft pelas conversas sobre meu projeto. Aos meus amigos ornitólogos Christian Borges Andretti, Claudeir Ferreira Vargas e Thiago Viana Vernadesci Costa pela amizade,

idéias e os dados de ponto de escuta de *D. pipra* no Km37, que facilitaram a localização dos leques de *D. pipra*.

Agradeço ao Dr. José Luis Camargo, coordenador científico do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais, pelo auxílio na realização do projeto nas áreas do PDBFF e ao apoio logístico da equipe do PDBFF, composta por Adriane Pantoja, Ary J. C. Ferreira, M. Rosely C. Hipólito, Antonio J. M. Pereira, Josimar F. Menezes, Paulo L. Pereira, Luiz R. Queiroz, Antonio Martins e José Francisco T. A. Júnior.

Ao Dr. Phil Stouffer pela oportunidade de coleta em 2009 e interesse nos resultados. Aos seus alunos, Erik Johnson por todas as aulas práticas de mudas e idade, prestatividade sobre os dados de *D. pipra* no PDBFF, a Karl Mokross pela dica de coleta de sangue na asa e ao auxiliar de campo “Seu Jairo”, pelo convívio e ensinamentos sobre os passarinhos.

Ao meu grande amigo e colega de mestrado Gilson Martins de Azevedo Júnior, pela amizade sincera e preocupação com o meu estado de saúde. A minha hermana paraguaia Rebecca Zarza Aguilera, pela amizade, confiança e apoio psicológico. Aos meus amigos manauaras Patrícia Gomes da Costa e Alexandre Dutra, por toda amizade e tratamento como familiar. A minha amiga Andrea Santa Rita e amigo Silo Soares da Silva, pela amizade, apoio e momentos de descontração.

A todos os colegas do Laboratório de Evolução e Genética Animal/UFAM pela companhia dia, noite e final de semana. Em especial aos que me ajudaram com alternativas para meus PCR's, amostras que não funcionavam de jeito nenhum e ensinamento dos programas de análises: Concy Freitas, Deyla Paula de Oliveira, Kelmer Batalha Passos, Waleska Gravena, Pedro Ivo Simões e Rafaela Santos. Ao Mário Nunes, pela amizade e pelo auxílio com o ABI.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Evolutiva e Comportamental de Aves, especialmente a João Vítor Campos e Silva e Beatriz Souza pelas amostras do Cabo Frio, a Marina Anciães, Jefferson Valsko, Shizuka Hashimoto, Mariana Tolentino e Maíra Rizzi, pelas amostras de *Dixiphia pipra* no Km41.

A família Azamor por compartilhar o wireless e pela amizade.

RESUMO

Os Pipridae são pequenos pássaros frugívoros distribuídos em florestas da região Neotropical. Uma característica marcante dos piprídeos são os machos com plumagens exuberantes que realizam danças no sistema de acasalamento em leques. Poucos marcadores moleculares foram desenvolvidos para estudos populacionais desta família. Como o desenvolvimento de novos marcadores microssatélites específicos tem custos altos e é laborioso, testamos a amplificação cruzada de 21 *loci* desenvolvidos para os piprídeos *Chiroxiphia caudata*, *C. lanceolata* e *Manacus manacus* em *Dixiphia pipra*. O sucesso de amplificação cruzada foi de 62%, e para os *loci* que amplificaram a heterozigosidade observada variou de 0.25000 a 0.80000 e a esperada de 0.22273 a 0.94192. No total oito marcadores apresentaram características desejadas como marcadores informativos para *Dixiphia pipra*, com 2 a 14 alelos por *locus*. Alguns *loci* foram testados para amplificação em outras espécies de Pipridae e aparentemente também são úteis para estudos populacionais. Selecionamos seis marcadores para estudo populacional de *Dixiphia pipra* que responderiam as perguntas de fluxo gênico, grau de parentesco e tamanho populacional efetivo em uma paisagem fragmentada no PDBFF, a ~80-km ao Norte de Manaus. A análise Bayesiana revelou que as dez localidades amostradas compreendem uma única população. O valor de parentesco (r) de indivíduos de paisagens contínuas e fragmentadas é similar com um leve desvio para os fragmentos florestais de 1 Ha, onde aparentemente é área de nidificação. Machos de leques de paisagem contínua e fragmentada apresentam os mesmos níveis de relacionamento. O tamanho populacional efetivo da paisagem como um todo foi de 102 indivíduos. Concluímos que a fragmentação florestal recente causou mudanças sutis nos índices mensurados.

ABSTRACT

Pipridae are small frugivorous birds distributed in Neotropical forests. One striking feature of manakins is that males have lush plumes for performing dances in a lek mating system. Few molecular markers were developed for population studies of this family. As the development of new microsatellite markers has high costs and is laborious, we tested the cross-species amplification of 21 loci developed for the manakins *Chiroxiphia caudata*, *C. lanceolata* and *Manacus manacus* in *Dixiphia pipra*. The success of cross-species amplification was 62%, and for loci that amplified the observed heterozygosity ranged from 0.25000 to 0.80000 and the expected from 0.22273 to 0.94192. In total eight markers were informative markers as desired traits for *Dixiphia pipra*, with 2-14 alleles per locus. Some loci were tested for amplification in other Pipridae species and apparently are also useful for population studies. We selected six markers to study population *Dixiphia pipra* to respond to the questions of gene flow, degree of kinship and effective population size in a fragmented landscape in PDBFF, ~ 80-km north of Manaus. The Bayesian analysis revealed that the ten sampling sites comprise a single population. The value of relatedness (r) of individuals in continuous and fragmented landscapes is similar with a slight deviation to the forest fragments of a Ha, where apparently it is the nesting area. Males of the ranges of continuous and fragmented landscapes have the same levels of relationship. The effective population size of the landscape as a whole was 121 individuals. We conclude that the recent forest fragmentation caused subtle changes in the indices measured.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>DIXIPHIA PIPRA</i> LINNAEUS, 1758	14
1.2 <i>SISTEMA DE ACASALAMENTO</i>	16
1.3 <i>FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL</i>	18
BIBLIOGRAFIA CITADA	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO 1	24
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISSCUSSÃO	29
BIBLIOGRAFIA CITADA	30
CAPÍTULO 2	36
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	41
<i>COLETA DE AMOSTRAS</i>	41
<i>EXTRAÇÃO, GENOTIPAGEM E SEXAGEM MOLECULAR</i>	42
<i>ANÁLISES GENÉTICAS</i>	42
RESULTADOS	43
<i>ESTRUTURA POPULACIONAL</i>	44
<i>PARENTESCO</i>	44
<i>TAMANHO POPULACIONAL EFETIVO</i>	46
DISCUSSÃO	47
<i>DIVERSIDADE GENÉTICA</i>	48
<i>ESTRUTURA POPULACIONAL</i>	48
<i>PARENTESCO</i>	49
<i>TAMANHO POPULACIONAL EFETIVO</i>	51
<i>IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO</i>	53
BIBLIOGRAFIA CITADA	54
3 SÍNTESE	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Amplificação cruzada para <i>Dixiphia pipra</i>	34
Tabela 2 – Comparação do sucesso na amplificação cruzada e número de alelos de alguns <i>loci</i> microssatélites para <i>Dixiphia pipra</i> no trabalho de Loiseau <i>et al.</i> (2007) e no presente trabalho.....	35
Tabela 3 - Amplificação cruzada para outras espécies de Pipridae.....	35

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Localidades amostradas, número de indivíduos coletados (Nc) e analisados (N), proporção de machos e fêmeas (Nma, Nf), tamanho populacional efetivo (Ne), diversidade alélica (Na) e equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	59
Tabela 2 – Análise de variância molecular entre e dentro das populações.....	61
Tabela 3 – Matriz de migrantes do Migrate. Valores acima da diagonal correspondem ao número de imigrantes enquanto os valores abaixo da diagonal correspondem ao número de emigrantes.....	62
Tabela 4 - Matriz de migrantes do Arlequin por classe de sexo.....	62

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Padrões de coloração na plumagem de *Dixiphia pipra*. (a) macho adulto (anilha metálica D110037), (b) macho sub-adulto (anilha metálica D110100), (c) macho jovem (anilha metálica D110030) e (d) fêmea (anilha metálica D110038).....15

Figura 2 – Fêmea de *Dixiphia pipra* no ninho no PDBFF, janeiro de 2011.18

CAPÍTULO 2

Figura 1– Mapa do Projeto Dinamica Biologica de Fragmentos Florestais (PDBFF) elaborado por Venticinque, E. M. e Fernandes, T. L. N. em 1998. Adaptado por Jaqueline Fortuna em 2011. Os circulos vermelhos representam as areas de coleta dentro da area total do PDBFF. No amostragem da Dimona e Porto Alegre foram utilizados fragmentos florestais de 1, 10 e 100 Ha de cada localidade.....63

Figura 2 - Média dos valores pareados de relacionamento de todos os indivíduos (machos e fêmeas). (a) por localidade: (FC) floresta contínua, (FF 100) floresta fragmentada de 100 Ha, (FF 10) floresta fragmentada de 10 Ha, (FF 1) floresta fragmentada de 1 Ha, (CP) capoeira e (b) por paisagem: (FC) floresta contínua, (FF) floresta fragmentada e (CP) capoeira.....64

Figura 3 – Média dos valores pareados de relacionamento entre fêmeas por localidade. (CF-FC) Cabo Frio – Floresta Contínua, (CF-CP) Cabo Frio – Capoeira, DIM 1 (DIMONA 1 Ha), POA 1 (Porto Alegre 1 Ha).....65

Figura 4 – Média de valores pareados relacionamento entre machos (a) dentro do leque, (b) todos os machos das localidades onde foram registrados leques, (c) dentro dos leques em cada paisagem: (FC) floresta contínua e (FF) floresta fragmentada.....66

Figura 5 - Histograma de freqüência dos valores pareados de relacionamento entre machos de leques e entre todos os indivíduos amostrados por localidade, respectivamente: Km37 (a) e (b); (c) e (d) Porto Alegre – 100 Ha, (e) e (f) DIMONA – 10 Ha e (g) e (h) DIMONA 100 Ha.....67

Figura 6 - Network dos valores pareados de relacionamento de machos nos leques e fêmeas transeuntes capturadas no leque. Círculo preto: machos adultos, círculo cinza: macho sub-adulto, círculo verde: macho com plumagem juvenil, rosa: fêmea; linhas conectivas finas: primos, linhas conectivas médias: meio-irmãos, linhas conectivas grossas: irmãos verdadeiros. Numerações dentro dos círculos representa número de coleta de sangue ou anilha metálica (a) e (b) Km 37, (c) Porto Alegre – 100 Ha, (d) DIMONA – 10 Ha e (e) DIMONA 100 Ha.....68

Figura 7 - Histograma de frequência dos valores pareados de relacionamento de machos adultos (barra preta), machos com plumagem juvenil (barra cinza) e fêmeas (barra branca) por localidades.....69

Figura 8 - Histograma de frequência dos valores pareados de relacionamento adultos (barra preta), machos com plumagem juvenil (barra cinza) e fêmeas (barra branca) por tipo de paisagem.....70

Figura 9 – Tamanho populacional efetivo para a paisagem contínua e fragmentada.....71

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Dixiphia pipra* Linnaeus, 1758

O tangará-de-coroa-branca habita o sub-bosque de florestas da região Neotropical, sendo que a raça *Dixiphia pipra pipra* tem a distribuição no sul e leste da Venezuela, Guianas, leste da Colômbia e principalmente a porção norte da Amazônia brasileira (Snow 2004).

Dixiphia pipra é um gênero monotípico dentro da família Pipridae, popularmente conhecidos como os tangarás dançadores. Este tangará tem de 9 a 10 cm e a fêmea é levemente mais pesada que o macho (Théry 1992). Como em outros piprídeos, *Dixiphia pipra* exibe um alto grau de dimorfismo sexual (Figura 1); sendo que o macho adulto apresenta plumagem exuberante de cor preta com a coroa branca. Já a fêmea e os machos jovens têm a plumagem indiferente em tons verde-oliva. Aparentemente o macho adquire a plumagem de adulto no segundo ano de vida (Castro-Astor 2007, Erik Johnson com. pess.). O padrão de coloração na plumagem nos machos determina a posição social no sistema de acasalamento (leque) e é estreitamente relacionado a forte seleção sexual e ao desvio no sucesso reprodutivo dos indivíduos.



Figura 1 – Padrões de coloração na plumagem de *Dixiphia pipra*. (a) macho adulto (anilha metálica D110037), (b) macho sub-adulto (anilha metálica D110100), (c) macho jovem (anilha metálica D110030) e (d) fêmea (anilha metálica D110038). Fotografias de Andrew Whittaker.

Não é bem conhecida a longevidade da espécie, porém dados de marcação e recaptura no local deste estudo (PDBFF) indicam que há indivíduos que chegam a sete e até dez anos de idade (Erik Johnson, com. pess.).

Os indivíduos forrageiam sozinhos em busca de frutos pequenos e variados, sendo que no PDBFF a preferência é pelos frutos de *Heliconia acuminata* (Heliconiaceae), devido ao alto teor de proteína (Hashimoto e Anciães, dados não publicados) e abundância da herbácea, podendo ser considerado como recurso-chave para todos os frugívoros de sub-bosque desta

localidade (Uriarte *et al.* 2011). Entretanto, a dieta varia ao longo do ano de acordo com a disponibilidade de frutos, e é também composta por Melastomataceae (principalmente *Miconia* spp., Shizuka Hashimoto obs. pessoal), e por vezes *Dixiphia pipra* complementa com insetos (Snow 1960), podendo acompanhar bandos mistos de aves.

Ao entardecer *Dixiphia pipra* toma banho coletivo em pequenos cursos de água com indivíduos de outras espécies. Fortuna, Hashimoto e Whittaker (com. pess.) observaram em um igarapé no PDBFF essa interação com os piprídeos *Corapipo gutturalis*, *Lepidothrix serena* e *Pipra erythrocephala*. Após o banho, os indivíduos procuram galhos baixos no sub-bosque para dormir e recomeçam as atividades em torno das seis horas da manhã.

1.2 Sistema de acasalamento

O sistema de acasalamento de piprídeos é em leques poligínicos (um macho e duas ou mais fêmeas). O leque é um local com territórios de machos, que permanece o mesmo ano após ano. Nos leques os machos realizam displays com manobras rápidas e complexas (danças), principalmente na presença de fêmeas. O macho adulto passa boa parte da vida no leque, saindo apenas para forragear. Os agrupamentos de machos em leques servem para facilitar o acesso e comparação pelas fêmeas e nesse sistema os machos contribuem apenas com o sêmen, enquanto as fêmeas são responsáveis pela nidificação e cuidado parental (Bradbury & Gibson, 1983; Prum, 1998).

