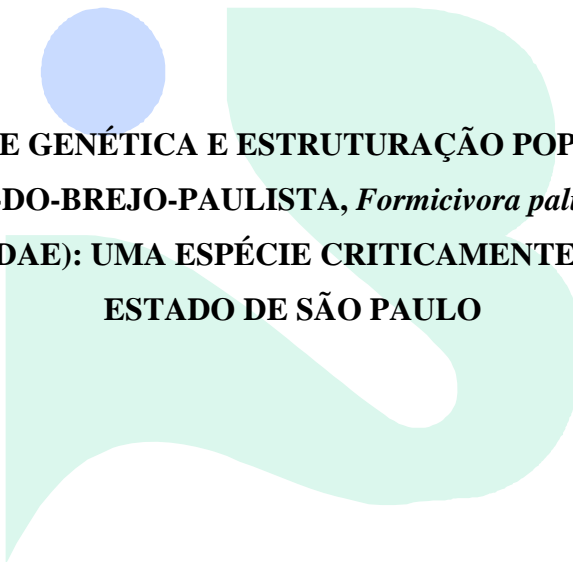


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)**

CRISLEY DE CAMARGO



**VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DO
BICUDINHO-DO-BREJO-PAULISTA, *Formicivora paludicola* (AVES:
THAMNOPHILIDAE): UMA ESPÉCIE CRITICAMENTE AMEAÇADA DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

BOTUCATU

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)**

CRISLEY DE CAMARGO

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DO
BICUDINHO-DO-BREJO-PAULISTA, *Formicivora paludicola* (AVES:
THAMNOPHILIDAE): UMA ESPÉCIE CRITICAMENTE AMEAÇADA DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko
Coorientadores: Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco e Prof. Dr. Luís Fábio Silveira

BOTUCATU

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Camargo, Crisley de.

Variabilidade genética e estruturação populacional do
Bicudinho-do-brejo-paulista, *Formicivora paludicola* (Aves: *Thamnophilidae*) :
uma espécie criticamente ameaçada do Estado de São Paulo / Crisley de
Camargo. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Botucatu

Orientador: Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Mercival Roberto Francisco

Coorientador: Luís Fábio Silveira

Capes: 20204000

1. Ave - População. 2. Ecologia. 3. Genética animal. 4. Conservação
biológica.

Palavras-chave: *Formicivora paludicola*; Genética da conservação;
Microssatélites; Passeriformes; RAD-seq.

CRISLEY DE CAMARGO

**Variabilidade Genética e Estruturação Populacional do Bicudinho-do-brejo-paulista,
Formicivora paludicola (Aves: *Thamnophilidae*): uma espécie criticamente ameaçada do
Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Coorientadores: Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco e Prof. Dr. Luís Fábio Silveira

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko (orientador)

Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP

Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

Departamento de Genética e Biologia Reprodutiva, Instituto de Biociências, USP

Dr. Ricardo Belmonte-Lopes

Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Botucatu, 23 de Abril de 2014.

“Assim como os pássaros, precisamos aprender a superar os desafios que nos são apresentados, para alçar voos mais altos.”

Dirk Wolter

“Devemos fazer: da interrupção, um novo caminho; da queda, um passo de dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte; e da procura, um encontro.”

Fernando Sabino

*À minha família, o pilar da minha existência.
Sobretudo aos meus pais, Benedito e Leila, os
responsáveis por me ensinar os valores e
princípios da vida.*

*Ao meu irmão, Douglas, por ser minha fonte
de admiração e inspiração.
Sem eles, eu nada seria.*

*Ao meu amor, Gustavo, meu porto seguro e
exemplo de vida, a quem admiro muito.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível por ter pessoas que estavam sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando a superar os desafios. Gostaria de agradecer a todos que, de alguma maneira, contribuíram com a realização desta Dissertação. Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar esta oportunidade e por estar comigo ao longo de minha vida.

Agradeço aos meus orientadores:

À Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko, por aceitar ser minha orientadora, mesmo eu estando distante e não estando presente todos os dias em seu laboratório. Muito obrigada pela oportunidade, por confiar em meu trabalho, pelas sugestões, conversas, pela amizade, suporte e inúmeras contribuições teórico-científicas fornecidas ao longo do desenvolvimento desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco, pelos ensinamentos e puxões de orelha ao longo de quase quatro anos trabalhando juntos, também pela amizade, confiança e pelo auxílio, tanto na parte teórico-científica, quanto na parte de laboratório e campo. Sobretudo, obrigada por me mostrar a importância das atividades de campo em um trabalho de Conservação.

Ao Prof. Dr. Luís Fábio Silveira, pelas contribuições importantes ao longo do trabalho e para os futuros artigos científicos, e por ser um dos pesquisadores a descobrir a espécie de estudo.

Ao Prof. Lisle Gibbs, da *Ohio State University*, por me aceitar para a realização do estágio em seu laboratório, pela atitude acolhedora durante este período. Obrigada pelos preciosos ensinamentos em tão pouco tempo, que foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

Agradeço também a pessoas especiais para mim que foram de extrema importância ao longo destes dois anos:

À minha companheira de laboratório e amiga Mariellen Cristine Costa, por toda a colaboração e conversas nas nossas longas esperas para realizar os procedimentos no laboratório, pelas discussões e piadas em todos os momentos. Agradeço por tudo o que fez e por toda ajuda, não apenas no trabalho de bancada e nas coletas de campo, mas em cada etapa da realização deste trabalho. Foi uma peça imprescindível para completar este quebra-cabeça. Espero poder retribuir de alguma maneira, à altura, algum dia.

Aos meus pais, Benedito e Leila, por suportarem o mau humor de alguns dias de estresse. Por me incentivarem sempre a continuar o trabalho, superando os obstáculos e desafios. Obrigada pelos conselhos e críticas e, principalmente, pelo suporte e amor sempre. Especialmente ao meu pai, que mesmo aposentado, abdicou dos momentos de sossego para se tornar um “biólogo” e me acompanhar em todas as Campanhas para coletar amostras de Bicudinho. Muito obrigada por ter sido meu PAI, com todas as letras, e por ter enfrentado este desafio junto comigo.

Ao meu namorado e companheiro Gustavo Henrique Rodrigues Pinto Tomas. Não tenho palavras para descrever sua importância no desenvolvimento desta Dissertação. Muito obrigada por ter caminhado nessa estrada ao meu lado, não me deixando fraquejar nem desistir. Por aturar alguns momentos de nervosismo e ansiedade, pelos conselhos profissionais e acadêmicos. Agradeço, também, por ter acompanhado uma Campanha a Salesópolis em meio às suas (primeiras) férias.

Às minhas grandes amigas, Carla Tamie Hayashida e Juliana Trotta pela amizade preciosa que, mesmo com a distância e as poucas oportunidades de nos vermos, continua forte e consolidada, cada dia mais. Obrigada pelas longas conversas e conselhos, por serem minhas amigas e estarem comigo sempre. Um agradecimento especial à Carla que, nas suas férias do trabalho, me acompanhou para coletar amostras de Bicudinhos em Mogi das Cruzes.

À Glaucia Cristina Del Rio, aluna da Universidade de São Paulo, também pesquisadora do Bicudinho, que me ensinou tudo o que sei com relação ao brejo. Muito obrigada por ter tido paciência de me mostrar que o brejo não é tão assustador quanto pensava, por me deixar acompanhar algumas campanhas relacionadas ao seu projeto, por coletar algumas amostras e por também me acompanhar em uma campanha. Aprendi muito com você.

À Natasha Marcili Laganaro e Paulo Roberto Ramos de Oliveira Júnior, pela ajuda de campo na primeira campanha em Mogi das Cruzes, e pela amizade construída ao longo dos seus Mestrados no Laboratório de Genética Molecular de Aves Ameaçadas.

Aos alunos de graduação da UFSCar Sorocaba, Aline Pessutti Rampini e Douglas Nazareth Rivera, e da PUC Sorocaba, André Cid Fernandes Arruda Santos, pela imensa ajuda nas Campanhas em campo.

Agradeço também aos colegas de laboratório da *Ohio State University*, Anthony Fries e Michael Sovic, por me ensinarem os procedimentos para isolar os marcadores, pelas discussões e pela grande ajuda fornecida quando eu estava nos Estados Unidos. E, também,

ao técnico do laboratório Jose Diaz, por todo o suporte técnico nos procedimentos de laboratório, pelas conversas em espanhol e pelo auxílio ao longo dos três meses de estágio.

Ao ICMBio, por conceder a Autorização para coleta das amostras biológicas de aves em campo (Autorização para atividades com finalidade científica N° 36562-1 e N° 36562-2). Ao IBAMA, por conceder a Licença de Exportação (N° 13BR010074/DF) para o envio das amostras ao exterior.

Ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP) e ao Laboratório de Diversidade Molecular e Sequenciamento (Departamento de Microbiologia-Imunologia, IBB/UNESP) pela genotipagem em sequenciador automático dos indivíduos. Ao Dr. Travis Glenn, da *University of Georgia*, e a Dra. Pearly John, da *Ohio State Univeristy*, pelo sequenciamento de nova geração para desenvolvimento dos marcadores moleculares.