O número de machos em um leque varia, dependendo em parte da densidade populacional. Os *displays* podem ocorrer a qualquer momento, sendo mais intensos e contínuos na presença da fêmea. Um pequeno número de machos dominantes realizam a maioria das danças e são os que acasalam, assim existe um grande desvio no sucesso reprodutivo no leque.

O sistema de leques sugere a necessidade de grandes áreas e conectividade para a persistência de populações viáveis, uma vez que as fêmeas visitam vários leques e machos jovens dispersam a procura de territórios próprios (Graves *et al.* 1992; Théry 1992) longe dos territórios de seus genitores (McDonald e Potts, 1994; Loiselle *et al.* 2007), estratégia que evita o endocruzamento e mantém a variabilidade genética em populações geneticamente saudáveis.

Os machos de *Dixiphia pipra* têm a organização espacial em leques explodido (conforme Prum 1994), onde o território de machos é em torno de 10 a 40 metros de diâmetro e com dois a sete territórios de machos adjacentes dentro do leque, onde a maioria dos machos está em contato auditivo, mas não necessariamente contato visual (Snow 1961; Théry 1992; Castro-Astor *et al.* 2007). O canto de *Dixiphia pipra* é simples, curto, similar ao canto de um gafanhoto e audível apenas em curta distância. Os leques têm mais de 100 metros de distância do leque vizinho (Théry 1992) e nos locais de exibição, que podem ser no sub-bosque fechado ou clareira, os machos tem um repertório de 11 elementos de dança, além de realizarem interações com indivíduos de diferentes plumagens (Castro-Astor *et al.* 2007).

Observações em leques de *Dixiphia pipra* na Guiana Francesa (Théry 1992) mostraram que durante a estação reprodutiva, os machos adultos deslocam-se poucos metros dos sítios de exibição, já as fêmeas apresentam área de vida quatro vezes maior que a área dos machos adultos, visitando muitos leques e locais de banho, enquanto os machos jovens usam uma área de oito a dez vezes maior que a dos machos adultos. Os machos imaturos no primeiro ano de vida apresentaram plumagem igual das fêmeas, fazem visitas rápidas aos leques e são tolerados por adultos (status social de “visitante”) e exibições depois da performance dos machos adultos. Machos no segundo ano apresentam plumagem intermediária (status social de “intruso”) e realizam exibições periféricas durante a visita das

fêmeas nos leques de machos adultos. Os “visitantes” percorreram maiores distâncias, que diminuem à medida que se tornaram “intrusos” e se estabelecem em um leque particular.

O ninho de *Dixiphia pipra* foi descrito para a Guiana Francesa (Tosatain 1988) e Equador (Hidalgo *et al.* 2008), em geral a fêmea nidifica perto da vegetação densa, no extrato superior do sub-bosque (altura média de quatro metros). O ninho é em formato de um pequeno copo e abriga dois ovos (Figura 2). A predação nos ninhos de piprídeos é alta (ex. *Pipra filicauda* e *Lepidothrix coronata*, Ryder *et al.* 2008) logo espera-se que a taxa de sobrevivência dos adultos seja igualmente elevada para a população permanecer estável.



Figura 2 – Fêmea de *Dixiphia pipra* no ninho no PDBFF, janeiro de 2011. Fotografia de Gabriel Leite.

1.3 Fragmentação florestal

A expansão da atividade humana nas áreas de florestas naturais é uma das maiores ameaças à biodiversidade na atualidade, especialmente nos trópicos onde a taxa de desmatamento florestal é pronunciada (Gascon & Bierregaard, 2001). O desmatamento transforma a floresta contínua em fragmentos florestais de diversos formatos e tamanhos e inseridos em uma matriz diferente da floresta original (Laurence *et al.*, 2000; Fahrig, 2003).

Em uma paisagem fragmentada, a distância entre os fragmentos florestais influenciará a habilidade de dispersão das espécies (Pearce-Higgins *et al.* 2007), e o ambiente da matriz entre os fragmentos poderá regular o impacto da fragmentação sobre a dispersão de indivíduos. O baixo fluxo gênico entre populações pode causar a redução do tamanho populacional efetivo que reflete na perda cumulativa da diversidade genética dentro das populações e diferenciação genética entre populações (Haig, 1998; Allendorf & Luikart, 2007), deixando principalmente as populações pequenas mais suscetíveis aos eventos estocásticos (Gilpin & Soulé, 1986; Frankham, 2002).

Estudos ecológicos de captura e recaptura de pássaros de sub-bosque na Amazônia Central (PDBFF) antes e após o isolamento de fragmentos florestais apontam mudanças na abundância e dinâmica das populações. Por exemplo, após o isolamento houve um acréscimo temporário de pássaros (Bierregaard & Lovejoy, 1989), efeitos de área na abundância (Stouffer & Bierregaard 1995, Stratford & Stouffer, 1999, Stouffer & Borges, 2001) e dinamismo na movimentação dos pássaros através da matriz de floresta secundária (Stouffer & Bierregaard 1995, Stouffer & Bierregard, 2007, Stouffer *et al.* 2009).

O nível de fluxo gênico entre populações é dependente da distância entre as mesmas. Juntos, estes fatores irão influenciar as taxas de extinção e recolonização nos fragmentos (Frankham *et al.*, 2008; Prugh *et al.*, 2008).

O tamanho populacional reduzido também tem efeitos agudos resultantes da endogamia, inevitável mesmo em grandes populações ao longo do acúmulo de gerações. A endogamia causa redução na heterozigosidade, reprodução e sobrevivência (Frankel & Soulé, 1981; Lande 1988; Frankham *et al.*; 2008). Assim, uma estrutura de paisagem fragmentada pode, com o acúmulo de anos, tornar os acasalamentos entre indivíduos não relacionados muito

improváveis. Por outro lado, algumas espécies podem demonstrar flexibilidade comportamental adequando-se ao ambiente fragmentado.

Dados ecológicos de pássaros de sub-bosque da Amazônia Central (PDBFF) mostram que Pipridae é a família menos sensível a fragmentação (Bierregaard & Stouffer, 1997) e dados de radiotelemetria mostram que, assim como outros piprídeos, *Dixiphia pipra* se movimenta pela matriz de floresta secundária de forma mais rápida do que na paisagem contínua, sugerindo o uso diferencial dos habitats (Uriarte *et al.* 2011.).

BIBLIOGRAFIA CITADA

Allendorf, F.W. & Luikart, G. 2007. *Conservation and the Genetics of populations*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 642pp.

Bierregaard, R.O. Jr. & Lovejoy, T.E. 1989. Effects of forest fragmentation on Amazonian understory bird communities. *Acta Amazônica*, 19: 215-241.

Bierregaard, R.O., Jr. & P.C. Stouffer. 1997. Understory birds and dynamic habitat mosaics in Amazonian rainforests. Páginas 138-155 in: W. F. Laurance and R. O. Bierregaard, Jr., eds., *Tropical forest remnants: the ecology, conservation, and management of fragmented communities*. University of Chicago Press.

Frankel, O.H.; Soulé, M.E. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Frankham R.; Ballou J.R.; Briscoe D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, England, UK. 617pp.

- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ed.Soc.Bras.Genética, R.Preto, SP. 259pp.
- Gascon, C. & Bierregaard, Jr, R.O. 2001. The Biological Dynamics of Forest Fragments Project. In Bierregaard, R.O. Jr.; Gascon, C.; Lovejoy, T.E., Mesquita, R. (eds.). 2001. *Lessons From Amazonia: The Ecology and Conservation of a Fragmented Forest*. Yale University Press, New Haven, Connecticut, USA. 478pp.
- Haig, S. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79(2): 413-425.
- Hidalgo, J.; Ryder, T.; Tori, W.; Blake, J.G.; Loiselle, B.A. 2008. Nest architecture and placement of three manakin species in lowland Ecuador. *Cotinga*, 29:57-61.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241: 1455–1460.
- Laurance W.F.; Delamônica, P.; Laurance, S.G.; Vasconcelos, H.L.; Lovejoy, T.E. 2000. Rainforest fragmentation kills big trees. *Nature*. 404: 836.
- Pearce-Higgins, J.; Brace, R.; Hornbuckle, J. 2007. Survival of Band-tailed Manakins. *The Condor*, 109:167-172.
- Prugh, L. R.; Hodges, K. E.; Sinclair, A. R.; Brashares, J. S. 2008. Effect of habitat area and isolation on fragmented animal populations. *PNAS*, 105(52): 20770 -20775.
- Ryder, T.; Durães, R.; Tori, W.; Hidalgo, J.; Loiselle, B.A. ; Blake, J.G. 2008. Nest survival for two species of manakins (Pipridae) in lowland Ecuador. *Journal of Avian Biology*, 355-358.
- Snow, D. 1961. The displays of the manakins *Pipra pipra* and *Tyrannetes virescens*. *IBIS*, I03A(1):110-113.

- Snow, D.W. 2004. Family Pipridae (Manakins), p. 110-169. In: del Hoyo, J.; Elliot, A.; Christie, D. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World*. v. 9., Lynx Editions, Barcelona.
- Stouffer, P. & Bierregaard, R. 1995. Use of Amazonian Forest Fragments by Understory Insectivorous Birds. *Ecology*, 76(8): 2429-2445.
- Stouffer, P.C. & S. H. Borges. 2001. Conservation recommendations for understory birds in Amazonian forest fragments and secondary areas. Pages 248-261 in R. O. Bierregaard, Jr., C. Gascon, T. E. Lovejoy, and R. Mesquita, eds. *Lessons from Amazonia: the Ecology and conservation of a fragmented forest*. Yale University Press.
- Stratford, J.A. and P.C. Stouffer. 1999. Local extinctions of terrestrial insectivorous birds in Amazonian forest fragments. *Conservation Biology*, 13: 1416-1423.
- Théry, M. 1992. The evolution of leks through female choice: differential clustering and space utilization in six sympatric manakins. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30: 227-237.
- Tostain, O. 1988. New information on the nesting of four species of manakin (Pipridae) in French Guiana: *Pipra pipra*, *Pipra serena*, *Pipra aureola*, and *Pipra erythrocephala*. *Alauda* 56: 159–170.
- Uriarte, M.; Anciães, M.; Siva, M.T.B.; Rubim, P.; Johnson, E.; Bruna, E. 2011. Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92 (4): 924-937.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica social das populações do piprídeo tangará-de-cabeça-branca (*Dixiphia pipra*) em paisagem fragmentada na Amazônia Central.

2.2 Objetivos específicos

1. Testar a amplificação cruzada como metodologia para o estudo genético de populações da espécie.
2. Estimar o fluxo gênico das populações de *Dixiphia pipra* de paisagens fragmentadas e paisagens contínuas.
3. Estimar o tamanho populacional efetivo (N_e) das populações de *Dixiphia pipra* em paisagens fragmentadas e paisagens contínuas.
4. Estimar o grau de parentesco (r) das populações de *Dixiphia pipra* em florestas fragmentadas e paisagens contínuas.

CAPÍTULO 1

Fortuna, J. R.; Hashimoto, S.; Farias, I. P.; Anciães, M.
2011. Amplificação cruzada de *loci* microssatélites em
Dixiphia pipra. Manuscrito formatado nas normas da
Acta Amazonica.

Amplificação cruzada de *loci* microssatélites em *Dixiphia pipra*

Jaqueline Rizzi FORTUNA^{1,3}, Shizuka HASHIMOTO^{2,3}, Izeni Pires FARIAS^{1,3}, Marina ANCIÃES^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus/Brasil

²Coordenação de Pesquisas em Ecologia e Programa de Coleções e Acervos Científicos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus/Brasil

³Laboratório de Evolução e Genética Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus/Brasil

RESUMO

Os Pipridae são pequenos pássaros frugívoros distribuídos em florestas da região Neotropical. Como características marcantes da família, os machos apresentam plumagens exuberantes e realizam danças nupciais, típicas do sistema de acasalamento em leques. Como regra entre as aves, poucos marcadores moleculares foram desenvolvidos para estudos populacionais também desta família. Como o desenvolvimento de novos marcadores microssatélites específicos tem custos altos e é laborioso, testamos a amplificação cruzada de 21 *loci* desenvolvidos para os piprídeos *Chiroxiphia caudata*, *C. lanceolata* e *Manacus manacus* em *Dixiphia pipra*. O sucesso de amplificação cruzada foi de 62%, e para os *loci* que foram amplificados a heterozigosidade observada variou de 0.25000 a 0.80000 e a esperada de 0.22273 a 0.94192. No total, oito marcadores apresentaram características desejadas como marcadores informativos para *Dixiphia pipra*, com 2 a 14 alelos por *locus*. Alguns *loci* foram

testados para amplificação em outras espécies de Pipridae e poderão se revelar úteis para estudos com estas espécies.

PALAVRAS-CHAVE: amplificação cruzada, microssatélites, *Dixiphia pipra*, Pipridae.

ABSTRACT

Pipridae are small frugivorous birds distributed in Neotropical forests. Striking features of manakins are males in lush plumage patterns and courtships performed by males in arenas, typical of lekking mating systems. Few molecular markers were developed for population studies in this family. As development of new microsatellite markers has high costs and is laborious, we tested the cross-species amplification of 21 loci developed for the manakins *Chiroxiphia caudata*, *C. lanceolata* and *Manacus manacus* in *Dixiphia pipra*. The success of cross-species amplification was 62%, and for loci that amplified the observed heterozygosity ranged from 0.25000 to 0.80000 and the expected from 0.22273 to 0.94192. In total, eight markers were informative for *Dixiphia pipra*, with 2-14 alleles per locus. Some loci were tested for amplification in other Pipridae species and are likely also useful for population studies.

KEY WORDS: cross-species amplification, microsatellites, *Dixiphia pipra*, Pipridae.

INTRODUÇÃO

Os marcadores do tipo microssatélites são capazes de determinar o tamanho populacional, taxas de migração, o relacionamento entre indivíduos, entre outros parâmetros no estudo de ecologia molecular de populações e genética da conservação (Selkoe e Toonen 2006). Muitos marcadores específicos foram desenvolvidos, porém o esforço laboratorial para isso requer considerável tempo e elevados custos. Assim, os diversos testes para identificação de *loci* microssatélites conservados entre espécies, através de amplificação cruzada com

polimorfismo, estão suprimindo a necessidade do desenvolvimento de novos marcadores microssatélites (ex. Galbusera *et al.* 2000, Küpper *et al.* 2008).

Para os piprídeos, pássaros com plumagens exuberantes e conhecidos pela forte pressão de seleção sexual em seus leques poligínicos, existem apenas microssatélites desenvolvidos para as espécies *Chiroxiphia caudata* (Francisco *et al.* 2004), *Chiroxiphia lanceolata* (Duval & Nutt 2005), *Chiroxiphia linearis* (McDonald & Potts, 1994), *Corapipo altera* (Barnett *et al.*, 2008b) e *Manacus manacus* (Piertney *et al.* 2002).

Dentro da família, *Dixiphia pipra* é um gênero monotípico (que, apesar de não ser reconhecido ainda, seu posicionamento filogenético na família indica tratar-se de *Pipra*, Rêgo *et al.* 2007, Tello *et al.* 2009, McKay *et al.* 2010) amplamente distribuído em florestas de *terra-firme* da região neotropical (Snow 2004). Apesar de existirem alguns trabalhos de comportamento de *Dixiphia pipra* (Castro-Astor *et al.* 2007, Théry 1992, Snow 1961), somente um trabalho abordou aspectos moleculares (Loiselle *et al.* 2007 testaram a hipótese de seleção de parentesco nos leques com seis *loci* heterólogos). Assim, nosso objetivo foi realizar a amplificação cruzada de marcadores microssatélites para realizar estudos de ecologia molecular com *Dixiphia pipra*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 amostras de sangue de indivíduos da espécie capturados em redes de neblina em três fragmentos florestais próximos (150 a 1000m), localizadas a cerca de 70Km ao Norte de Manaus/AM.

O DNA genômico foi extraído usando o protocolo de CTAB (Doyle e Doyle, 1987) com modificações. Para a amplificação cruzada testamos 21 *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Chiroxiphia caudata* (Francisco *et al.* 2004), *Chiroxiphia lanceolata*

(Duval & Nutt 2005) e *Manacus manacus* (Piertney *et al.* 2002). Fizemos o PCR de gradiente de temperaturas (45 a 65 °C) com o volume de 10,5 µL, sendo 2,7 µL de água ultrapura, 1,0 µL de 50 mM MgCl₂, 1,0 µL de 10 mM dNTPs, 1,0 µL de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM KCl), 1,5 µL de *primer forward*; 1,5 µL de 2 µM do *primer reverse*; 0,8 µL de 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase e 1,0 µL de DNA (50 – 100 ng/µL). As condições do PCR de gradiente de temperaturas foram a desnaturação a 93°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 40 seg, anelamento do *primer* no gradiente de temperaturas por 40 seg, extensão a 72°C por 1:30 min e extensão final a 72°C por 5 min.

Após selecionar a temperatura de anelamento adicionamos aos *primers forward* uma cauda M13 na extremidade 5' (Schulelke, 2000). As reações de PCR para genotipagem tiveram volume de 10 µL: 2,95 µL de água ultrapura, 1,0 µL de 50 mM MgCl₂, 1,0 µL de 10 mM dNTPs, 1,0 µL de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM KCl), 0,75 µL de *primer forward*; 0,5 µL de *primer* M13 marcado com fluorescência, 1,0 µL de 2 µM do *primer reverse*; 0,8 µL de 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase e 1,0 µL de DNA (50 – 100 ng/µL). As condições de PCR foram desnaturação a 93°C por 1 min, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento dos *primers* (temperatura específica na tabela 1) por 30 seg, extensão a 68°C por 1 min e a etapa de adição da fluorescência consistiu em 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 53°C por 30 seg, extensão a 68°C por 1 min e extensão final a 72°C por 30 min.

As genotipagens foram feitas no seqüenciador automático ABI 3130 xl (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos foram obtidos no programa *GeneMapper* v 4.0 (Applied Biosystems, Inc). O programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) foi usado para calcular a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação, aplicando a correção de Bonferroni para as comparações

múltiplas. A ocorrência de alelos nulos foi checada no programa Microchecker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

RESULTADOS E DISSCUSSÃO

Entre os 21 pares de *primers* microssatélites testados, seis não amplificaram e dois não apresentaram padrões definidos de alelos em *Dixiphia pipra* (Tabela 1). Para os 13 *loci* restantes, a heterozigosidade observada variou de 0.25000 a 0.80000 e a esperada de 0.22273 a 0.94192. Houve indício de desequilíbrio de ligação do *locus* Man3 com os *loci* Chir2_9 e Chir4_34. O *locus* Chir4_34 foi monomórfico enquanto o *locus* Man7 foi o mais polimórfico, com 21 alelos (média 9 alelos por loco). Os *loci* Chir3_22, Lan22, Man3, Man7 apresentaram significativa deficiência de heterozigotos no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que os três últimos *loci* também apresentaram evidência de alelos nulos. O desequilíbrio pode ter sido influenciado pelo sistema de acasalamento em leques poligínicos, onde há desvio no sucesso reprodutivo dos machos devido à intensa pressão de seleção sexual. Igualmente, há uma maior chance de ocorrer erros como alelos nulos na identificação dos genótipos devido à amplificação cruzada de microssatélites.

Alguns dos microssatélites utilizados no presente estudo também foram testados por Loiselle *et al.* (2007) (Tabela 2) em uma população de *Dixiphia pipra* da Amazônia equatoriana. Não conseguimos amplificar o *locus* Lan20, entretanto amplificamos outros três *loci* não utilizados naquele estudo, sendo que, entre eles, Man13 não apresentou desvios no EHW, desequilíbrio de ligação ou alelos nulos.

Os microssatélites que amplificaram para *Dixiphia pipra* (exceto Man3) foram testados no presente estudo para amplificação cruzada em outras seis espécies de Pipridae (Tabela 3). Foram utilizados dois indivíduos por espécie e submetidos às mesmas condições

de PCR que *Dixiphia pipra*. O microssatélite Man13, transferido com sucesso para todas as sete espécies, é um dos poucos *loci* que pode ser considerado como universal entre as aves (Dawson 2005, dados não publicados).

A amplificação cruzada em *Dixiphia pipra* funcionou para 62% dos *loci* testados. Destes, a maioria dos microssatélites foram polimórficos e no geral podem ser utilizados como marcadores informativos para o estudo de populações. Aparentemente, a capacidade destes *loci* para amplificação cruzada em outros Pipridae sugere que podem ser marcadores úteis em outras espécies da família.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa faz parte da dissertação de mestrado de J.R.F., bolsista de mestrado do CNPq. O projeto foi custeado pela FAPEAM (DCR 1/2006 e PPP 2008) e NSF a M.A e CNPq 554057/2006-9 e 575603/2008-9 a IPF. Licenças de coleta SISBIO 20414-1 e anilhamento CEMAVE 3240. Agradecemos o apoio logístico do PDBFF/INPA e aos Drs. Erik Johnson e Phil Stouffer pelo apoio na obtenção do material biológico. Aos colegas do LEGAL/UFAM pelo apoio no laboratório.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Barnett, J.; Stenzler, L.; Ruiz-Gutierrez, V.; Bogdanowicz, S.; Lovette, I. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers from the white-ruffed manakin *Corapipo altera* (Aves, Pipridae). *Molecular Ecology*, 8:215-218.

- Castro-Astor, I.; Alves, M.; Cavalcanti, R. 2007. Display behavior and spatial distribution of the white-crowned manakin in the Atlantic Forest of Brazil. *The Condor*, 109: 155-166.
- Dawson, DA, 2005. BIRDMARKER database. Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield, UK. (<http://www.shef.ac.uk/nbaf-s/databases-BIRDMARKER.html>). Acesso em 19/05/2011.
- Doyle, J.J; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry B*, 19: 11–15.
- Duval, E. H.; Nutt, K. J. 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the lance- tailed manakin (*Chiroxiphia lanceolata*). *Molecular Ecology Notes*, 2:112–114.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Francisco, M.; Galletti, P.; Gibbs, H. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in the blue manakin, *Chiroxiphia caudata* (AVES, Pipridae). *Molecular Ecology Notes*, 4:758- 760.
- Galbusera, P.; Dongen, S.V.; Matthysen, E. 2000. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics*, 1:163-168.
- Küpper, C.; Burke, T.; Székely, T.; Dawson, D. 2008. Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. *BMC Genomics*, 9 (502): 1-20.
- Loiselle, B., Ryder, T., Durães, R., Tori, W., Blake, J., Parker, P., *et al.* 2007. Kin selection does not explain male aggregation at leks of 4 manakin species. *Behavioral Ecology*, 18: 287-291.

- McDonald, D.B.; Potts, W. K. 1994. Cooperative display and relatedness among males in a lek-mating bird. *Science*, 266:1030–1032.
- McKay, B.D.; Barker, F.K.; Mays, H.L. Jr.; Doucet, S.M.; Hill, G.E. 2010. A molecular phylogenetic hypothesis for the manakins (Aves: Pipridae). *Mol Phylogenet Evol.* 55(2):733-7.
- Piertney, S. B.; Shorey, L.; Höglund, J. 2002. Characterization of microsatellite DNA markers in the white-bearded manakin (*Manacus manacus*). *Molecular Ecology Notes*, 2:504–505.
- 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(6):565-575.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2): 233-234.
- Selkoe, K.; Toonen, R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9:615-629.
- Snow D. 1961. The displays of the manakins *Pipra pipra* and *Tyrannetes virescens*. *IBIS*, I03A(1):110-113.
- Snow, D.W. 2004. Family Pipridae (Manakins), p. 110-169. In: del Hoyo, J.; Elliot, A.; Christie, D. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World*. v. 9., Lynx Editions, Barcelona.
- Tello, J.; Moyle, R.; Marchese, D.; Cracraft, J. 2009. Phylogeny and phylogenetic classification of the tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannides). *Cladistics* 25:429-467.

Théry, M. 1992. The evolution of leks through female choice: differential clustering and space utilization in six sympatric manakins. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30: 227-237.

Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P. M.; Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.

Tabela 1 – Amplificação cruzada para *Dixiphia pipra*.

Locus	Repetição	Ta (°C)	pb	N	Na	Ho	He	P
CHIR1-6	(CTTT) ₃ TT(CTTT) ₁₂ CTGT(CTTT) ₂ CTGT(CTTT) ₂ (CTGT) ₁₂	NP	-	-	-	-	-	-
CHIR1-16	(GATA) ₂ AATA(GATA) ₁₁ GACA(GATA) ₂	58	176-208	30	10	0.66667	0.82655	0.09906
CHIR1-18	(CA) ₁₄	NS	-	-	-	-	-	-
CHIR2-9	(CA) ₆ CG(CA) ₁₄	58	139-151	14	5	0.57143	0.65608	0.31758
CHIR3-15	(CAA) ₁₀	48	151-160	29	3	0.31034	0.27526	1.00000
CHIR3-22	(GT) ₃ GCAC(GT) ₁₆	51	163-171	30	6	0.30000	0.70565	0.00000*
CHIR3-27	(CA) ₁₃	NP	-	-	-	-	-	-
CHIR4-33	(CT) ₇ (CA) ₁₄ (TA) ₃ (CA) ₄	57	150-174	30	9	0.53333	0.64463	0.12213
CHIR4-34	(CA) ₁₂ GACG(CA) ₇	47	215	30	1	-	-	-
Lan10	(CA) ₁₇	59	194-200	28	2	0.25000	0.22273	1.00000
Lan20	(CA) ₂₅	NP	-	-	-	-	-	-
Lan21	(CA) ₁₄	NS	-	-	-	-	-	-
Lan22	(CA) ₁₈	62	165-207	30	16	0.70000	0.93729	0.00187*
Man1	(GATA) ₁₇	NP	-	-	-	-	-	-
Man3	(GATA) ₁₈	64	217-327	27	16	0.59259	0.91684	0.00074*
Man4	(GATA) ₁₇	NP	-	-	-	-	-	-
Man6	(GATA) ₁₉	50	209-229	30	7	0.80000	0.77401	0.62596
Man7	(GATA) ₁₄	64	173-257	29	21	0.48276	0.94192	0.00000*
Man8	(GATA) ₁₇	NP	-	-	-	-	-	-
Man13	(GT) ₂₇	63	144-196	30	14	0.66667	0.85028	0.02340
Man14	(CA) ₃₁	54	161-163	23	2	0.47826	0.41449	0.62631

Ta: temperatura de anelamento, N: número de indivíduos, Na: numero de alelos, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada, NP: sem produto de PCR, NS: bandas não específicas, p<0,003846, * p significativo após a correção de Bonferroni

Tabela 2 – Comparação do sucesso na amplificação cruzada e número de alelos de alguns *loci* microssatélites para *Dixiphia pipra* no trabalho de Loiseau *et al.* (2007) e no presente trabalho.

	Loiseau <i>et al.</i> (2007)		Presente estudo	
	<i>n</i>	Na	<i>n</i>	Na
Lan10	82	6	28	2
Lan20	79	14	-/-	-/-
Lan22	85	20	30	16
Man3	-	-	27	16
Man6	85	9	30	7
Man7	-	-	29	21
Man13	-	-	30	14

- não amplificou ou não apresentou EHW e equilíbrio de ligação, -/- não amplificou.

Tabela 3 - Amplificação cruzada para outras espécies de Pipridae.

Espécie	CHIR1 _16	CHIR3_22	CHIR4_33	Lan22	Man6	Man7	Man13
<i>Corapipo gutturalis</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Ilicura militaris</i>	-	+	-	-	-	-	+
<i>Lepidothrix coronata</i>	+	+	-	+	+	-	+
<i>Lepidothrix serena</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>Manacus manacus</i>	+	+	+	+			
<i>Pipra erythrocephala</i>	+	+	+	+	+	+	+

+ amplificou, - não amplificou.

CAPÍTULO 2

Fortuna, J. R.; Hashimoto, S.; Farias, I. P. Anciães, M. 2011. Análise genética da dinâmica social do tangará-de-cabeça-branca (*Dixiphia pipra*) em paisagens fragmentadas da Amazônia Central. Manuscrito formatado nas normas da Acta Amazonica.

Análise genética da dinâmica social do tangará-de-cabeça-branca (*Dixiphia pipra*) em paisagens fragmentadas da Amazônia Central.

Jaqueline Rizzi FORTUNA^{1,3}, Shizuka HASHIMOTO^{2,3}, Izeni Pires FARIAS^{1,3}, Marina ANCIÃES^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus/Brasil

²Coordenação de Pesquisas em Ecologia e Programa de Coleções e Acervos Científicos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus/Brasil

³Laboratório de Evolução e Genética Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus/Brasil

RESUMO

Examinamos os efeitos da fragmentação florestal no tangará-de-cabeça-branca *Dixiphia pipra* no desenho experimental do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais, ~80-Km ao Norte de Manaus. Utilizamos seis marcadores moleculares microssatélites para testar alterações no fluxo gênico, relacionamento entre indivíduos de leques e paisagens e tamanho efetivo populacional. Amostramos cinco leques e indivíduos da paisagem contínua e fragmentada. As análises mostram a existência de uma única população, com intenso fluxo gênico principalmente de imigrantes para os fragmentos florestais de 1 Ha e 10 Ha. Não encontramos relacionamentos maiores entre indivíduos de leques de paisagens fragmentadas, entretanto encontramos relacionamento baixo, mas significativo entre fêmeas de fragmentos florestais de 1 Ha. O tamanho populacional efetivo para a população foi de 102 indivíduos. Os resultados apontam para mudanças tênues nos índices mensurados em *Dixiphia pipra*.