À Débora e ao Milton, da Pousada da Barragem Ponte Nova pertencente ao Departamento Autônomo de Água e Esgoto (DAAE) de São Paulo, pela disponibilidade da pousada para a nossa hospedagem quando estávamos realizando as campanhas.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP) e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *Campus Sorocaba*, pelo apoio ao projeto e por permitir usar suas dependências para o desenvolvimento do trabalho. E a *Ohio State University* pelo apoio financeiro aos procedimentos do projeto no período do estágio.

À FAPESP pela concessão das Bolsas de Mestrado (Proc. 2012/09105-7) e de Estágio Pesquisa no Exterior (BEPE, Proc. 2013/01602-4). E a CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado nos primeiros quatro meses de meu trabalho.

RESUMO

CAMARGO, C. **Variabilidade Genética e Estruturação Populacional do Bicudinho-do-brejo-paulista, *Formicivora paludicola* (Aves: *Thamnophilidae*): uma espécie criticamente ameaçada do Estado de São Paulo.** 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

Populações pequenas são mais susceptíveis aos efeitos causados por deriva genética e endocruzamento o que, geralmente, está associado à perda de variabilidade genética. Baixos níveis de diversidade genética podem resultar em drásticas consequências nos indivíduos, como alterações nas taxas de fertilidade e capacidade de se adaptar a mudanças ambientais. Embora estes fatores possam elevar o risco de extinção, o fluxo gênico pode balancear estes efeitos, mantendo a variabilidade genética e diminuindo a divergência entre populações. Deste modo, conhecer as características genéticas intra e interpopulacionais é essencial quando se trata da conservação de espécies ameaçadas. Marcadores moleculares, como microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), são importantes ferramentas para acessar níveis de variabilidade genética e padrões de fluxo gênico em populações e vêm sendo amplamente utilizados em espécies alvo de programas de conservação. O bicudinho-do-brejo-paulista (*Formicivora paludicola*) é uma pequena ave restrita a brejos da Mata Atlântica que foi recentemente descrita na região metropolitana da cidade de São Paulo. Ocorre em 15 localidades isoladas situadas nas bacias do Alto Tietê e do rio Paraíba do Sul e, especialmente devido à destruição do seu hábitat, já está classificada como “Criticamente em Perigo” no estado de São Paulo. Ações prioritárias para a conservação da espécie incluem estudos genéticos para estabelecer o monitoramento e o manejo das populações naturais. Visto isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de variabilidade genética e os padrões de fluxo gênico de duas populações de bicudinho-do-brejo-paulista, visando fornecer subsídios para futuras estratégias de conservação a serem desenvolvidas para a espécie. Para tanto, foram analisados 9 *loci* de microssatélites espécie-específicos e 8 *loci* adicionais heterólogos, além de 1.227 *loci* de SNPs, desenvolvidos por meio do método de RAD-seq (*Restriction-site Associated DNA sequencing*). No total, 44 animais foram coletados em duas áreas de brejos existentes próximas às cidades de Mogi das Cruzes (MC) ($N = 26$) e Salesópolis (SL) ($N = 18$), ambas situadas na bacia do Alto Tietê. Os resultados obtidos indicaram que ambas as populações estão em equilíbrio, não havendo déficit significativo de heterozigotos em MC ($P = 0,050$) nem em SL ($P = 0,665$). Também não foi detectada a ocorrência de endocruzamento nas populações (MC: $F_{IS} = 0,019$, $P = 0,238$; SL: $F_{IS} = -0,000$,

$P = 0,484$). As heterozigosidades esperada (H_E) e observada (H_O) médias foram 0,69 e 0,68, respectivamente, e a riqueza alélica média foi de 5,14 alelos. As riquezas alélicas entre as populações não diferiram significativamente ($t = 1,615$; $P = 0,117$), fato que pode estar correlacionado a uma grande perda de alelos em MC decorrente de um gargalo populacional. Foi detectada uma forte estruturação genética entre as duas populações ($F_{ST} = 0,10$; $P < 0,0001$) e análises Bayesianas determinaram $K = 2$ como o número de populações. Os níveis de diferenciação genética encontrados podem ser explicados pela distância entre suas áreas de ocorrência (cerca de 30 km), existência de um reservatório artificial entre elas e características comportamentais de *F. paludicola*, que não voa longas distâncias. Apesar disso, foram detectados indivíduos migrantes de primeira geração nas duas populações, o que demonstra a ocorrência de fluxo gênico entre diferentes áreas de distribuição da espécie. Adicionalmente, os marcadores microssatélites também possibilitaram detectar a ocorrência de um provável animal triplóide na região de Salesópolis. Os resultados obtidos indicam que a manutenção da variabilidade genética em *F. paludicola* esteja sendo realizada por meio de uma dinâmica metapopulacional entre cada população e áreas menores ao redor destas. Portanto, pode-se sugerir, como ação prioritária para a conservação da espécie, a proteção das duas áreas estudadas – Mogi das Cruzes e Salesópolis – e também das áreas menores ao redor destas, visando a manutenção da viabilidade das populações em longo prazo.

Palavras-chave: Genética da Conservação; bicudinho-do-brejo-paulista; microssatélites; RAD-seq; Passeriformes; *Formicivora paludicola*.

ABSTRACT

CAMARGO, C. **Genetic variability and population structure of the São Paulo Marsh Antwren, *Formicivora paludicola* (Aves: Thamnophilidae): a critically endangered species from São Paulo State.** 2014. 106 p. Thesis (Master) – Biosciences Institute of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

Small populations are more susceptible to genetic drift and inbreeding effects which, generally, can be associated to loss of genetic variability. Low levels of genetic diversity can result in severe effects in the individuals, as fertility alterations and capability of adaption to environmental changes. Although these factors can, in turn, increase the risk of extinction, gene flow may balance these effects, maintaining the genetic variability and reducing genetic divergences among populations. Therefore, it is essential to understand intra and inter population genetic data, in order to conserve threatened species. Molecular markers, such as microsatellites and SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), are reliable tools for assessing levels of genetic variability and patterns of gene flow in populations and have been widely used to analyze target species on conservation programs. The São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*) is a small bird restricted to marshes of Atlantic Forest that was recently described in the metropolitan region of São Paulo city. It occurs in 15 isolated localities spread on High Tietê and Paraíba do Sul River basins and, especially due to its habitat destruction, it is already considered as "Critically Endangered" in São Paulo State. Priorities actions for this species' conservation include genetic studies to establish the monitoring and management of natural populations. Therefore, the present study aimed to evaluate the genetic variability levels and the gene flow patterns of two populations of *F. paludicola* in order to support future conservation strategies for the species. As so, we analyzed 9 species-specific microsatellite loci and 8 additional heterologous loci, and also 1.227 SNPs loci that were developed by a RAD-seq (*Restriction-site Associated DNA sequencing*) approach. A total of 44 animals were collected in two marsh areas near Mogi das Cruzes city (MC) ($N = 26$) and Salesópolis city (SL) ($N = 18$), both located on High Tietê River Basin. The obtained results showed that both populations are in equilibrium, with no significant heterozygous deficit either in MC ($P = 0,050$) or in SL ($P = 0.665$). Also, there was no inbreeding detected in neither population (MC: $F_{IS} = 0.019$, $P = 0.238$; SL: $F_{IS} = -0.000$, $P = 0.484$). The average of expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosities were 0.69 and 0.68, respectively, and the average allelic richness was 5.14 alleles. Differences in allelic richness between populations were not significant ($t = 1.615$; $P = 0.117$), a fact that can

be correlated to a high allele loss in MC due to a bottleneck effect. A remarkable genetic structure was detected between both populations ($F_{ST} = 0.10$; $P < 0.0001$) and Bayesian analyses defined $K = 2$ as the number of clusters. The levels of genetic differentiation are possible due to the distance between MC and SL areas (around 30 km), the existence of an artificial reservoir between these regions, and behavioral aspects of *F. paludicola*, that cannot fly over a long distance. Nevertheless, first generation migrants were detected in both populations, which indicates that there is gene flow among different areas of the species distribution. Additionally, the microsatellite markers also permitted the identification of a putative triploid animal in the Salesópolis region. The obtained data indicate that the maintenance of the genetic variability in *F. paludicola* should be performed by a metapopulational dynamics inside each population and among smaller areas around them. Therefore, it is proper to propose, as a priority for the species conservation, the protection of both analyzed areas – Mogi das Cruzes and Salesópolis marshes – and also the smaller areas around them, in order to maintain the long-term population viability.