ABSTRACT

We examined the effects of forest fragmentation on the White crowned manakin *Dixiphia pipra* at the experimental design of the Biological Dynamics of Forest Fragments ~ 80-km north of Manaus. We used six microsatellite markers to test changes in gene flow, relationship between individuals attending leks and landscapes and effective population size. We sampled five leks and individuals of continuous and fragmented landscape. The analysis shows the existence of a single population with high gene flow mainly of immigrants to the forest fragments of 1 Ha and 10 Ha. We found no relationships between individuals of leks and fragmented landscape, however we find low relationship, but significant among females of forest fragments of 1 ha. The effective population size for the population was 102 individuals. The results point to subtle changes in the indices measured in *Dixiphia pipra*.

INTRODUÇÃO

A fragmentação florestal é uma das maiores preocupações para a conservação das espécies, especialmente na região tropical onde as taxas de desmatamento são alarmantes (Laurance *et al.* 2001, Laurence 2006). Em aves, a redução do habitat pode alterar diversos aspectos biológicos de uma espécie, como por exemplo, a capacidade de dispersão na floresta contínua e na matriz (ex. espécies podem ficar restrita a floresta contínua e atravessar a matriz somente quando houver algum grau de regeneração da floresta), a disponibilidade de recursos alimentares no fragmento, a diferenciação no sucesso reprodutivo e na sobrevivência (Fahrig 2003, Ferraz *et al.* 2003, Carlo e Morales 2008, Boscolo e Metzger 2009). Para compreender os riscos para a persistência populacional de cada espécie em resposta a perda de habitat é

necessário integrar os aspectos ecológicos a estudos genético-populacionais (Banks *et al.* 2007).

Dixiphia pipra é um pequeno pássaro frugívoro de sub-bosque de florestas tropicais. O sistema de acasalamento em *Dixiphia pipra* é em agregações de machos em leques poligínicos dispersos (Snow 1961, Prum 1994, Castro-Astor *et al.* 2007, Sick 1997). Nesse sistema, machos dançarinos com plumagens exuberantes realizam a maioria das cópulas, acentuando o desvio no sucesso reprodutivo, enquanto o papel dos machos subordinados é desconhecido (McDonald e Potts 1994, Höglund e Alatalo 1995, Duval 2007, Francisco *et al.* 2009). Além disso, indivíduos de diferentes faixas etárias, plumagem e sexos tem padrões específicos de dispersão. Machos jovens possuem plumagem pré-definitiva (plumagem de cor verde similar a das fêmeas) e movimentam-se em vastas áreas em busca de um leque para fixar-se. Quando tornam-se adultos adquirem a plumagem definitiva e nessa fase estão estabelecidos em um leque, sendo portanto indivíduos territorialistas. Por outro lado, as fêmeas percorrem vastas áreas e visitam diferentes leques para avaliar os machos para acasalamento, apresentando um padrão intermediário de movimentação na paisagem contínua (Théry 1992). Esse padrão de dispersão diferenciado entre machos adultos, jovens e fêmeas provavelmente representa uma estratégia para evitar a endogamia nos sistemas de leques (Loiselle *et al.* 2007), em que apenas uma pequena proporção (20-50%) dos indivíduos machos em idade reprodutiva obtém parceiras durante o acasalamento (McDonald e Potts 1994, Ryder *et al.* 2009).

Apesar de *Dixiphia pipra* apresentar flexibilidade a mudanças ambientais ocorrentes quando uma paisagem de floresta contínua se transforma em uma paisagem fragmentada (mostrada sobretudo pela grande abundância de indivíduos em fragmentos florestais pequenos, revisão em Uriarte *et al.* 2011), não se sabe qual o efeito da fragmentação no fitness dos indivíduos e no potencial evolutivo da espécie nos remanescentes florestais.

Assim, ainda que os dados ecológicos de recaptura de indivíduos em fragmentos florestais apontem para pouco efeito da fragmentação em *Dixiphia pipra*, é possível que uma paisagem fragmentada cause alterações imperceptíveis em estudos puramente ecológicos, como mudanças no fluxo gênico e diferenciação genética entre fragmentos remanescentes, além de redução do tamanho populacional efetivo e migração diferencial daquela conhecida para machos e fêmeas, ou, por fim, a mudanças no comportamento para a disputa por fêmeas e no grau de dominância entre machos. Uma paisagem fragmentada poderia limitar a dispersão pós-natal de machos jovens, elevar a densidade de indivíduos em leques dos fragmentos florestais e aumentar o parentesco dos indivíduos de um leque. Assim, poderíamos esperar mudanças no fluxo gênico entre áreas, indicado por diferenças nas taxas de migração entre florestas, por divergência genética, ou por variações da diversidade genética em uma área. Além disso, poderia-se esperar alterações do número relativo de indivíduos reprodutores e no grau de relacionamento entre indivíduos de uma área. Frente ao aumento de densidade populacional, comportamentalmente, indivíduos reprodutores poderiam mudar seu *status* e tornarem-se subordinados a poucos machos dominantes (e não se reproduzirem), ou continuarem reprodutores apesar de um maior número de vizinhos. No primeiro caso o número relativo de indivíduos reprodutores diminuiria, e no segundo caso o número de reprodutores relativo ao número total de indivíduos se manteria, mas se elevaria em relação a área ocupada por esses indivíduos (i.e. haveria um número maior de reprodutores por unidade de área). Considerando os aspectos da história de vida de *Dixiphia pipra* (ex. Théry 1992, Castro-Astor 2007), pode-se imaginar que são necessárias grandes áreas de floresta para não ocorrer mudanças no comportamento social e reprodutivo da espécie, tornando-a uma boa candidata ao estudo proposto.

Neste trabalho nós avaliamos o impacto genético da fragmentação florestal em *Dixiphia pipra* usando o desenho experimental de fragmentação do habitat do Projeto

Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF) para responder as seguintes perguntas (a) existe estrutura populacional na paisagem fragmentada?, (b) qual o tamanho mínimo de fragmento florestal para comportar um leque? (c) o grau de parentesco (r) em leques de paisagem fragmentada é maior? e (d) o tamanho populacional efetivo (N_e) é menor nas paisagens fragmentadas?

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

As amostras foram coletadas durante 2009-2011 em 10 localidades do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF), a ~ 80 Km ao norte de Manaus. O PDBFF tem como missão determinar as consequências ecológicas do desmatamento e da fragmentação florestal sobre a fauna e flora. Assim, a mais de 30 anos atrás foram criados fragmentos florestais artificiais que vem sendo desde então monitorados para diversos grupos biológicos, incluindo as aves. Utilizamos dois fragmentos florestais de 1 Ha, dois fragmentos florestais de 10 Ha e dois fragmentos florestais de 100 Ha. Também três áreas de floresta contínua e uma capoeira. Detalhes da distribuição e distância dos locais amostrados estão na Figura 1.

Realizamos censo auditivo oportunísticos para localizar leques de seis fragmentos florestais de 1-100 ha, por vezes com auxílio em campo do especialista em aves Andrew Whittaker. Nestas localidades, após encontrar os indivíduos cantando, confirmamos a existência do leque para então armar as redes de neblina. Na área controle de floresta contínua do Km 37 utilizamos dados de quatro anos do monitoramento por ponto de escuta do projeto

TEAM Aves do INPA para otimizar a procura em campo dos leques. Fizemos um esforço de aproximadamente 600 horas rede e capturamos 193 indivíduos nestas sete áreas (seis fragmentos florestais e uma área controle de floresta contínua). No Cabo Frio e Km 41 não analisamos amostras de leques, incluímos 36 amostras provenientes do Laboratório de Biologia Evolutiva e Comportamental de Aves do INPA.

Todos os indivíduos capturados foram anilhados com anilhas coloridas e metálicas padrão CEMAVE. Foi coletado aproximadamente 10µl de sangue da veia braquial e armazenado em álcool absoluto.

Extração, genotipagem e sexagem molecular

Avaliamos 21 pares de microssatélites heterólogos (capítulo 1) e selecionamos seis loci polimórficos para este estudo (Man6, Man13, Chir1_16, Chir3_22, Chir4_33 e Lan22). Devido a problemas de amplificação em algumas amostras, outros dois pares selecionados aguardam testes após re-desenho dos *primers* para serem incluídos no estudo. Utilizamos 182 indivíduos e as extrações e genotipagens foram feitas conforme descrito no capítulo 1. Todos os indivíduos com plumagem verde foram sexados molecularmente com os genes CHD-Z e NP.

Análises genéticas

O número de alelos, a heterozigosidade observada e esperada foram calculados no Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 1992) e os valores de *p* foram ajustados com a correção de Bonferroni (Rice 1989). Para verificar se existe estruturação genética entre as localidades

(através do número K de clusters) foi realizada uma análise Bayesiana no programa Structure 2.2 (Pritchard et al. 2000) utilizando o modelo de mistura (*admixture model*). Realizamos uma análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) considerando o *F_{ST}* de Wright (Wright, 1969) (Goodnight & Queller, 1999). Verificamos a migração total de machos e fêmeas no Migrate 2.1 (Beerli e Felsenstein 2001) e a migração por sexos (machos e fêmeas) no Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 1992). A análise de relacionamento (*r*) foi calculada no programa Kinship 1.3 (Goodnight & Queller, 1999), com as frequências alélicas de 182 indivíduos. Indivíduos com valores de *r* em torno de 0,12, 0,25, 0,50 e >0,50 foram considerados primos, meio irmãos, irmãos verdadeiros, pais e filhotes respectivamente. Redes de relacionamento nos leques foram construídas no Cytoscape 2.8.1 (Shannon *et al.* 2003). O tamanho populacional efetivo (*N_e*) foi estimado no Colony 2.1.1.1 (Wang 2009), que utiliza dados de relacionamento como base para o cálculo e leva em consideração o sistema de acasalamento da espécie.

RESULTADOS

Encontramos cinco leques de *Dixiphia pipra*: 1) área controle do Km37, 2) área controle do Km37 – leque com apenas um território, 3) no fragmento florestal de 10 Ha da DIMONA foram encontrados dois leques (um com três machos adultos e um sub-adulto (amostrado) e o outro com apenas um macho adulto (não amostrado), 4) no fragmento florestal de 100 Ha da DIMONA e 5) no fragmento florestal de 100 Ha da Porto Alegre. Possivelmente existem mais leques nos fragmentos florestais de 100 Ha da DIMONA e Porto Alegre que serão encontrados aumentando o esforço em campo. No fragmento florestal de 10 Ha da Porto Alegre não existe leque até a presente data.

Genotipamos 182 indivíduos, sendo 102 machos e 80 fêmeas. O número de alelos nas localidades variou de 5-9 (Man6), 8-14 (Man13), 8-12 (Chir1_16), 3-8 (Chir3_22), 4-8 (Chir4_33), 9-18 (Lan22). A análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que 25% dos loci apresentam um déficit de heterozigotos após a correção de Bonferroni, sendo a maioria (11/14) nos fragmentos florestais (Tabela 1).

Estrutura populacional

A análise de estrutura populacional entre as dez localidades revelou que não existe a formação de grupos K entre as populações (maior probabilidade de $K=1$, $p = -6365$), ou seja, todas as localidades compreendem uma população panmítica. A análise de variância molecular (AMOVA) confirma a ausência de estrutura genética ($F_{st} = 0,00769$) e que mais de 99% da variação está dentro das populações (Tabela 2). A análise de migrantes para a população como um todo (machos e fêmeas) implementada no Migrate mostra o sentido de migração em direção aos fragmentos de 1 Ha e 10 Ha, com valores de diversidade teta (θ) entre 3,6 (Porto Alegre 1 Ha) a 4,7 (Dimona 1 Ha) (Tabela 3). A análise de número de migrantes por classe de sexo (aqui, machos de plumagem verde foram analisados juntos dos machos adultos) implementada no Arlequin evidencia que os maiores valores de migração são de machos (Tabela 4).

Parentesco

Comparações de todos os indivíduos por localidade e por tipo de paisagem mostram semelhança no valor de relacionamento (~ 0), com valores levemente maiores para florestas fragmentadas de 1 Ha e capoeira (média do $r = 0,05$), entretanto a média do valor de

relacionamento não é significativa entre indivíduos dos tipos de paisagem fragmentada, contínua e capoeira (Figura 2). As médias dos valores de relacionamento para fêmeas dos fragmentos florestais de 1 Ha da Dimona e Porto Alegre são significativas, $r = 0,16$ e $0,13$ respectivamente enquanto para os machos jovens o r não foi maior que $0,07$ em todas as localidades (Figura 3). Dois pares de indivíduos dos fragmentos florestais de 1 Ha, um da DIMONA e outro da Porto Alegre, apresentaram relacionamento absoluto entre si ($r=1$), sendo um entre um macho adulto e uma fêmea e o outro entre dois machos com plumagens verdes.

Dentro dos cinco leques de paisagem contínua e fragmentada, o relacionamento médio dos machos tem valores de r negativos ou próximos de 0, indicando que o tipo de paisagem não muda o relacionamento dos machos de leque (Figura 4). Para sabermos se nossos resultados mudam se compararmos apenas indivíduos associados a leques comparamos os valores de parentesco entre machos de dentro de leques a àqueles exibidos entre quaisquer machos da localidade, incluindo indivíduos de leques, e os resultados foram similares entre leques e quaisquer indivíduos da localidade, sendo que na DIMONA 10 Ha existe maior frequência de relacionamento de machos dentro da localidade do que dentro do leque (Figura 5).

A rede de relacionamento para cada leque mostra que independente do tipo de paisagem, há machos não relacionados a relacionados dentro do leque e que a maioria das fêmeas que estavam naquele momento visitando o leque possuem algum tipo de relacionamento com os machos, mesmo na floresta contínua. Os maiores valores de relacionamento (irmãos verdadeiros) foram entre um macho com plumagem verde e uma fêmea visitante no leque de 100 Ha da Porto Alegre (Figura 6, c) e de um macho adulto com um macho sub-adulto no leque de 10 Ha da DIMONA (Figura 6, d).