Keywords: Conservation Genetics; São Paulo marsh antwren; microsatellites; SNPs; Passeriformes; *Formicivora paludicola*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

(Introdução e Materiais e Métodos)

- Figura 1** – Mecanismo de deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA. Fonte: Modificado de Ellegren (2004)..... 24
- Figura 2** – (A) Mapas do estado de São Paulo indicando as localidades de ocorrência de *Formicivora paludicola*. Maiores localidades estão circuladas (vermelho: Mogi das Cruzes; verde: Salesópolis; azul: São José dos Campos). Fonte: Buzzetti et al. (2013). (B) Indivíduos de bicudinho-do-brejo-paulista: Macho (esquerda) e Fêmea (direita). Foto: Camargo, B. R. (2013)..... 29
- Figura 3** – Mapa do estado de São Paulo evidenciando a localização das áreas de estudo. MC: Mogi das Cruzes; SL: Salesópolis. A coloração azul escura representa corpos d’água. Organizado por: Costa, M. C. (2014). 32
- Figura 4** – (A) Rede de neblina utilizada na captura das aves; (B) indivíduo de *F. paludicola* anilhado com anilhas plásticas coloridas na área de Salesópolis; (C) coleta e (D) armazenamento do sangue em campo. Fotos: Camargo, B. R. (2013)..... 34
- Figura 5** – Dados dos adaptadores que foram ligados aos fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição. Fonte: Traduzido do protocolo de RAD-seq utilizado pelo *Gibbs Laboratory, Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, OSU, Columbus-OH, EUA*. 41
- Figura 6** – Gel de agarose 1% evidenciando amostras de DNA resultantes das etapas de digestão e ligação (1 a 7). (L) marcador de peso molecular conhecido. (RH300 e RH450): bandas guias resultantes das PCRs com os *primers* de DNAm de *Aythya americana*..... 44
- Figura 7** – Procedimentos para o corte do gel para a seleção de tamanho dos fragmentos de DNA. Os procedimentos foram seguidos para cada uma das amostras utilizadas. (A), (B), (C), (D), (E) e (F) vista frontal do gel. (G) e (H) vista lateral do gel. 44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

(Capítulos 1 a 4)

Figure 2.1 – (A) Proportional membership (Q) of each São Paulo marsh antwren in the genetic cluster inferred by Structure ($K = 2$). This graphic represents each individual as a bar, and its membership probability in each cluster. Individuals 1 to 26: Mogi das Cruzes population; individuals 27 to 43: Salesópolis population. (B) Outputs graphics from Structure Harvester, indicating the higher value of $\ln P(K)$ (left), and ΔK (right).66

Figure 4.1 – Microsatellite genotypes of *Formicivora paludicola* at locus Fpa18. (A) Genotypes of six diploid individuals; (B) Genotype of a putative triploid sample (SL14); (C) 1% agarose gel showing *CHD* gene bands patterns, and highlighting the female-like-pattern (red square) of SL14 sample. SL14I and SL14II represent, respectively, the first and the second DNA sample extracted from blood. 500 and 300 represent the band size of the ladder used, and they are in base pairs. Source: Camargo, C. (2014).81

Figure 4.2 – Individuals of *Formicivora paludicola*, and their respective *CHD* gene band pattern. (A) Animal SL01: a diploid normal male, demonstrating the male plumage color pattern; (B) Animal MC29: a diploid female, demonstrating the female plumage color pattern; (C) Animal SL14: a putative triploid female, demonstrating its color pattern; (D) Animal MC25: a diploid young male, demonstrating the female-like plumage color pattern. Source: Camargo, C. (2014).82

LISTA DE TABELAS

(Introdução e Materiais e Métodos)

Tabela 1 – Nome do <i>locus</i> de microssatélite, motivo de repetição (<i>Motif</i>), amplitude alélica, em pares de bases (pb) (T) na espécie original, temperatura de anelamento (T_A) e referência na literatura em que foram retirados dados dos <i>loci</i> desenvolvidos para <i>M. exsul</i> e testados em <i>F. paludicola</i>	39
--	----

LISTA DE TABELAS

(Capítulos 1 a 4)

Table 1.1 – Data of novel (Fpa loci) and cross-amplified (MyEx and Mex loci) polymorphic microsatellites in <i>F. paludicola</i> : Repeat motifs, references in the literature, number of screened individuals (n), PCR annealing temperatures (T_A), number of alleles (N_A), allele range in base pairs (bp), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, and probability of heterozygote deficits (P).....	57
--	----

Table 2.1 – Number of analyzed individuals (N), average of alleles number (N_A), allelic richness (R_S), observed (H_O) and expected (H_E) average heterozygosities, heterozygotes excess probability (P_d), inbreeding coefficient (F_{IS}), and its probability of being different from zero (P) found in two populations of the São Paulo marsh antwren. (SD: Standard Deviation)	64
---	----

Table 2.2 – Number of analyzed individuals (N), number of alleles (N_A), allelic richness (R_S), number of private alleles (A_P), allele range in base pairs (T), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, heterozygotes excess probability (P_d), inbreeding coefficient (F_{IS}), and its probability of being different from zero (P) found for each analyzed locus in two populations of the São Paulo marsh antwren. Critical value after Bonferroni correction is 0.002.....	64
--	----

Table 3.1 – Comparisons between microsatellite and SNPs data. Number of analyzed individuals (N), observed (H_O) and expected (H_E) average heterozygosities, heterozygotes excess probability (P) found in two populations of the São Paulo marsh antwren. (SD: Standard Deviation).	74
--	----

Table 4.1 – Genotypes of a putative triploid individual of <i>Formicivora paludicola</i> , based on 17 microsatellite loci.	80
---	----

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Área de amostragem, identificação da amostra (MC – Mogi das Cruzes; SL – Salesópolis), sexo (M – macho; F – fêmea) e mês/ano de coleta dos indivíduos de *F. paludicola* amostrados.....35
- Quadro 2** – Descrição da identificação de *barcodes* dos adaptadores P1 e da identificação dos *indexes* dos adaptadores P2 para cada amostra de DNA utilizada na preparação das bibliotecas.....42
- Quadro 3** – Sequências dos *primers* de DNAmT do Zarro-Americano (*Aythya americana*). RH300 e RH450 geram fragmentos de 300 pb e 450 pb, respectivamente. (F: *forward*, R: *reverse*).....43
- Quadro 4** – Sequências dos *primers* utilizados na amplificação das bibliotecas (RAD1.F: *forward*; RAD2.R: *reverse*).....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
bp	<i>base pairs</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CRoPS	<i>Complexity Reduction of Polymorphic Sequences</i>
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfato
EB	<i>Elution Buffer</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LB	<i>Lithium-Boric Acid</i>
LMP	<i>Low Melt Point</i>
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
MU	<i>Management Units</i>
µL	microlitro
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
OSUCCC	<i>Ohio State University Comparative Cancer Center</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAD	<i>Restriction-site Associated DNA</i>
RRL	<i>Reduced-Representation libraries</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
TE	Tris-EDTA

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>GENÉTICA COMO FERRAMENTA PARA A CONSERVAÇÃO ANIMAL</i>	21
1.1.1	Sequenciamento de nova geração na Genética da Conservação	22
1.2	<i>MARCADORES MOLECULARES</i>	24
1.2.1	Microsatélites.....	24
1.2.2	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).....	26
1.3	<i>FAMÍLIA THAMNOPHILIDAE</i>	27
1.3.1	O bicudinho-do-brejo-paulista	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	<i>OBJETIVO GERAL.....</i>	31
2.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	<i>CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....</i>	32
3.1.1	Mogi das Cruzes.....	32
3.1.2	Salesópolis.....	33
3.2	<i>COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA.....</i>	33
3.2.1	Coleta das amostras em campo	33
3.2.2	Extração de DNA	36
3.2.3	Amostras utilizadas para o sequenciamento de nova geração	36
3.3	<i>SEXAGEM MOLECULAR</i>	36
3.4	<i>DESENVOLVIMENTO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITES.....</i>	37
3.4.1	Sequenciamento	37
3.4.2	Seleção e caracterização dos primers	38
3.4.3	Amplificação cruzada dos primers de <i>Myrmeciza exsul</i>	38
3.4.4	Visualização dos resultados	39
3.5	<i>DESENVOLVIMENTO DOS SNPs.....</i>	40
3.5.1	Preparação das bibliotecas	40
3.5.1.1	<i>Clivagem do DNA.....</i>	40
3.5.1.2	<i>Ligação de oligonucleotídeos adaptadores.....</i>	41

3.5.1.3	<i>Seleção de tamanho dos fragmentos</i>	42
3.5.1.3.1	<i>PCR Padrão de tamanho</i>	42
3.5.1.3.2	<i>Eletroforese e seleção dos fragmentos</i>	43
3.5.1.4	<i>Extração do gel</i>	44
3.5.1.5	<i>Amplificação e purificação das bibliotecas</i>	45
3.5.1.6	<i>Criação do pool de bibliotecas e envio para sequenciamento</i>	47
3.5.2	Análise dos reads e seleção dos RAD-tags	47
3.6	<i>ANÁLISE DOS RESULTADOS</i>	47
3.6.1	Excesso de homozigotos e desequilíbrio de ligação	48
3.6.2	Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Variabilidade Genética	48
3.6.3	Estruturação populacional e detecção de migrantes de primeira geração ..	49
3.6.4	Tamanho efetivo populacional e detecção de gargalos populacionais	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
	<i>CAPÍTULO 1</i>	52
	Abstract	53
	Introduction	54
	Results and Discussion	55
	Experimental Section	55
	Conclusions	56
	<i>CAPÍTULO 2</i>	58
	Abstract	59
	Introduction	60
	Materials and Methods	61
	Results	63
	Discussion	67
	<i>CAPÍTULO 3</i>	69
	Abstract	70
	Introduction	71
	Materials and Methods	72
	Results	73
	Discussion	74
	<i>CAPÍTULO 4</i>	77

5	DISCUSSÃO GERAL.....	84
6	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
	APÊNDICES	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 GENÉTICA COMO FERRAMENTA PARA A CONSERVAÇÃO ANIMAL

Ao longo das últimas décadas, as mudanças climáticas e a fragmentação dos habitats – causadas, em sua maioria, por atividades antrópicas – têm tido impactos negativos nas populações de muitas espécies animais e vegetais, uma vez que acabam diminuindo a disponibilidade de recursos essenciais para estas e modificando as condições de seus ambientes (TEMPLETON et al., 2001; FRANKHAM, 2010a; GALETTI et al., 2013).

Além disso, a fragmentação de habitats é responsável por diminuir a conectividade entre populações restringindo, assim, o fluxo gênico entre estas, podendo causar a perda de variabilidade genética por deriva e, em alguns casos, a depressão por endocruzamento (SHAFFER, 1987; STORFER, 1999; SEGELBACHER et al., 2010; MÉNDEZ et al., 2011). A perda de heterozigose implica em efeitos negativos por tornar maior a probabilidade de que os indivíduos sejam homozigotos para alelos deletérios recessivos, o que pode resultar em baixa resistência a doenças, reduzidas taxas de sobrevivência e de crescimento, anomalias fenotípicas, tamanho reduzido dos adultos e baixa fertilidade (YOUNG et al., 1998; BRYANT; REED, 1999; FRANKHAM et al., 2002). Ademais, a perda de diversidade alélica tem outros efeitos drásticos, pois esta constitui o material necessário para a adaptação e especiação dos táxons frente às alterações ambientais (TEMPLETON et al., 2001).

Estes fatores podem ser minimizados com a migração de novos indivíduos, uma vez que estes podem reduzir a probabilidade de endocruzamento, introduzindo indivíduos com alta capacidade de adaptação (FRANKHAM, 2005; SEGELBACHER et al., 2010). No entanto, as espécies possuem capacidades de dispersão distintas e podem responder diferentemente à fragmentação dos habitats, de maneira que, se uma espécie não costuma atravessar áreas abertas, o isolamento das áreas naturais irá atingir severamente suas populações, podendo levá-las ao declínio e, com o tempo, até à extinção (TEMPLETON et al., 2001; ANTONGIOVANNI; METZGER, 2005; LAURANCE; GOMEZ, 2005; UEZU et al., 2005).

Portanto, o tamanho de uma população isolada e o número de indivíduos fundadores são os principais fatores determinantes do quanto de variabilidade genética pode ser mantida em uma população (AMOS; HOELZEL, 1992; FRANKHAM et al., 2002). No caso de aves, Bates (2000) e Francisco et al. (2007) indicam que espécies que habitam o sub-

bosque de florestas neotropicais possuem capacidade limitada de se dispersar por áreas abertas e colonizar manchas de vegetação – possuindo maior estruturação genética entre suas populações e maior tendência de apresentar endocruzamento e perda de variabilidade genética por deriva –, quando comparadas a espécies de regiões temperadas e a espécies de áreas abertas.

O efeito da mudança da paisagem resultante da constrição da conectividade entre manchas de habitats pode ter uma consequência ainda mais grave em espécies que possuem distribuição restrita a pequenos fragmentos isolados, como é o caso de muitas espécies que ocorrem restritamente em brejos e regiões de várzea (SEMLITSCH; BODIE, 1998; GIBBS, 2000). Gibbs (2000) sugere que espécies associadas a brejos já possuem uma limitada capacidade de dispersão natural, que é mais agravada pela alteração na abundância e na distribuição dos brejos e pode afetar seriamente a biodiversidade e a persistência deste ecossistema. Muitas destas espécies só são capazes de manter suas populações viáveis por meio de migrações ocasionais entre as manchas de vegetação, o que caracteriza uma dinâmica de metapopulação (SEMLITSCH; BODIE, 1998; GIBBS, 2000). Este tipo de dinâmica populacional é a principal mantenedora da diversidade de espécies e da variabilidade genética em brejos (SEMLITSCH; BODIE, 1998).

Assim, o estudo genético em populações naturais de espécies ameaçadas mostra-se bastante relevante para a conservação destas, já que permite acessar os níveis de diversidade genética e fluxo gênico, a presença de endocruzamento e, até mesmo, a existência de gargalos populacionais recentes. Estas informações podem auxiliar na tomada de decisões relacionadas às estratégias de conservação mais eficientes a serem realizadas para cada espécie, de maneira a manter a viabilidade populacional em longo prazo e, também, para realizar o manejo destas populações (AMOS; HOELZEL, 1992; FRANCISCO et al., 2007; MÉNDEZ et al., 2011).

1.1.1 Sequenciamento de nova geração na Genética da Conservação

Nos últimos anos, o avanço nas tecnologias de sequenciamento de DNA vem sendo de grande importância para aprofundar as metodologias de análises e o desenvolvimento de ferramentas para averiguar a variabilidade genética. Equipamentos que permitem o sequenciamento de um grande número de bases, exigindo uma pequena quantidade de DNA, são conhecidos como plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (SCHLÖTTERER, 2004; ALLENDORF et al., 2013).

Devido ao aumento da capacidade de sequenciamento e de processamento computacional dos dados gerados pelo NGS, as técnicas que se utilizam de marcadores moleculares baseados na própria variação das sequências do DNA e que possuem grandes quantidades de *loci* (como, por exemplo, os SNPs) estão se tornando cada vez mais comuns (PRIMMER, 2009; ALLENDORF et al., 2010; OUBORG et al., 2010; ALLENDORF et al., 2013).

Allendorf et al. (2013) mostram que esta tecnologia é importante para a Genética da Conservação devido a (1) facilitar a identificação e o desenvolvimento de marcadores moleculares neutros tradicionais, como os microssatélites; (2) facilitar o desenvolvimento e genotipagem de novos marcadores com grande número de *loci*, como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*); e (3) possibilitar o desenvolvimento de marcadores que permitem identificar polimorfismos funcionais, o que facilita analisar variações que sejam adaptativas.

Alguns autores denominam esta “nova” tendência em genética de populações de “*Genômica de Populações*” (LUIKART et al., 2003; OUBORG et al., 2010) e, na genética da conservação, de “*Genômica da Conservação*” (PRIMMER, 2009; ALLENDORF et al., 2010; OUBORG et al., 2010; ANGELONI et al., 2012). De maneira geral, a Genômica da Conservação consiste no uso de metodologias de análise do genoma como ferramenta para solucionar problemas relacionados à biologia da conservação.

De fato, a Genômica se tornou um importante segmento que permite estudar, não apenas marcadores moleculares neutros, mas também, marcadores que possam influenciar na adaptação e nos padrões evolutivos de muitas espécies. Inicialmente, os focos da Genômica da Conservação foram as chamadas espécies “modelos”, para a maioria das quais o genoma já havia sido sequenciado. Com o desenvolvimento de novas tecnologias e metodologias que reduziram os custos de isolamento de marcadores genômicos, foi possível estudar espécies que não eram modelos e para as quais nada se conhecia a respeito do seu genoma (PRIMMER, 2009; ALLENDORF et al., 2010; AVISE, 2010; FRANKHAM, 2010b; ALLENDORF et al., 2013).

1.2 MARCADORES MOLECULARES

1.2.1 Microssatélites

Os Microssatélites são repetições em tandem de pequenas unidades do genoma (geralmente de um a seis pares de bases) encontradas tanto em genomas de organismos eucarióticos como de procarióticos. Também são conhecidos como Repetições de Sequências Simples (SSR) ou Repetições Curtas em Tandem (STR) (ELLEGREN, 2000; ZANE et al., 2002).

São marcadores moleculares altamente polimórficos em relação ao comprimento (número de repetições), fato explicado principalmente pela ocorrência de deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante eventos de replicação do DNA (Figura 1) (LEVINSON; GUTMAN, 1987; ELLEGREN, 2000). Smith (1976), Zane et al. (2002), Buschiazzo e Gemmell (2006), Balaesque (2007) descrevem que o polimorfismo dos microssatélites também pode ser ocasionado por eventos de recombinação (*crossing-over* desigual) e até por elementos transponíveis. Todavia, estes mecanismos seriam menos comuns e, até o momento, os padrões mutacionais encontrados nos *loci* de microssatélites não condizem com o esperado para esses eventos (ELLEGREN, 2000, 2004; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

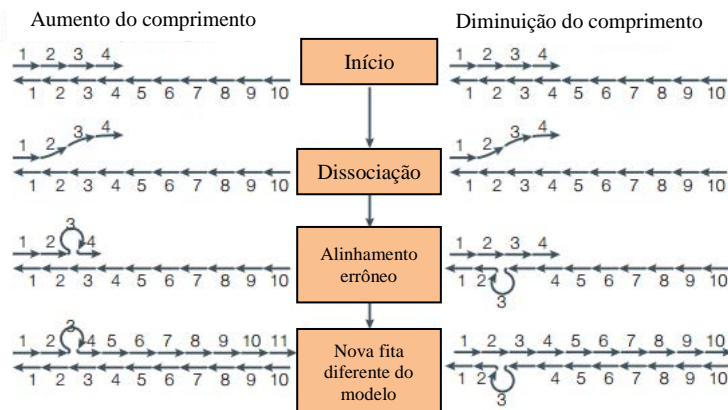


Figura 1 – Mecanismo de deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA. Fonte: Modificado de Ellegren (2004).