Por último, como existem diferenças comportamentais relacionadas ao sexo e idade dos indivíduos que dizem respeito à susceptibilidade do efeito da fragmentação, avaliamos o grau de relacionamento para cada classe de sexo e idade, e por área (Figura 8). Existe pouca diferença nos valores de relacionamento de machos com plumagem verde e fêmeas. A distribuição das frequências na Porto Alegre 100 Ha e DIMONA 100 Ha é homogênea entre as classes de sexo e idade. Na DIMONA e Porto Alegre de 1 Ha as fêmeas tem maior proporção de valores positivos. Na DIMONA de 10 Ha as fêmeas e os machos adultos tem baixos valores de relacionamento enquanto nos machos de plumagem verde é maior. Na Porto Alegre de 10 Ha, Cabo Frio – floresta contínua e fragmentada os valores de relacionamento nas classes são parecidos, sendo que no primeiro fragmento não foram capturados machos adultos e no Cabo Frio apenas um macho adulto por localidade (apesar de terem sido capturados mais machos adultos).

Tamanho populacional efetivo

Calculamos o tamanho populacional efetivo de duas maneiras, uma com o tamanho populacional efetivo de todas as amostras (baseado nos resultados da análise Bayesiana de uma única população), que estimou o tamanho populacional efetivo (N_e) de 102 indivíduos. Como a pergunta inicial envolve a mudança no tamanho populacional efetivo pelo tamanho dos fragmentos, calculamos o N_e separadamente por localidade (Tabela 1, Figura 9). O tamanho populacional efetivo dos fragmentos de 1 Ha e 100 Ha é equivalente, em torno de 30 indivíduos. O tamanho populacional efetivo estimado para os fragmentos de 10 Ha é levemente maior, sendo que no fragmento florestal de 10 ha da DIMONA, onde há leque, o N_e foi o mais alto (63 indivíduos). O tamanho populacional efetivo para as florestas contínuas

foi de 25 e 45 para Km41 e Km37, respectivamente, com um viés para a floresta contínua do Cabo Frio com o N_e de 145 indivíduos. Para a capoeira o tamanho populacional efetivo foi similar ao Km37 ($N_e=44$).

DISCUSSÃO

Diversidade genética

A maioria dos *loci* não apresentou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades observadas próximas as heterozigosidades esperadas. Desvios significantes observados foram devido à deficiência de heterozigotos. Fatores laboratoriais e biológicos podem ter contribuído para este resultado, como a utilização de *primers* heterólogos e possíveis falhas durante a amplificação do PCR (ex. presença de alelos nulos), desvio no sucesso reprodutivo devido a acasalamentos preferenciais dos machos dominantes nos leques e relacionamento (r) dos indivíduos na localidade.

Descartamos a presença de alelos nulos porque nenhum locus mostrou deficiência de heterozigotos em todas as dez populações analisadas (valores significantes foram para uma a quatro localidades por marcador). Acreditamos que a maioria do déficit de heterozigotos pode ser explicado pela amostragem direcionada (a indivíduos de leques) nas localidades Porto Alegre 100 Ha, Dimona 10 Ha e 100 Ha e Km37 (total de nove desvios no EH-W). Os três *loci* com desvios do EH-W na Dimona de 1 Ha pode ser resultado da influencia do relacionamento encontrado entre as fêmeas da localidade (média de $r=0,16$) e entre um macho adulto com uma fêmea ($r=1,0$). Contudo, é difícil determinar com precisão se os desvios do EH-W têm natureza biológica ou laboratorial.

Estrutura populacional

A falta de estrutura populacional entre as localidades amostradas corroborou com as expectativas de apenas uma população para *Dixiphia pipra*. Apesar da abundância de indivíduos nos fragmentos após o isolamento das áreas, a escala espacial e a escala temporal do presente estudo (ca. 30 km de diâmetro e 20 anos de isolamento anterior a restauração da atual matriz de capoeira) não são suficientes para observar alguma estruturação nas localidades. Os fragmentos não foram permanentemente mantidos com a borda limpa e os últimos isolamentos ocorreram a bastante tempo, sendo que a capoeira já tem dezesseis anos ou mais (Nascimento *et al.* 2006). Dados de movimentação na capoeira mostram um elevado número de indivíduos de *Dixiphia pipra* neste ambiente e proporção para os machos e fêmeas capturados, o que comprova o uso desta área (Silva e Anciães. *aceito*). Igualmente, o desenho experimental do PDBFF planejou isolamentos de normalmente cem metros, e trabalhos anteriores mostram que essa distância não representaria isolamento suficiente para evitar a dispersão de *Dixiphia pipra* ou para afetar o padrão de movimentação praticado por machos territoriais em períodos anteriores a fragmentação (VanHoutan *et al.* 2007), principalmente porque o isolamento não foi constante no tempo.

A falta de estruturação genética em floresta contínua e fragmentada também ocorre em outros piprídeos, como em *Chiroxiphia caudata* que apesar de mais de 400-km de floresta contínua, houve pouca diferenciação entre as populações (Francisco *et al.* 2007), em duas populações de *Chiroxiphia lineares* com 115 km de distância na floresta quase contínua e ainda assim considerada uma única população (McDonald 2003) e em *Corapipo altera* que mesmo com a floresta intensamente antropizada por cinquenta anos, há uma fraca estrutura genética entre as fragmentos remanescentes (Barnett *et al.* 2008). A falta de estrutura

genética em paisagens fragmentadas também é observada em outros pássaros de regiões tropicais que tem boa capacidade de dispersão, como por exemplo, em *Pogonocichla stellata* (Galbusera *et al.* 2004). Entretanto, sabe-se que a fragmentação florestal pode reduzir a dispersão pós-natal e até mesmo evidenciar taxas de sobrevivência maiores nestas paisagens, como sugerido para *Pipra fasciicauda* (Pearce-Higgins *et al.* 2007). Desta forma, testamos a estruturação populacional entre as localidades, sobretudo para podermos definir a unidade amostral das análises de parentesco e tamanho populacional efetivo (ainda que tenhamos analisado também por localidade independentemente deste resultado).

Parentesco

O valor de parentesco (r) entre indivíduos foi em geral baixo ou inexistente para todos os tamanhos de fragmentos florestais, inclusive equivalentes ao encontrado na floresta contínua. Interessantemente, apesar de não significativo em média, houve uma tendência de maior relacionamento entre indivíduos nos dois fragmentos florestais de um hectare, e dois indivíduos de cada localidade apresentaram relacionamento absoluto entre si ($r=1$), sendo um entre um macho adulto e uma fêmea e o outro entre dois machos com plumagens verdes. Nestas duas reservas não existem leques e 99% das capturas foram de indivíduos verdes, o que pode indicar que este macho adulto participe de um leque nas proximidades do fragmento florestal (a capoeira circundante é de apenas 100 metros e foi isolada pela última vez em 1994) ou que ainda não se estabeleceu em um leque. Apesar destes fragmentos não apresentarem leques, o relacionamento absoluto encontrado entre dois pares de indivíduos mostra estas localidades podem ser utilizadas por fêmeas de *Dixiphia pipra* de outra forma. As fêmeas de piprídeos têm grandes áreas de vida e buscam locais fora de leques para nidificar (Théry, 1992, Durães *et al.* 2007, Durães *et al.* 2009) e estes fortes relacionamentos

indicam que as reservas de um hectare podem estar sendo usadas como locais de nidificação. Estes valores de $r=1$ e ausência de leques na floresta fragmentada de um hectare podem indicar uma fêmea que nidifica no fragmento com um filhote em pré-dispersão ou um deterioramento genético. Além disso, é possível que aumentando o número de capturas nestas áreas mais indivíduos apresentariam relacionamentos absolutos.

O valor de relacionamento de machos dos cinco leques foi baixo e está de acordo com a estratégia de leques de ausência de parentesco entre os indivíduos (ou não maior do que aquele encontrado ao acaso, entre quaisquer indivíduos amostrados em uma localidade) como estratégia para evitar a endogamia (Loiselle *et al.* 2007). Apesar da fragmentação florestal apresentar potencial para causar mudança na dominância dos machos nos leques de paisagens fragmentadas, dada a maior dificuldade de dispersão pós-natal, a escala espaço-temporal do presente estudo não evidenciou tais mudanças, o que é positivo para a manutenção da variabilidade genética dos leques destas paisagens. Mesmo que houvesse um confinamento real nos fragmentos, as fêmeas têm tradição nas preferências por machos estabelecidos em determinados territórios (Uy *et al.* 2000, Duval e Kempenaers 2008) e, assim, não esperaríamos observar uma mudança de preferências dentro dos limites de fragmentos em pouco tempo. Por outro lado, a diminuição de sua movimentação poderia impedir a prática de preferências pré-estabelecidas. Dentro de nenhum leque observamos relacionamento entre os machos adultos do leque, os relacionamentos são sempre com machos subordinados, que fazem parte do leque, mas não copulam até adquirirem plumagem de adulto e determinado *status* social no leque, o que normalmente demora anos. Além disso, os machos verdes presentes nos leques podem ser parte do leque ou apenas machos não territoriais procurando um leque para fixarem-se (“floaters”). A presença de relacionamento entre machos adultos e jovens e falta de relacionamento entre os machos adultos dentro de um leque, pode indicar que os jovens aparentados estão no leque treinando com o macho dominante e ajudando a

atrair fêmeas para o leque, mas não permanecem no leque quando se tornam adultos para evitar endogamia.

Esperávamos que a distribuição dos valores de relacionamento nas áreas fragmentadas apresentasse alguma inclinação para maior relacionamento por classe de sexo ou por faixa etária, porém a distribuição não segue um padrão, apesar dos casos isolados que inspiraram as discussões acima. Os resultados para o Cabo Frio por classe estão enviesados, uma vez que todas, exceto duas amostras (uma da floresta contínua e outra da capoeira) de machos adultos, são indivíduos jovens ou fêmeas adultas. As amostras dessa localidade foram coletadas e cedidas por JVCS, que objetivou a coleta dessas amostras para sexagem molecular dos indivíduos somente, e assim não coletou amostras dos indivíduos machos adultos capturados.

Tamanho populacional efetivo

Encontramos um pequeno tamanho populacional efetivo ($N_e = 102$ indivíduos) mesmo para a paisagem do PDBFF como um todo, que corresponde a 1.000 km^2 . Este valor foi estipulado com base no parentesco de indivíduos e sistema de acasalamento e é mais acurado que estimativas de tamanho populacional efetivo pelos métodos de excesso de heterozigotos e desequilíbrio de ligação (Wang 2009). Analisando a distribuição espacial de um “leque disperso” de *Dixiphia pipra* e a área de vida de 2.1 ha ($0,021 \text{ km}^2$) para os machos adultos (Théry 1992), e considerando a dominância de um macho sobre outros três em cada leque (o que representa acentuado desvio no sucesso reprodutivo) se assumirmos que um quinto do N_e refere-se aos machos dominantes ($N_e = 20,4$), para manter estes leques de $20,4$ machos adultos é necessário uma área mínima de $42,84 \text{ Ha}$ ($0,4284 \text{ Km}^2$). Considerando que a distribuição dos leques não é aleatória, mas agrupada na paisagem (encontramos leques com distâncias de

2,5 km a 21 km lineares entre eles, onde leques não são encontrados, ou seja, sem indivíduos reprodutores por uma grande extensão do habitat) e nem todas as localidades suportam um leque (ex. fragmentos de 1 Ha e 10 Ha da Porto Alegre), a área do PDBFF comporta o o tamanho populacional efetivo estimado para *Dixiphia pipra*.

Dados ecológicos de frequência de captura e densidade populacional (Uriarte *et al.* 2011, Tabela 2) e o tamanho populacional efetivo (N_e) mostram que os fragmentos florestais de 100 Ha são aparentemente para os pássaros equivalentes a florestas contínuas, entretanto há uma menor taxa de migração nestes fragmentos florestais comparados com a floresta contínua, o que com um prazo maior certamente influenciará o tamanho populacional efetivo dos fragmentos florestais de 100 Ha.

Nos fragmentos de 10 Ha detectamos um maior tamanho populacional efetivo para a DIMONA. Este resultado pode ser explicado pela presença de leques nesta localidade, logo são necessários mais machos dominantes contribuindo para próxima geração. Na ausência de leques (fragmento florestal da Porto Alegre) o tamanho populacional efetivo é menor do que no mesmo tamanho de fragmento com leques. Nos fragmentos florestais de 1 Ha não há leque dentro dos fragmentos, porém pode haver leque nas proximidades, e o relacionamento (r) é significativo entre as fêmeas (indicando, junto com os dados de emigração e comportamento diferencial entre sexos, que elas devem nascer nestes fragmentos e não dispersar para outras localidades), e absoluto para relacionamento entre dois indivíduos de cada fragmento (possivelmente por serem áreas de nidificação). Nestes fragmentos o tamanho populacional efetivo foi similar as florestas fragmentadas de 100 Ha e provavelmente este resultado foi influenciado pela presença dos relacionamentos mencionadas acima (que reduziria o N_e) e fluxo unidirecional migração para o fragmento (que aumentaria o N_e), representando um balanço entre estes dois fatores .

Implicações para a conservação

Nossos resultados mostram que *Dixiphia pipra* apresentou sutilmente efeito negativo da fragmentação florestal. As alterações encontradas dizem respeito ao padrão de migração para fragmentos menores, indícios de alteração no tamanho populacional efetivo mesmo em fragmentos florestais de 100 Ha, em consequência da mudança em movimentação dos indivíduos. Os fragmentos de um hectare representam as alterações ecológicas (ausência de leque) e genéticas (relações de parentesco maiores entre as fêmeas), e os de dez hectares com aumento do tamanho populacional efetivo. *Dixiphia pipra* não está sob graves efeitos negativos da fragmentação florestal na paisagem do PDBFF (ex. elevado parentesco, baixa diversidade genética ou tamanho populacional efetivo em gargalo), porém estas alterações podem representar descaracterização comportamental da espécie, ou pelo menos flexibilidade comportamental. Por outro lado, estes resultados são válidos para um modelo planejado para estudar a fragmentação florestal. O experimento do PDBFF que apresenta algumas limitações como a falta de isolamento constante, o pequeno tamanho do isolamento, idade da borda e a proximidade dos fragmentos, que para alguns pássaros com dispersão limitada (ex. insetívoros, Stouffer e Bierregaard 1995) é suficiente para impedir dispersão e migração e para outros pássaros como *Dixiphia pipra* não impede a movimentação entre as localidades e seja suficiente apenas para alterar sutilmente os índices mensurados neste trabalho. Cabe ressaltar que os resultados refletem somente 30 anos de fragmentação, e com fraco isolamento, não tendo sido suficiente para observarem-se mudanças em alguns índices genéticos nesta espécie. Alguns índices, porém, como a taxa de migração, e tamanho populacional efetivo (refletidos ainda em algumas mudanças tênues em parentescos) parecem indicar efeitos associados a mudanças na dinâmica espacial dos indivíduos da espécie nas paisagens estudadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora. O projeto foi custeado pela FAPEAM (DCR 1/2006 e PPP 2008) e NSF a M.A., CNPq 554057/2006-9 e 575603/2008-9 a IPF e PPG-Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Ao PDBFF pelo apoio logístico. Ao SISBIO e CEMAVE pela concessão de licenças. A João Vitor Campos e Silva, Mariana Tolentino Bento da Silva e Jefferson Walsko pelas amostras do Cabo Frio e Km41. A Andrew Whittaker pelo apoio em campo. A Erik Johnson e Claudeir Ferreira Vargas pelo auxílio na localização dos leques. A Tomas Hrbek pelo auxílio com as análises.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Banks, S.C.; Piggott, M.P.; Stow, A.J.; Taylor, A.C. 2007. Sex and sociality in a disconnected world: a review of the impacts of habitat fragmentation on animal social interactions. *Canadian Journal of Zoology*, 85(10):1065-1079.
- Barnett, J.; Ruiz-Gutierrez, V.; Coulon, A.; Lovette, I. 2008. Weak genetic structuring indicates ongoing gene flow across White-ruffed Manakin (*Corapipo altera*) populations in a highly fragmented Costa Rica landscape. *Conservation Genetics*. 9:1403-1412.
- Berli, P.; Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98: 4563-4568.
- Boscolo, D.; Metzger, J.P. 2009. Is bird incidence in Atlantic forest fragments influenced by landscape patterns at multiple scales? *Landscape Ecology*, 24(7):907-918.