Os microssatélites são amplamente dispersos ao longo do genoma, ocorrendo tanto em regiões codificadoras, quanto não codificadoras. Pelo fato da maioria dos *loci* ocorrerem na segunda região citada, pode-se inferir que, provavelmente, muitos deles não sofrem grande pressão de seleção, podendo ser considerados marcadores “neutros”. Isto

confere a estes marcadores uma taxa de mutação relativamente alta, variando entre 10^{-2} e 10^{-4} por *locus* por geração (ELLEGREN, 2000, 2004). Entretanto, já existem evidências de que estes valores podem ser muito mais variáveis quando se analisa diferentes espécies e, até mesmo, diferentes tipos de *loci* (PRIMMER; ELLEGREN, 1998; ELLEGREN, 2000, 2004; NEFF; GROSS, 2001; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

O polimorfismo dos *loci* de microssatélites é analisado por meio de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se *primers* complementares às sequências flanqueadoras de cada *locus*, seguida de análise em gel de eletroforese e em sequenciador automático, por meio de *primers* marcados com fluorescência, o que torna esta metodologia simples de ser executada (ZANE et al., 2002; ALLENDORF et al., 2013).

Embora a alta taxa de substituição de nucleotídeos encontrada nas regiões flanqueadoras dos *loci* de microssatélites, faça com que este marcador seja, geralmente, espécie-específico (ZANE et al., 2002), vários estudos demonstram que, para espécies filogeneticamente próximas (pertencentes ao mesmo Gênero ou Família), existe a possibilidade de se utilizar *loci* de microssatélites heterólogos (oriundos de outra espécie) para análises de transferibilidade ou amplificação cruzada (PRIMMER et al., 1996; ZANE et al., 2002; PRIMMER et al., 2005). Em aves, este procedimento revela-se bastante importante, uma vez que este grupo apresenta menor abundância de microssatélites dispersos pelo genoma (média de 0,46%) quando comparado a outros grupos animais (média de 2,0%) (PRIMMER et al., 1997; NEFF; GROSS, 2001; ZANE et al., 2002).

Além das características previamente citadas, os microssatélites são marcadores co-dominantes, permitindo diferenciar indivíduos homozigotos de indivíduos heterozigotos. Tais características, associadas ao grande avanço na área das análises estatísticas específicas para este tipo de marcador, fazem dos microssatélites uma das ferramentas mais informativas para estudos de genética populacional e para a avaliação dos níveis de parentesco entre os indivíduos (PRITCHARD et al., 2000; JONES et al., 2002; ZANE et al., 2002; ELLEGREN, 2004).

Embora *loci* de microssatélites tenham sido descritos e utilizados em análises populacionais de diversas espécies de aves, sua aplicação é ainda restrita (PRIMMER et al., 2005; FU et al., 2008; DAWSON et al., 2010). Em relação a espécies da Família *Thamnophilidae*, atualmente existem poucos trabalhos que descrevam este marcador, sendo contemplados os gêneros *Thamnophilus* (AGREDA et al., 2006), *Phaenostictus* (CHAVES-CAMPOS; DEWOODY, 2008) e *Myrmeciza* (BARNETT et al., 2007; FELDHEIM et al., 2010).

1.2.2 *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*

Polimorfismos de Base Única (SNPs) são mutações únicas que ocorrem ao longo do genoma, geralmente a cada 500 pb no genoma de animais, e estão presentes em, pelo menos, 1% de uma população (MORIN et al., 2004; STRACHAN; READ, 2011; ALLENDORF et al., 2013). Podem ocorrer em regiões não codificadoras, sendo considerados marcadores moleculares neutros, ou em regiões codificadoras, nas quais podem estar associados a alterações fenotípicas e adaptativas (ALLENDORF et al., 2013).

Embora os *loci* de SNPs sejam, geralmente, bialélicos, o número de *loci* estudados é muito maior do que em outros tipos de marcadores, o que torna os SNPs muito relevantes para estudos de variabilidade genética, e outros parâmetros populacionais, como relações de parentesco, fluxo gênico e estruturação populacional (MORIN et al., 2004; SEEB et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013).

O isolamento de *loci* de SNPs é realizado por sequenciamento de amostras de DNA, geralmente utilizando equipamentos de sequenciamento de nova geração (NGS), de vários indivíduos de uma (ou mais) população alvo. O alto investimento exigido para o desenvolvimento deste tipo de marcador tem levado ao surgimento de novas metodologias de baixo custo, tornando atualmente os SNPs mais acessíveis (SEEB et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013). Dentre as metodologias desenvolvidas, as principais são: sequenciamento de DNA Associado a sítios de Restrição (RAD-seq) (BAIRD et al., 2008); sequenciamento do Exoma (HODGES et al., 2007); Representação Reduzida de Bibliotecas (RRLs) e Redução Complexa de Sequências Polimórficas (CRoPS) (DAVEY et al., 2011).

A metodologia de isolamento de SNPs utilizando-se RAD-seq (ou RAD-tags) vem sendo amplamente utilizada para analisar populações (BAIRD et al., 2008; DAVEY; BLAXTER, 2010). Nesta, pequenos fragmentos de DNA clivados com enzimas de restrição são ligados a adaptadores específicos para sequenciamento de nova geração e selecionados pelos seus tamanhos, sendo posteriormente sequenciados em plataformas de nova geração. Desta maneira, o custo de desenvolvimento de SNPs é reduzido e tem como resultado milhares de marcadores co-dominantes (MILLER et al., 2007; BAIRD et al., 2008; DAVEY; BLAXTER, 2010).

Nos últimos anos, os RAD-tags têm sido aplicados em diversos estudos populacionais como, por exemplo, para analisar evolução paralela no peixe esgana-gato (*Gasterosteus aculeatus*) no Alasca (HOHENLOHE et al., 2010), divergência adaptativa em espécies simpátricas de ciclídeos do Lago Vitória (KELLER et al., 2012) e introgressão em

zonas de hibridização de aves do gênero *Manacus* na América Central (PARCHMAN et al., 2013).

1.3 FAMÍLIA THAMNOPHILIDAE

A Família *Thamnophilidae* é um grupo de aves exclusivo da região Neotropical, distribuindo-se pela América do Sul, com exceção de partes da Argentina e do Chile. É composta por 50 gêneros e mais de 200 espécies de pequenas aves, que habitam ambientes florestais ou com vegetação arbustiva. As aves desta família são ditas monogâmicas, são majoritariamente insetívoras – forrageando em diferentes estratos, do solo ao sub-dossel – e, geralmente, possuem dimorfismo sexual (RIDGELY; TUDOR, 1994; SICK, 1997).

Diversos estudos têm sido realizados procurando resolver a filogenia da Família utilizando metodologias de avaliação baseadas na morfologia (FIRME; RAPOSO, 2011; GALVÃO; GONZAGA, 2011), na vocalização (ISLER et al., 1998; ISLER; WHITNEY, 2011) e em metodologias moleculares (HACKETT; ROSENBERG, 1990; IRESTEDT et al., 2004; BRUMFIELD et al., 2007; ISLER et al., 2007; MOYLE et al., 2009). Nas últimas décadas, novos gêneros foram reconhecidos – como, por exemplo, o gênero *Euchrepomis* (BRAVO et al., 2012) – e outros foram incorporados a táxons de maneira a compor um grupo monofilético de espécies, como é o caso do gênero monoespecífico *Stymphalornis* (*S. acutirostris* – bicudinho-do-brejo) que, segundo estudos recentes, deve ser incorporado ao gênero *Formicivora* (GONZAGA, 2001; GONZAGA et al., 2007; BRAVO et al., 2012; BELMONTE-LOPES, 2013).

A maior diversidade deste grupo ocorre na Amazônia, onde é possível encontrar em torno de 50 espécies vivendo em simpatria (SICK, 1997; ISLER et al., 1998). Segundo Ridgely e Tudor (1994), a localização das aves em campo é mais fácil pela vocalização do que por observação direta, uma vez que ficam inconspícuas nos densos sub-bosques das florestas tropicais. Diversas espécies são conhecidas por serem sedentárias, deslocando-se apenas no interior de florestas e evitando cruzar áreas abertas (RIDGELY; TUDOR, 1994). Por este motivo, muitos *Thamnophilidae* são sensíveis à diminuição das áreas florestadas, ocasionada principalmente por atividades antrópicas, como queimadas e desmatamento (ANTONGIOVANNI; METZGER, 2005; LAURANCE; GOMEZ, 2005; UEZU et al., 2005).

Das mais de 150 espécies que ocorrem no Brasil, 19 foram enquadradas em alguma categoria de ameaça na última edição do “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção” do IBAMA (SILVEIRA; STRAUBE, 2008). No estado de São

Paulo, com a constante redução das áreas de domínio da Mata Atlântica, seis das 34 espécies que ocorrem no estado estão listadas no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo (BRESSAN et al., 2009).

1.3.1 O bicudinho-do-brejo-paulista

O bicudinho-do-brejo-paulista, *Formicivora paludicola* (Figura 2), é uma espécie endêmica do estado de São Paulo, descoberta há cerca de 10 anos, porém descrita apenas recentemente (BUZZETTI et al., 2013). Foi identificada em 15 localidades distribuídas nas Bacias do Alto Tietê (Salesópolis, Biritiba-Mirim e Mogi das Cruzes) e do Rio Paraíba do Sul (São José dos Campos) (Figura 2A) (BUZZETTI et al., 2013). Possui grande semelhança com o bicudinho-do-brejo (*F. acutirostris*) que ocorre no litoral dos estados do Paraná e Santa Catarina, desde a baía de Antonina ao rio Itapocu (REINERT et al., 2007).

Segundo Buzzetti et al. (2013), as principais características que atribuem ao bicudinho-do-brejo-paulista o *status* de uma nova espécie são (1) a coloração negra do ventre dos machos (contra cinza em *F. acutirostris*), (2) o bico mais curto na espécie paulista e (3) diferenças no padrão de canto. Ademais, análises moleculares revelaram algumas diferenças pontuais em três regiões do DNA mitocondrial (genes *Citocromo b*, *ND2* e *ND3*) que, apesar de não se mostrarem significativas, separaram as duas espécies em dois clados monofiléticos com alto valor de suporte, o que indica que as espécies são distintas (BUZZETTI et al., 2013).

O bicudinho-do-brejo-paulista apresenta dimorfismo sexual, sendo a plumagem ventral do macho adulto negra e a da fêmea branca com estrias negras (Figura 2B), e pode chegar a 14 cm de comprimento. Ocorre restritamente em brejos naturais ricos em taboa (*Typha dominguensis*) e piri (*Schoenoplectus californicus*), onde forrageia à baixa altura a procura de insetos (principalmente das Ordens Diptera, Mantodea e Lepidoptera), seu principal recurso alimentar. Vive em casais ou em grupos familiares de até quatro aves (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013). O período reprodutivo parece ser semelhante ao descrito para *F. acutirostris*, ocorrendo entre outubro e fevereiro (REINERT et al., 2012; BUZZETTI et al., 2013).

A população total de *F. paludicola* é estimada em torno de 300-900 indivíduos¹ e as principais ameaças às populações existentes são: a destruição dos brejos naturais para a construção de hidrelétricas, mineradoras, drenagem para implantação de atividades agrícolas e

¹ DEL RIO, G. C. (Departamento de Zoologia, IB/USP). Comunicação pessoal, 2014.

pastoreio, queimadas e introdução de espécies de gramíneas exóticas (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013).

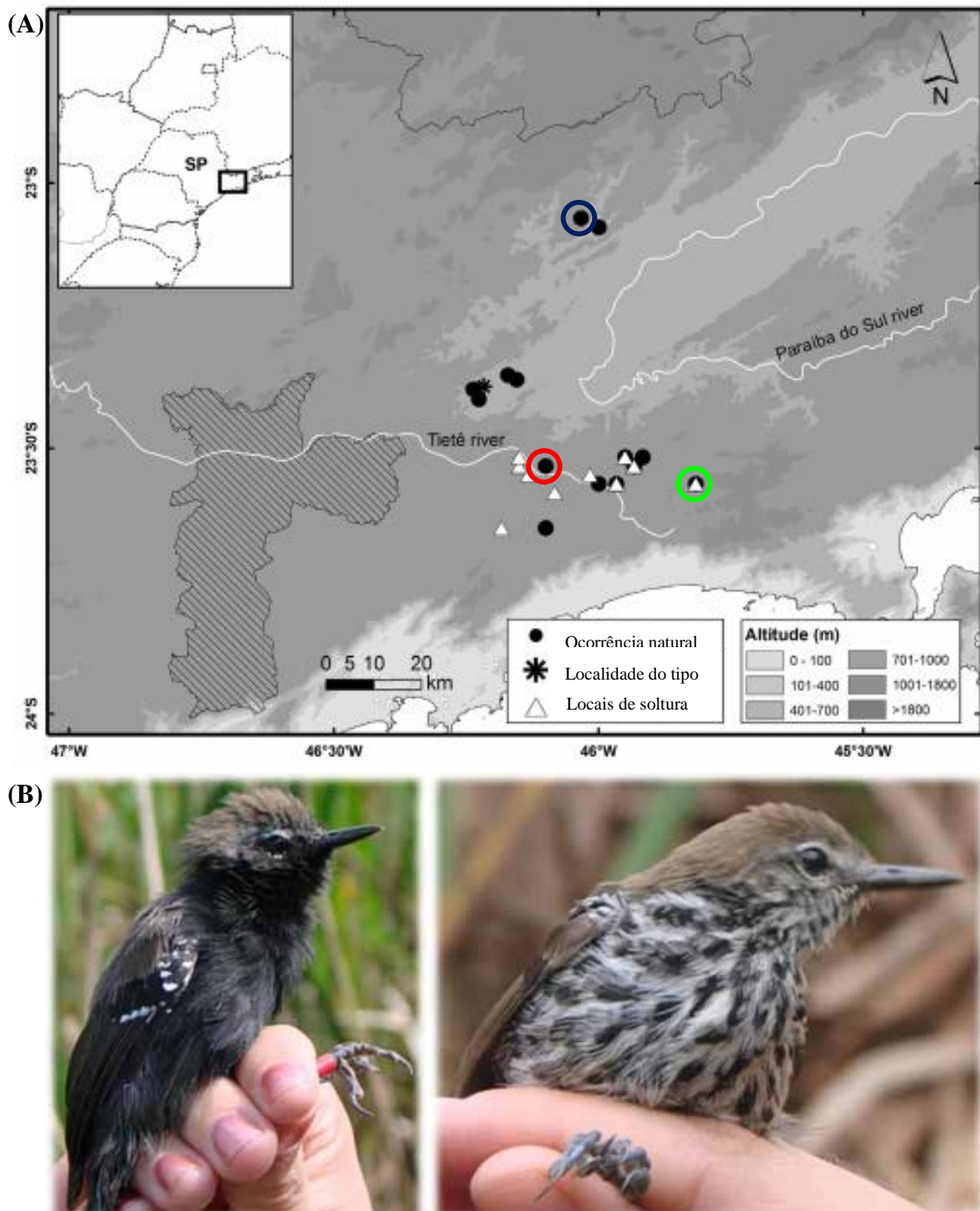


Figura 2 – (A) Mapas do estado de São Paulo indicando as localidades de ocorrência de *Formicivora paludicola*. Maiores localidades estão circuladas (vermelho: Mogi das Cruzes; verde: Salesópolis; azul: São José dos Campos). Fonte: Buzzetti et al. (2013). (B) Indivíduos de bicudinho-do-brejo-paulista: Macho (esquerda) e Fêmea (direita). Foto: Camargo, B. R. (2013).

Devido à redução do seu hábitat e sua distribuição restrita, a espécie já se encontra listada no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo na

categoria de ameaça “Criticamente em Perigo” (BRESSAN et al., 2009). Um estudo sendo conduzido atualmente mostrou que a espécie já perdeu cerca de 400 km² de hábitat em menos de 100 anos, vivendo em pequenas áreas de brejo isoladas, distantes em média cerca de 5 km, que somam uma área de no máximo 1,42 km². Esta área representa 1/10 da área mínima considerada para enquadrar uma espécie como “Criticamente em Perigo” conforme os critérios estabelecidos pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*)².

Apesar de ocorrer em 15 localidades, a maior população da espécie é estimada em torno de 100-280 indivíduos e está localizada em uma área de brejo próximo a Mogi das Cruzes (área circulada em vermelho na Figura 2). Duas outras grandes populações estão estimadas em torno de 70-180 e 50-120 indivíduos, ocorrendo, respectivamente, em Salesópolis e São José dos Campos (áreas circuladas, respectivamente, em verde e azul na Figura 2). As outras populações estão inseridas em brejos com áreas menores do que 11 ha, e estima-se que não possuam mais do que 70 indivíduos².

Nenhuma das populações descritas acima foi encontrada em regiões protegidas por unidades de conservação (BUZZETTI et al., 2013). A maioria delas está inserida próxima a regiões urbanas, em áreas nas quais há alta concentração de atividades agrícolas e pastoris, que formam uma matriz antropizada, restringindo a conectividade da vegetação de brejo a qual a espécie está associada, o que pode limitar a migração de indivíduos entre essas áreas (SHAFFER, 1987; STORFER, 1999; MÉNDEZ et al., 2011). Dessa maneira, não se sabe se as populações do bicudinho-do-brejo-paulista possuem fluxo gênico entre elas ou se estão isoladas, o que poderia ocasionar depressão endogâmica devido ao acasalamento de indivíduos aparentados (SHAFFER, 1987; STORFER, 1999; SEGELBACHER et al., 2010; MÉNDEZ et al., 2011). Neste caso, estudos em genética populacional – capazes de fornecer informações a respeito da estruturação genética das populações de uma espécie, os níveis de variabilidade genética e de fluxo gênico – se tornam essenciais para definir estratégias de conservação para esta espécie (STORFER, 1999).