- Carlo, T. A.; Morales, J.M. 2008. Inequalities in fruitremoval and seed dispersal: consequences of bird behaviour, neighbourhood density and landscape aggregation. *Journal of Ecology* 96:609–618.
- Durães, R.; Loiselle, B.; Blake, J. 2007. Intersexual spatial relationships in a lekking species: blue-crowned manakins and female hot spots. *Behavioral Ecology*, 18:1029–1039.
- Durães, R.; Loiselle, B.; Parker, P.; Blake, J. 2009. Female mate choice across spatial scales: influence of lek and male attributes on mating success of blue-crowned manakins. *Society*. 276:1875-1881.
- DuVal, E. H. 2007. Adaptive advantages of cooperative courtship for subordinate male Lance-tailed Manakins. *American Naturalist* 169:423–432.
- Duval, E.; Kempenaers, B. 2008. Sexual selection in a lekking bird: the relative opportunity for selection by female choice and male competition. *Proc. R. Soc. B.*, 275:1995-2003.
- Excoffier, L., Smouse, P., Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479-491.
- Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 34:487–515.
- Ferraz, G.; Russell, G. J.; Stouffer, P. C.; Bierregaard Jr., R. O.; Pimm, S. L.; Lovejoy, T. E. 2003. Rates of species loss from Amazonian forest fragments. *PNAS*, 100(24):14069-14073.
- Francisco, M.; Gibbs, H.; Galetti, M.; Lunardi, V.; Galletti, P. 2007. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*. 16: 4908-4918.
- Francisco, M.; Gibbs, H.; Galletti, P. 2009. Patterns of individual relatedness at blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) leks. *Te Auk*, 126(1):47-53.

- Galbusera, P.; Githiru, M.; Lens, L.; Matthysen, E. 2004. Genetic equilibrium despite habitat fragmentation in an Afrotropical bird. *Molecular Ecology*, 13:1409-1421.
- Höglund, J.; Alatalo, R. V. 1995. Leks. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Laurance, W. F. 2006. Have we overstated the tropical biodiversity crisis? *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2): 65-70.
- Laurance, W. F.; Cochrane, M. A.; Bergen, S.; Fearnside, P. M.; Delamônica, P.; Barber, C.; D'Angelo, S.; Fernandes, T. 2001. The future of the Brazilian Amazon. *Science*, 291(5503): 438-439.
- Loiselle, B., Ryder, T., Durães, R., Tori, W., Blake, J., Parker, P., *et al.* 2007b. Kin selection does not explain male aggregation at leks of 4 manakin species. *Behavioral Ecology*, 18: 287-291.
- McDonald D. 2003. Microsatellite DNA evidence for gene flow in neotropical lek-mating long-tailed manakins. *The Condor*; 105:580-586.
- McDonald, D. B.; Potts, W.K. 1994. Cooperative display and relatedness among males in a lek-mating bird. *Science* 266:1030– 1032.
- Nascimento, H.; Andrade, A.; Camargo, J.; Laurance, W.; Laurance, S.; Ribeiro, J. 2006. Effects of the Surrounding Matrix on Tree Recruitment in Amazonian Forest Fragments. *Conservation Biology*, 20(3): 853-860.
- Pearce-Higgins, J.; Brace, R.; Hornbuckle, J. 2007. Survival of Band-tailed Manakins. *The Condor*. 109:167-172.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43 : 223-225.
- Ryder, T.; Parker, P.; Blake, J.; Loiselle, B. 2009. It takes two to tango: reproductive skew and social correlates of male mating success in a lek-breeding bird. *Proc. R. Soc. B.*, 276(1666):2377-2384.

- Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13(11):2498-504.
- Sick, H. Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1997.
- Silva, J.V.C.; Anciães, M. 2011. Aves de sub-bosque: ocupação e movimentação em uma paisagem fragmentada na Amazônia Central. Aceito para Acta Amazonica. Snow, D. 1961. The displays of the manakins *Pipra pipra* and *Tyrannetes virescens*. *IBIS*, 103A(1):110-113.
- Stouffer, P.C.; Bierregaard, R.O. 1995. Use of amazonian forest fragments by understory insectivorous birds. *Ecology*, 76:2429– 2445.
- Théry, M. 1992. The evolution of leks through female choice: differential clustering and space utilization in six sympatric manakins. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30: 227-237.
- Uriarte, M.; Anciães, M.; Siva, M.T.B.; Rubim, P.; Johnson, E.; Bruna, E. 2011. Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92 (4): 924-937.
- Uy, J.; Patricelli, G.; Borgia, G. 2000. Dynamic mate-searching tactic allows female satin bowerbirds *Ptilonorhynchus violaceus* to reduce searching. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 251-256.
- Van Houtan, K.; Pimm, S.; Halley, J.; Bierregaard, R.; Lovejoy, T. 2007. Dispersal of Amazonian birds in continuous and fragmented forest. *Ecology Letters*. 10:219-229.
- Wang, J. 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166: 1963-1979.

Wang, J. 2009. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology*, 18: 2148-2164.

Tabela 1 – Localidades amostradas, número de indivíduos coletados (Nc) e analisados (N), proporção de machos e fêmeas (Nma, Nf), tamanho populacional efetivo (Ne), diversidade alélica (Na) e equilíbrio de Hardy-Weinberg. Significância de p após correção de Bonferroni = $p < 0,00833$.

Localidade	Tamanho					Man6	Man13	Chir1_16	Chir3_22	Chir4_33	Lan22
	(Ha)	Nc	Nma, Nf	Ne							
POA	1	27	9, 9	26	N	18	18	18	17	18	18
					Na	5	8	9	6	8	17
					Ho	100.000	0.66667	0.66667	0.58824	0.55556	0.77778
					He	0.80000	0.75714	0.88413	0.70766	0.57778	0.94286
					p	0.55249	0.27756	0.01721	0.07466	0.22057	0.02599
POA	10	20	8, 10	40	N	18	17	18	18	18	18
					Na	8	9	10	7	8	13
					Ho	0.77778	0.52941	0.55556	0.61111	0.72222	0.66667
					He	0.80952	0.71301	0.87302	0.70952	0.63651	0.91429
					p	0.28039	0.23329	0.01592	0.09154	0.37105	0.02740
POA	100	30	17, 13	30	N	29	29	29	29	28	29
					Na	9	13	11	6	8	16
					Ho	0.82143	0.67857	0.64286	0.46429	0.64286	0.75000
					He	0.76429	0.80260	0.86364	0.72013	0.72987	0.92143
					p	0.80227	0.07321	0.03967	0.00457*	0.23082	0.00830*
DIMONA	1	14	10, 4	31	N	14	14	14	14	14	14
					Na	8	11	9	6	6	9
					Ho	0.64286	0.71429	0.57143	0.64286	0.21429	0.50000
					He	0.78836	0.84127	0.81217	0.75926	0.66931	0.88360
					p	0.11765	0.15868	0.00113*	0.08355	0.00000*	0.00176*
DIMONA	10	33	14, 7	63	N	21	21	21	21	20	21
					Na	8	11	12	6	6	15
					Ho	0.76190	0.47619	0.61905	0.38095	0.45000	0.80952
					He	0.81533	0.79326	0.88153	0.63647	0.60385	0.93612

					p	0.14061	0.00112*	0.00821*	0.01959	0.03308	0.00384*
DIMONA	100	45	15, 14	30	N	29	29	29	29	29	29
					Na	8	14	12	8	8	18
					Ho	0.79310	0.55172	0.72414	0.37931	0.68966	0.68966
					He	0.80218	0.82456	0.87296	0.67030	0.64428	0.93466
					p	0.18529	0.00022*	0.08225	0.00090*	0.85212	0.00000*
Km37	Floresta contínua	24	14, 2	45	N	16	16	16	15	16	15
					Na	5	11	12	8	4	14
					Ho	0.81250	0.43750	0.75000	0.46667	0.56250	0.66667
					He	0.79839	0.83266	0.92540	0.69425	0.46371	0.93563
					p	0.43178	0.00209*	0.20111	0.05049	100.000	0.01187
Km41	Floresta contínua	22	7, 9	25	N	16	16	16	16	17	16
					Na	5	12	10	6	4	14
					Ho	0.76471	0.76471	0.82353	0.35294	0.70588	0.82353
					He	0.76471	0.81640	0.86453	0.64884	0.63993	0.93583
					p	0.94034	0.59991	0.36707	0.00123*	0.93368	0.13712
Cabo Frio - FC	Floresta contínua	22	3, 7	145	N	10	10	10	10	10	7
					Na	5	9	8	5	5	9
					Ho	0.70000	0.50000	0.50000	0.30000	0.70000	0.71429
					He	0.78421	0.85789	0.86842	0.74211	0.83158	0.91209
					p	0.54706	0.00243*	0.01279	0.00104*	0.03175	0.13203
Cabo Frio - CP	Capoeira	60	5, 5	44	N	10	10	10	10	10	10
					Na	6	8	10	3	4	9
					Ho	0.70000	0.80000	0.60000	0.40000	0.50000	0.70000
					He	0.82105	0.85263	0.88947	0.46842	0.59474	0.89474
					p	0.19199	0.13498	0.01986	100.000	0.28117	0.01770

Tabela 2 – Análise de variância molecular entre e dentro das populações.

Fonte da variância	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	0.01487	0.64
Dentro das populações	2.32389	99.36

Tabela 3 – Matriz de migrantes do Migrate. Valores acima da diagonal correspondem ao número de imigrantes enquanto os valores abaixo da diagonal correspondem ao número de emigrantes.

	Teta	POA 1 Ha	POA 10 Ha	POA 100 Ha	Dimona 1 Ha	Dimona 10 Ha	Dimona 100 Ha	Km37	Km41	CF-FC	CF-CP
POA 1 Ha	3,6294	*	19,5079	8,1661	26,5852	20,0705	12,9932	19,4353	13,8279	14,7716	15,8967
POA 10 Ha	3,9362	11,6904	*	12,2415	9,0926	16,8074	8,0691	7,4984	13,2059	13,7766	5,8059
POA 100 Ha	0,8142	1,7831	2,2635	*	1,0259	0,7328	4,0263	1,7709	1,4493	1,4778	1,4086
Dimona 1 Ha	4,7958	16,6175	20,2623	33,2589	*	27,3121	42,4429	22,7561	28,3672	16,3777	11,9176
Dimona 10 Ha	4,2728	15,7667	15,2753	14,6344	19,6763	*	24,7823	12,9680	14,8053	8,0542	15,3394
Dimona 100 Ha	0,1039	0,2353	0,3408	0,4384	0,1247	0,2338	*	0,2000	0,2182	0,1704	0,2935
Km37	5,1063	15,1912	11,9487	28,2633	34,0844	32,3483	22,7485	*	21,2421	22,6719	29,8717
Km41	7,2591	44,8249	35,9325	28,0564	28,5282	31,6133	30,6697	19,7084	*	23,1565	26,4957
CF-FC	3,1413	19,4759	15,9577	35,2609	18,3922	17,2927	14,0572	35,7478	10,9945	*	13,6646
CF-CP	1,5914	7,3999	18,0224	11,3704	11,4022	5,5619	11,2670	11,5136	4,6627	4,7184	*

Tabela 4 – Matriz de migrantes do Arlequin por classe de sexo.

	POA 1 Ha	POA 10 Ha	POA 100 Ha	Dimona 1 Ha	Dimona 10 Ha	Dimona 100 Ha	Km37	Km41	CF-FC	CF-CP
POA 1 Ha	*	inf	14.497738	57.7994	15.92522	33.97690	18.54545	inf	16.01486	26.44172
POA 10 Ha	inf	*	inf	6.60482	74.83894	inf	6.80851	23.37768	20.38148	65.95300
POA 100 Ha	49.30525	inf	*	13.11556	19.20079	30.43429	12.26667	12.27982	41.04492	12.98612
Dimona 1 Ha	inf	72.97890	28.55763	*	5.80180	4.47286	5.39535	5.54737	5.38365	4.65853
Dimona 10 Ha	39.28682	inf	94.52734	22.17837	*	17.01558	7.32756	26.36816	17.02809	85.09479
Dimona 100 Ha	inf	98.41465	41.23035	68.16151	40.78891	*	8.49124	25.74685	120.36364	30.00838
Km37	61.70874	24.25434	17.68529	26.72037	58.47368	inf	*	14.53104	6.33928	7.67921
Km41	502.00633	inf	28.00000	27.68650	51.47991	134.68085	inf	*	11.65764	inf
CF-FC	60.63158	466.59459	inf	inf	inf	inf	inf	23.02294	*	17.67273
CF-CP	16.91279	25.09328	18.25593	8.32640	47.66370	42.78502	inf	inf	20.66667	*

Valores acima do asterisco corresponde a migração de fêmeas, abaixo de machos. Inf = infinito