Além disso, outras medidas para a conservação do bicudinho-do-brejo-paulista incluem a criação de áreas protegidas nas regiões que abrigam as maiores populações da espécie, a restrição da prática de algumas atividades que afetam os brejos (como agricultura e extração de areia) e a fiscalização em áreas onde estas atividades ocorrem (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013).

² DEL RIO, G. C. (Departamento de Zoologia, IB/USP). Comunicação pessoal, 2014.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de variabilidade genética e os padrões de fluxo gênico entre duas populações de bicudinho-do-brejo-paulista (*Formicivora paludicola*), com o intuito de fornecer subsídios para futuras estratégias de conservação a serem desenvolvidas para a espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar *loci* de microssatélites para *F. paludicola*, por meio de sequenciamento de nova geração;
- Testar em *F. paludicola* *loci* de microssatélites heterólogos, desenvolvidos para *Myrmeciza exsul*;
- Isolar e caracterizar *loci* de SNPs em *F. paludicola* por meio do RAD-seq;
- Analisar e comparar a variabilidade genética de populações de *F. paludicola* e o grau de fluxo gênico entre elas;
- Verificar o grau de isolamento destas populações, averiguando a existência de estruturação populacional entre elas e de indivíduos migrantes de primeira geração;
- Averiguar a existência de gargalos populacionais recentes;
- Inferir a melhor estratégia de conservação para esta espécie, de maneira a manter a viabilidade das populações em longo prazo.

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

As amostras de *F. paludicola* foram coletadas em duas áreas de brejo localizadas próximas aos municípios de Mogi das Cruzes e Salesópolis (Região Metropolitana de São Paulo) (Figura 3), em três períodos distintos: entre Abril e Junho de 2012, entre Novembro de 2012 e Abril de 2013, e entre Outubro de 2013 e Janeiro de 2014.

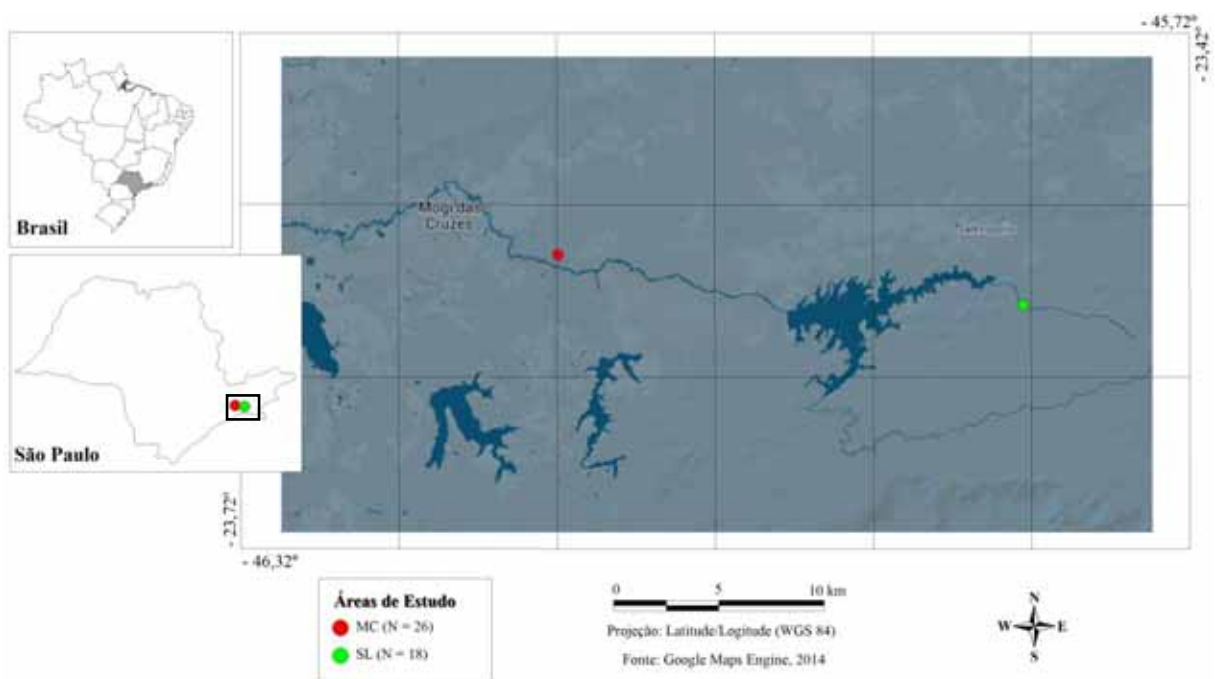


Figura 3 – Mapa do estado de São Paulo evidenciando a localização das áreas de estudo. MC: Mogi das Cruzes; SL: Salesópolis. A coloração azul escura representa corpos d'água. Organizado por: Costa, M. C. (2014).

3.1.1 Mogi das Cruzes

A cidade de Mogi das Cruzes dista aproximadamente 70,0 Km da capital do estado, São Paulo. Está a uma altitude de 750 metros acima do nível do mar e localiza-se, segundo a classificação climática de Köppen, em uma região abrangida pelo Clima Tropical de Altitude (*Cwa*), com verão chuvoso e inverno seco (precipitação anual inferior a 1.400 mm), médias de temperaturas de 20,0°C (mínima de 16,0°C e máxima de 23,0°C) (CEPAGRI, 2014).

A primeira área de coleta está localizada a cerca de 10,0 Km do centro do município de Mogi das Cruzes (23°32'S, 46°07'W) e possui em torno de 40,0 ha³. Está a uma altitude de 688 metros e a vegetação dominante neste brejo é a taboa (*T. dominguensis*, Família Typhaceae) e, em menos densidade, há a presença de gramíneas do gênero *Panicum* sp. (Família Poaceae) (observações pessoais). Ao redor da área há uma matriz antropizada, com áreas de agricultura (cultivo de frutas e hortaliças) e pastagens. Adjacente ao brejo existe uma estrada vicinal pavimentada (observações pessoais).

3.1.2 Salesópolis

Salesópolis situa-se a aproximadamente 100,0 Km da cidade de São Paulo, está a uma altitude de 780 metros acima do nível do mar, e também possui clima classificado como tropical de altitude (precipitação anual inferior a 1.200 mm) e médias de temperaturas de 19,8°C (mínima de 16,0°C e máxima de 23,0°C) (CEPAGRI, 2014).

A segunda área de coleta localiza-se a cerca de 10,0 Km do centro do município de Salesópolis (23°34'S, 45°49'W) e possui cerca de 25,0 ha³. Este brejo está localizado a aproximadamente 30 km (distância linear) da primeira área de coleta a uma altitude de 866 metros, e sua vegetação predominante é o piri (*S. californicus*, Família Cyperaceae) e a taboa (*T. dominguensis*), porém possui em algumas regiões dominância de gramíneas (*Panicum* sp.) (observações pessoais). A região desta área é mais distante de centros urbanos, existindo maior cobertura vegetal nas encostas próximas ao vale e, também, há extensos cultivos de *Eucalyptus* sp. (observações pessoais).

3.2 COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA

3.2.1 Coleta das amostras em campo

Os indivíduos de *F. paludicola* foram capturados com rede de neblina (12 x 2,5 m, malha 1-1/4''), que era aberta na trilha nos locais em que houve resposta ao *playback* de *F. paludicola* utilizado (retirado do banco de dados de vocalizações Xeno-Canto⁴), e marcados com anilhas coloridas para identificação dos indivíduos (Autorização para atividades com finalidade científica N° 36562-1 e N° 36562-2/SISBIO/ICMBio) (Figura 4A e B). As

³ DEL RIO, G. C. (Departamento de Zoologia, IB/USP). Comunicação pessoal, 2014.

⁴ <http://www.xeno-canto.org>

atividades de campo se iniciavam às 6h da manhã (ao amanhecer) e se estendiam durante todo o dia, exceto em dias muito ensolarados, nos quais se estendiam somente até as 10h, devido à visibilidade da rede na área aberta. Nestes casos, as redes eram novamente abertas ao fim da tarde (após as 16h).

As amostras de sangue foram coletadas por meio de um corte na ponta da unha da ave, previamente limpa com etanol 100% e com auxílio de um cortador esterilizado, colocando-a imediatamente em contato com uma gota do anticoagulante EDTA (0,5 M) – esse procedimento foi realizado para evitar a coagulação do sangue e facilitar a coleta. Após a retirada de aproximadamente 10 μ L de sangue, a amostra foi armazenada em tubo de 1,5 mL contendo álcool etílico absoluto (100%) (Figura 4C e D). As amostras de pena em crescimento foram coletadas com o auxílio de uma pinça esterilizada em fogo, e as penas coletadas também foram armazenadas em tubo de 1,5 mL contendo álcool etílico absoluto (100%). Após a coleta das amostras, os indivíduos eram soltos em segurança no local de captura. As amostras dos indivíduos obtidas durante as coletas estão listadas, com a devida identificação, o sexo (identificado pela morfologia – coloração da plumagem – e pelo método molecular) e a data de coleta no Quadro 1.