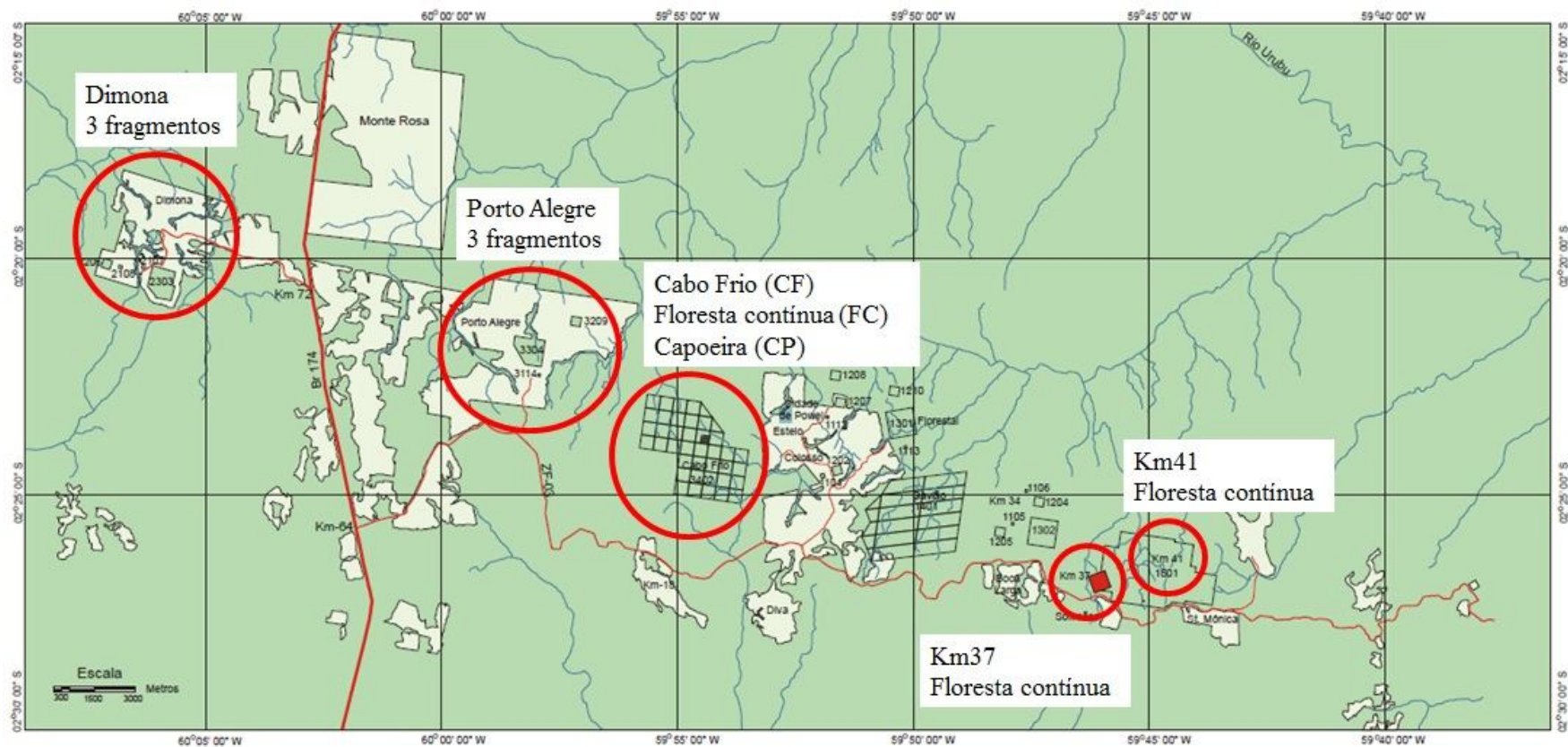


Figura 1 – Mapa do Projeto Dinamica Biologica de Fragmentos Florestais (PDBFF) elaborado por Venticinque, E. M. e Fernandes, T. L. N. em 1998. Adaptado por Jaqueline Fortuna em 2011. Os circulos vermelhos representam as areas de coleta dentro da area total do PDBFF. No amostragem da Dimona e Porto Alegre foram utilizados fragmentos florestais de 1, 10 e 100 Ha de cada localidade.

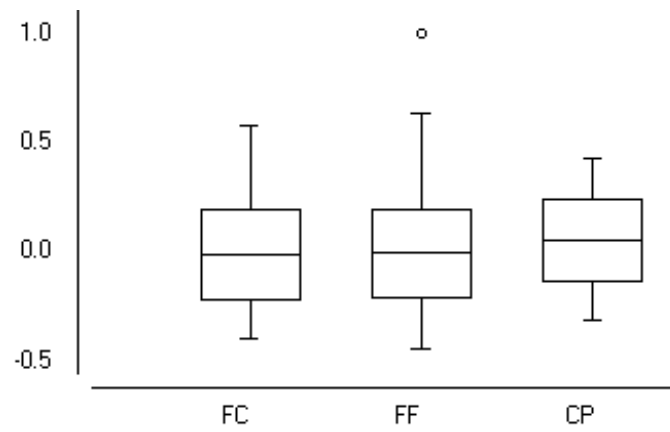
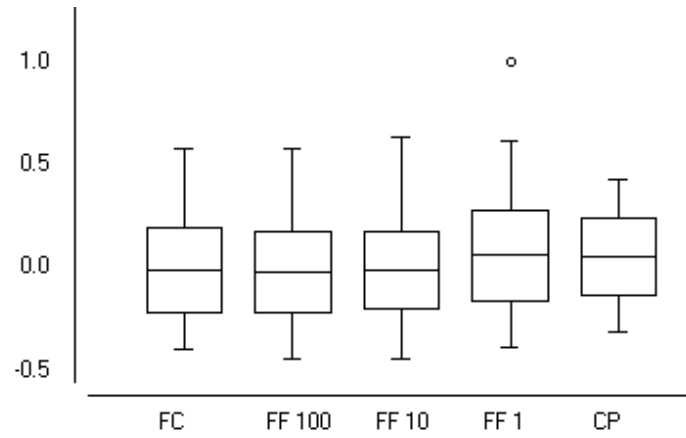


Figura 2 – Média dos valores pareados de relacionamento de todos os indivíduos (machos e fêmeas). (a) por localidade: (FC) floresta contínua, (FF 100) floresta fragmentada de 100 Ha, (FF 10) floresta fragmentada de 10 Ha, (FF 1) floresta fragmentada de 1 Ha, (CP) capoeira e (b) por paisagem: (FC) floresta contínua, (FF) floresta fragmentada e (CP) capoeira.

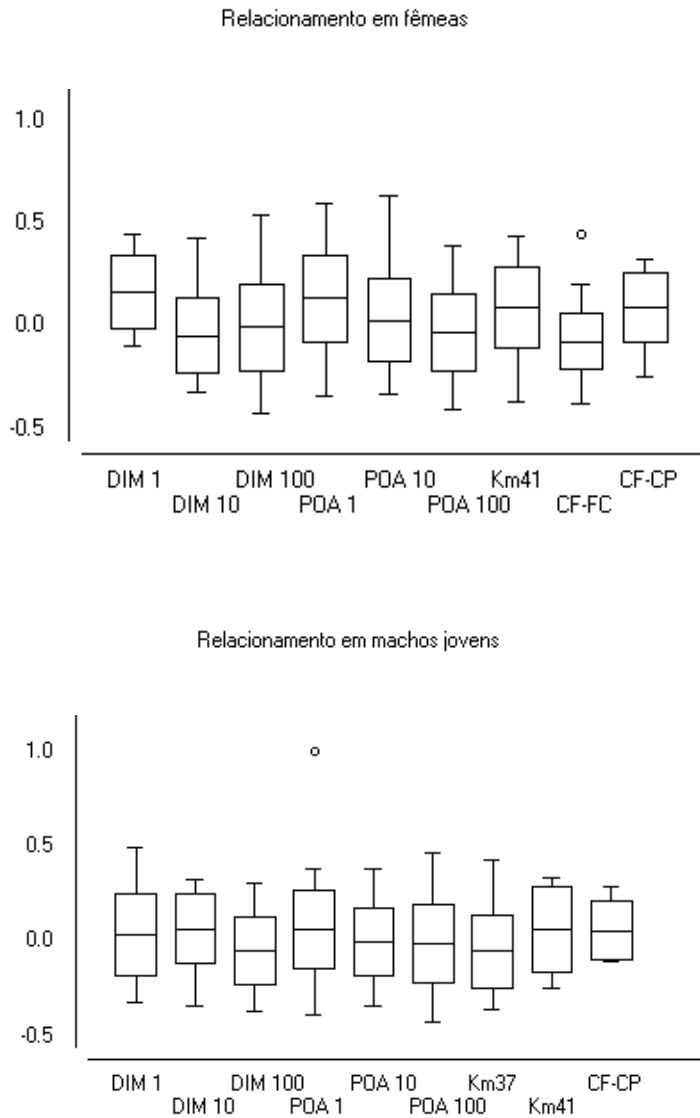


Figura 3 – Média dos valores pareados de relacionamento entre fêmeas (acima) e machos jovens (abaixo) por localidade. (CF-FC) Cabo Frio – Floresta Contínua, (CF-CP) Cabo Frio – Capoeira, DIM 1 (DIMONA 1 Ha), DIM 10 (DIMONA 10 Ha), DIM 100 (DIMONA 100 Ha), POA 1 (Porto Alegre 1 Ha), POA 100 (Porto Alegre 100 Ha).

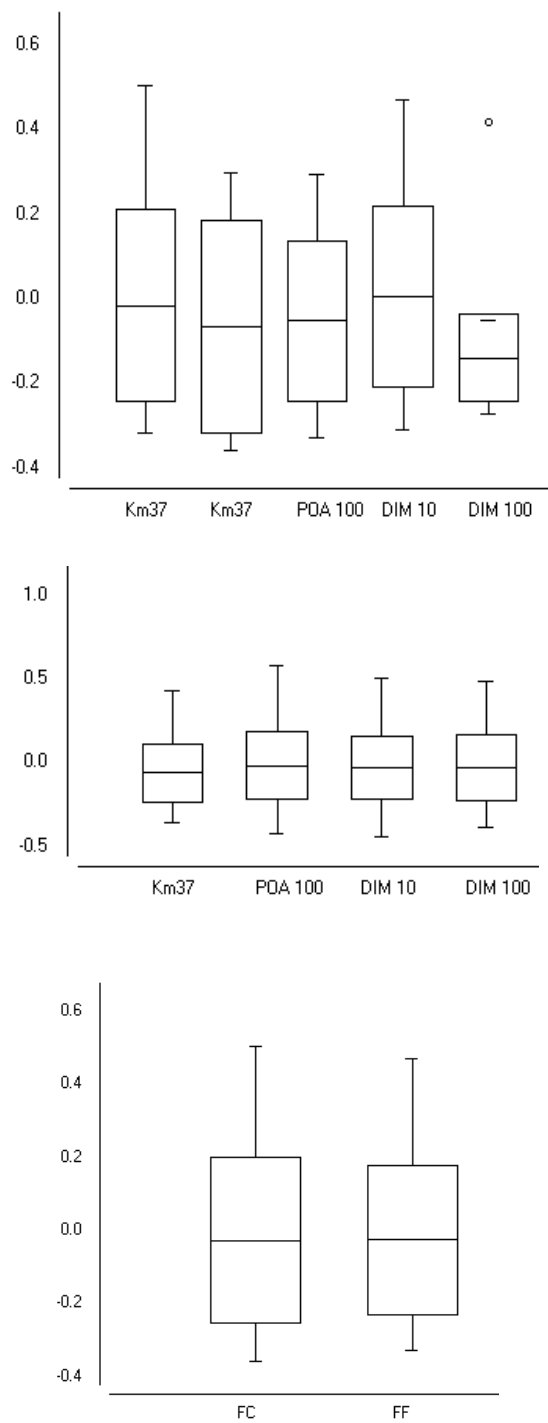


Figura 4 – Média de valores pareados relacionamento entre machos (a) dentro do leque, (b) todos os machos das localidades onde foram registrados leques, (c) dentro dos leques em cada paisagem: (FC) floresta contínua e (FF) floresta fragmentada.

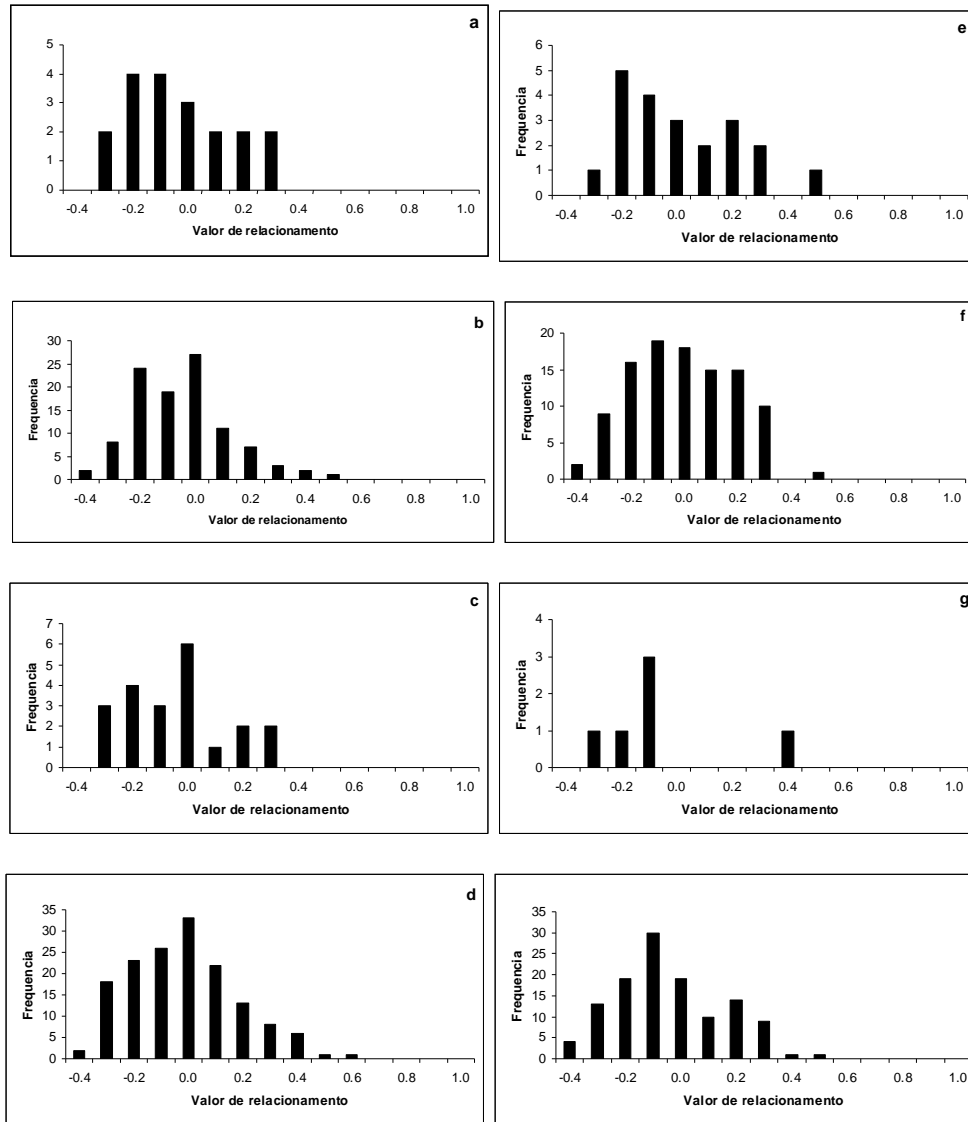


Figura 5 - Histograma de freqüência dos valores pareados de relacionamento entre machos de leques e entre todos os indivíduos amostrados por localidade, respectivamente: Km37 (a) e (b); (c) e (d) Porto Alegre – 100 Ha, (e) e (f) DIMONA – 10 Ha e (g) e (h) DIMONA 100 Ha.

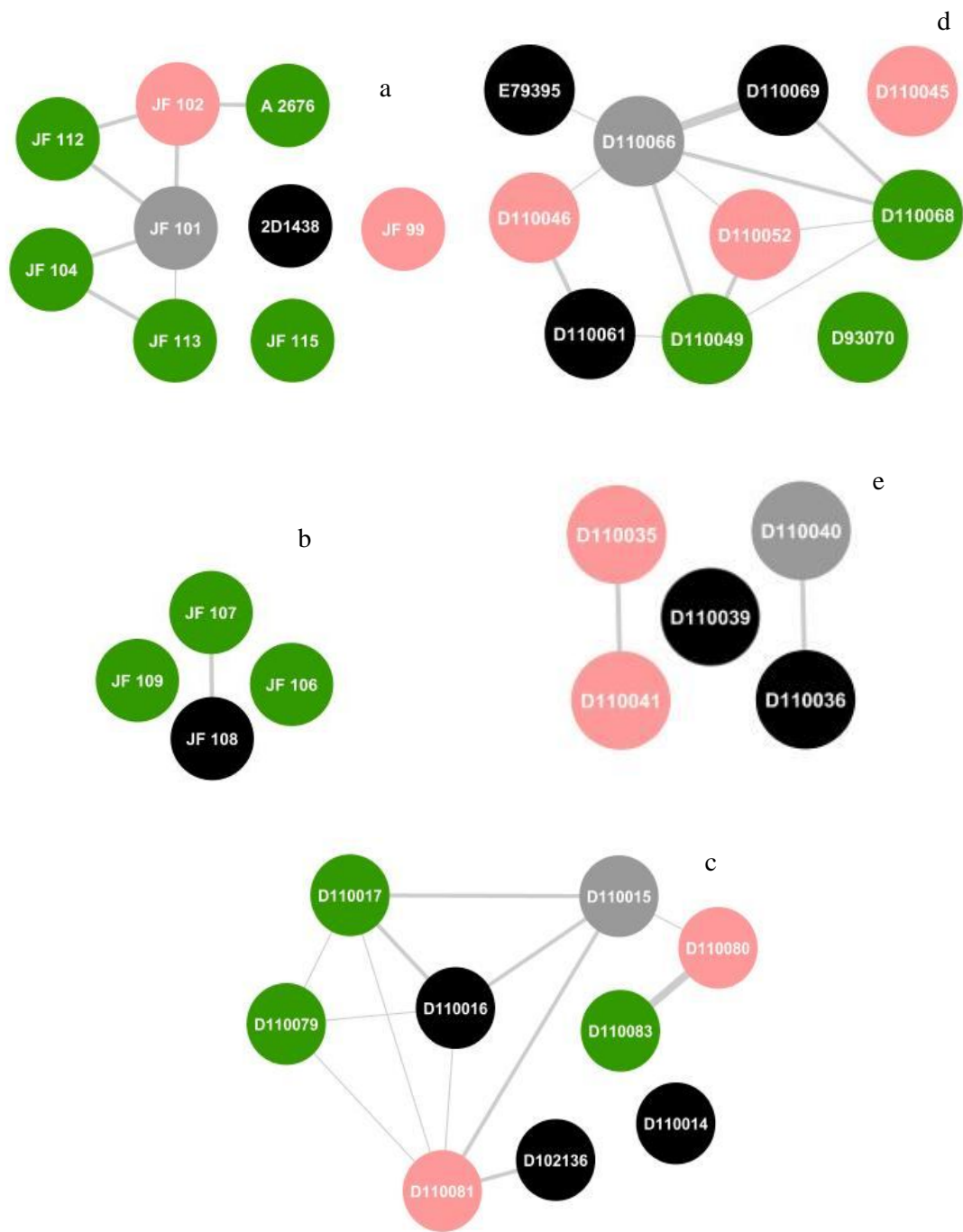


Figura 6 - Network dos valores pareados de relacionamento de machos nos leques e fêmeas transeuntes capturadas no leque. Círculo preto: machos adultos, círculo cinza: macho sub-adulto, círculo verde: macho com plumagem juvenil, rosa: fêmea; linhas conectivas finas: primos, linhas conectivas médias: meio-irmãos, linhas conectivas grossas: irmãos verdadeiros. Numerações dentro dos círculos representa número de coleta de sangue ou anilha metálica (a) e (b) Km 37, (c) Porto Alegre – 100 Ha, (d) DIMONA – 10 Ha e (e) DIMONA 100 Ha.

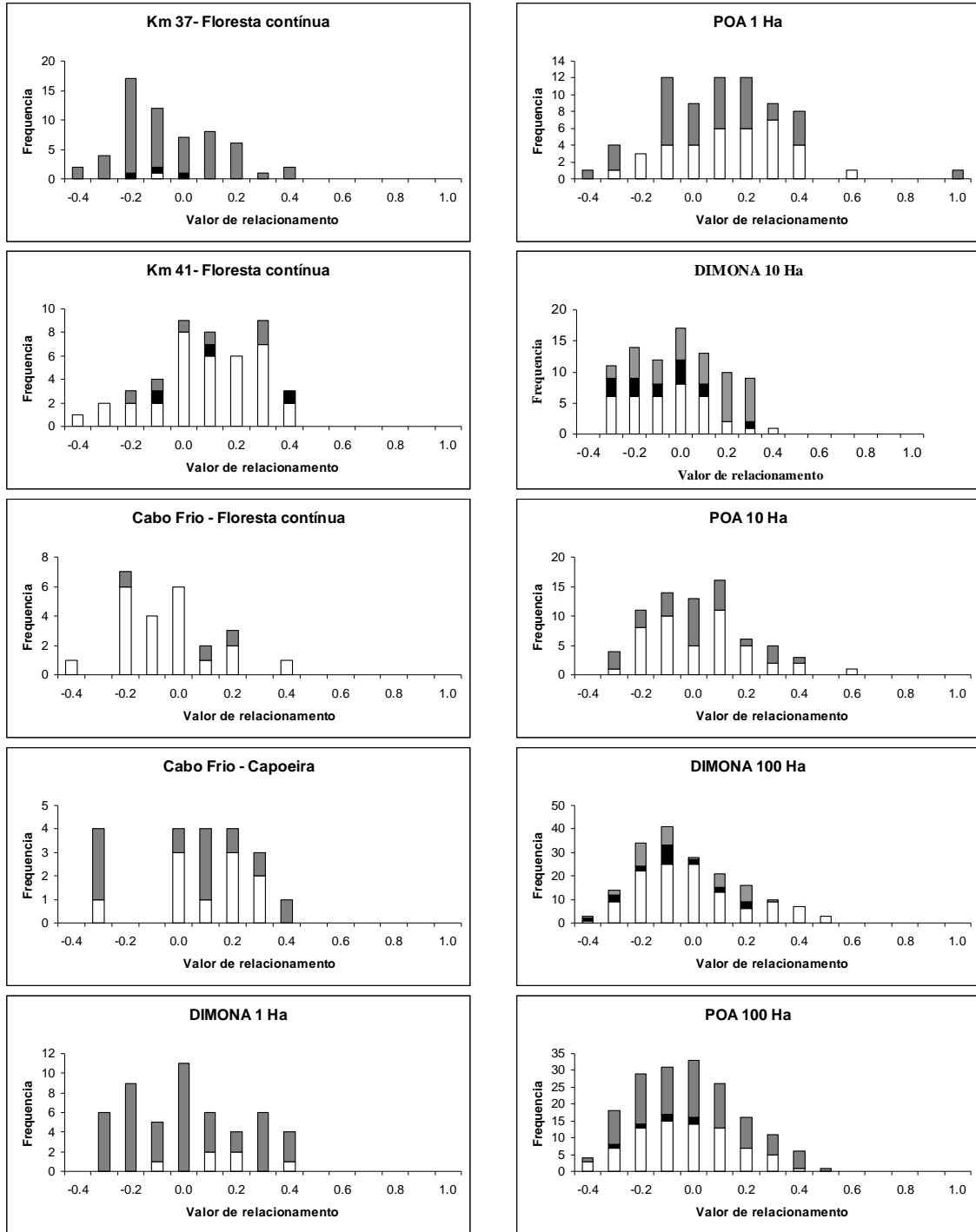


Figura 7 - Histograma de freqüência dos valores pareados de relacionamento de machos adultos (barra preta), machos com plumagem juvenil (barra cinza) e fêmeas (barra branca) por localidades.

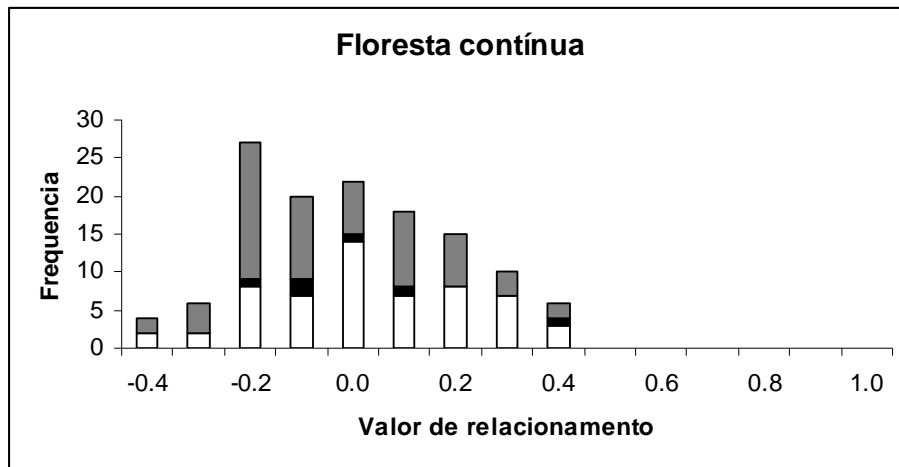
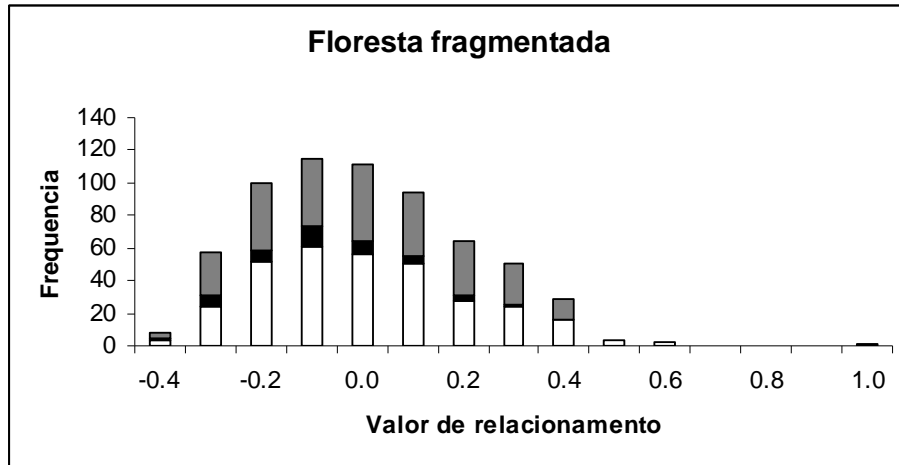


Figura 8 - Histograma de frequência dos valores pareados de relacionamento adultos (barra preta), machos com plumagem juvenil (barra cinza) e fêmeas (barra branca) por tipo de paisagem.

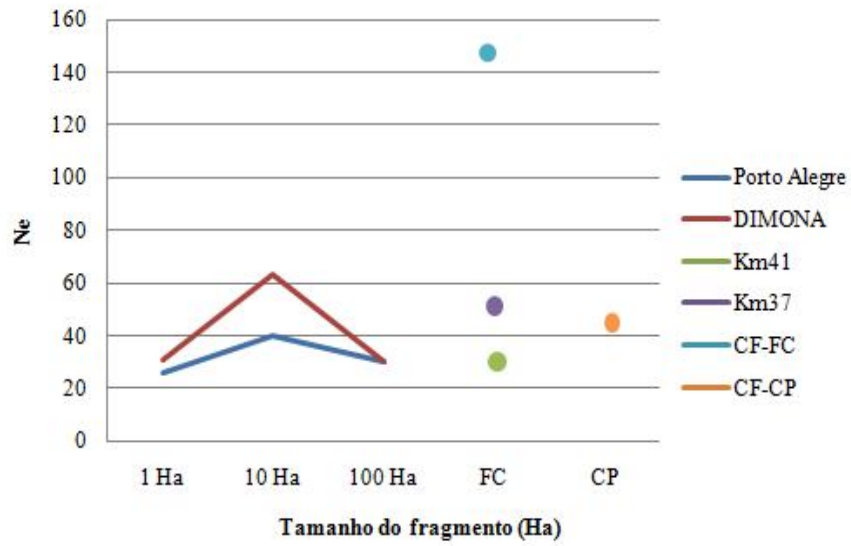


Figura 9 – Tamanho populacional efetivo para a paisagem contínua e fragmentada.

3 SÍNTESE

A amplificação cruzada de marcadores microssatélites para *Dixiphia pipra* foi satisfatória e seis marcadores foram utilizados para responder a perguntas de efeito da fragmentação florestal sobre a dinâmica de leques e da paisagem.

Obtivemos uma única população com intenso fluxo gênico pela análise Bayesiana e de migrantes, sendo a maior migração de machos com plumagem verde, provavelmente pelo comportamento de dispersão pós-natal. O relacionamento de machos de leques de paisagens fragmentadas foi igual ao de paisagens contínuas, o que mostra a manutenção da falta de relacionamento no sistema de leques mesmo em paisagem fragmentada. O relacionamento total de indivíduos mostrou uma média levemente maior para florestas fragmentadas de 1 Ha. Apesar de não significativo, duas associações de $r=1$ nos dois fragmentos florestais de 1 Ha indicam que estas áreas estão sendo utilizadas pelas fêmeas para nidificação. Mostramos as relações de parentesco dentro de cada leque e embora a maioria dos indivíduos apresente algum relacionamento, tanto em floresta contínua como fragmentada, machos adultos do mesmo leque não são relacionados. Obtivemos tamanho populacional efetivo diferentes para cada localidade e o valor de 102 indivíduos para o total da paisagem. Concluímos que a fragmentação florestal recente causou mudanças sutis nos índices mensurados.