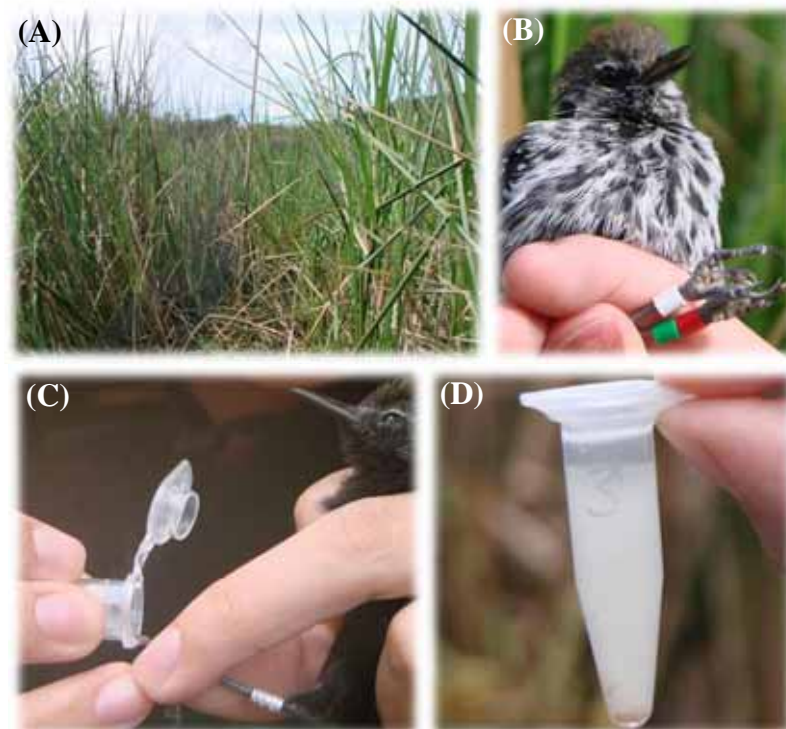


Figura 4 – (A) Rede de neblina utilizada na captura das aves; (B) indivíduo de *F. paludicola* anilhado com anilhas plásticas coloridas na área de Salesópolis; (C) coleta e (D) armazenamento do sangue em campo. Fotos: Camargo, B. R. (2013).

Quadro 1 – Área de amostragem, identificação da amostra (MC – Mogi das Cruzes; SL – Salesópolis), sexo (M – macho; F – fêmea) e mês/ano de coleta dos indivíduos de *F. paludicola* amostrados.

Área de Amostragem	Identificação da Amostra	Sexo		Data da Coleta	
		Morfológico	Molecular		
Mogi das Cruzes	MC02	M	M	Abril/2012	
	MC03	M	M	Abril/2012	
	MC04	F	F	Abril/2012	
	MC05	M	M	Abril/2012	
	MC06	M	M	Abril/2012	
	MC07	F	F	Abril/2012	
	MC08	F	F	Abril/2012	
	MC09	F	F	Abril/2012	
	MC10	F	F	Abril/2012	
	MC11	M	M	Abril/2012	
	MC12	F	F	Abril/2012	
	MC13	F	F	Abril/2012	
	MC14	M	M	Abril/2012	
	MC16	F	F	Junho/2012	
	MC18	M	M	Junho/2012	
	MC19	M	M	Junho/2012	
	MC20	F	F	Junho/2012	
	MC21	F	F	Junho/2012	
	MC22	F	F	Junho/2012	
	MC23	M	M	Fevereiro/2013	
	MC24	F	F	Fevereiro/2013	
	MC25	F	M	Fevereiro/2013	
	MC26	M	M	Fevereiro/2013	
	MC27	F	F	Março/2013	
	MC28	M	M	Março/2013	
	MC29	F	F	Março/2013	
	Salesópolis	SL01	M	M	Abril/2013
		SL02	F	F	Junho/2012
		SL03	F	F	Junho/2012
SL04		M	M	Outubro/2013	
SL05		M	M	Junho/2012	
SL06		F	F	Junho/2012	
SL10		F	F	Abril/2013	
SL12		F	F	Abril/2013	
SL13		M	F	Outubro/2013	
SL14		M	F	Outubro/2013	
SL15		M	M	Outubro/2013	
SL16		F	F	Outubro/2013	
SL17		M	M	Outubro/2013	
SL18		F	F	Janeiro/2014	
SL19		F	M	Janeiro/2014	
SL20	M	M	Janeiro/2014		
SL21	F	F	Janeiro/2014		
SL22	F	F	Janeiro/2014		

3.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando o protocolo convencional de extração com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (SAMBROOK et al., 1989). Já as amostras de pena tiveram o DNA extraído seguindo-se o protocolo do *kit* comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen).

As amostras de DNA foram quantificadas por meio de gel de agarose 1%, utilizando-se como referência duas amostras de DNA de Mutum-de-Alagoas (*Pauxi mitu*), padronizadas a 15 e 50 ng/μL. Além da quantificação por gel de agarose, as amostras foram também quantificadas utilizando-se um espectrofotômetro (Nano Drop, *Thermo Scientific*) e padronizadas a uma concentração de aproximadamente 20 ng/μL.

3.2.3 Amostras utilizadas para o sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração foi realizado durante o período de estágio no Departamento de Evolução, Ecologia e Biologia de Organismos (*Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology*) na *Ohio State University* (OSU, Columbus-OH, Estados Unidos). Para a realização das etapas de isolamento dos microssatélites e de desenvolvimento dos SNPs, 21 amostras de DNA liofilizado das duas populações de *F. paludicola* (13 de Mogi das Cruzes e oito de Salesópolis) foram enviadas para os Estados Unidos (Licença de Exportação IBAMA Nº 13BR010074/DF).

Dessa maneira, para a preparação das amostras para o sequenciamento, as mesmas necessitaram ser rediluídas (utilizando-se apenas água estéril) e requantificadas. A quantificação foi realizada no fluorômetro Qubit (Qubit 2.0 Fluorometer, *Life Technologies*), e as amostras foram padronizadas para uma concentração entre 15 e 20 ng/μL.

3.3 SEXAGEM MOLECULAR

Apesar de apresentar dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, os machos jovens de bicudinho-do-brejo-paulista apresentam padrão de coloração da plumagem semelhante ao das fêmeas (BUZZETTI et al., 2013). Por este motivo, todos os indivíduos com coloração do ventre branca com estrias negras foram sexados molecularmente, para que a sexagem realizada em campo, baseada na morfologia fosse confirmada. Os indivíduos identificados como machos adultos pela morfologia (ventre negro) foram sexados como controle.

Foi utilizada a metodologia desenvolvida por Han et al. (2009), em que são utilizados três *primers*, dois deles (P2: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'/P8: 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG 3') previamente descritos em Griffiths et al. (1998), que amplificam um íntron existente no gene *CHD* (*chromobox-helicase-DNA-binding*); e o terceiro *primer* (P0: 5'-ATTGAGTTGGAACCAGAICA-3') que amplifica uma sequência única no *CHD-W*. Uma vez que o sistema de determinação do sexo das aves é ZZ/ZW e as fêmeas são heterogaméticas (ZW), utilizando-se este trio de *primers*, a análise dos produtos de PCR evidencia duas bandas extras nas fêmeas.

A PCR foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 0,2 mM de dNTPs (*Promega*), tampão de amplificação 1X (*Promega*), 3 mM de MgCl₂, 0,07 µM de cada *primer*, 0,5 U de *Taq polimerase* (*Promega*) e aproximadamente 100 ng de DNA. A reação foi realizada em Termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*[®]), programado para uma desnaturação inicial de 94°C (2,5 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 53°C (30 segundos) e 72°C (45 segundos), seguido de uma extensão final de 72°C (5 minutos). O resultado foi visualizado em gel de agarose 3%, após corrida eletroforética de 2h a 100V.

3.4 DESENVOLVIMENTO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITES

3.4.1 Sequenciamento

Após a quantificação das amostras, 2,0 µg de DNA (concentração de 20 ng/µL) foram enviados para serem sequenciados no Departamento de Ciências da Saúde Ambiental, da Universidade da Geórgia (*Environmental Health Science Building, University of Georgia, Athens, GA, EUA*).

A preparação das bibliotecas para o sequenciamento seguiu o protocolo do *kit Illumina Nextera* (*Illumina*), com exceção dos *primers* utilizados que foram customizados e a purificação das bibliotecas para a qual foi utilizado *Speedballs* ao invés dos reagentes fornecidos pelo *kit*⁵. O sequenciamento de 250 pb foi realizado em plataforma MiSeq versão 2 (*Illumina*) utilizando a leitura *paired-end*. Os dados gerados pelo sequenciamento foram analisados utilizando o programa computacional PAL_FINDER_v0.02.04 (CASTOE et al., 2012), que localiza *loci* de microssatélites (de dinucleotídicos a hexanucleotídicos). Os pares

⁵ GLENN, T. C. (*Department of Environmental Health Science Building, University of Georgia*). Comunicação pessoal, 2014.

de *primers* para os *loci* localizados foram construídos no programa PRIMER3 versão 2.0.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

3.4.2 Seleção e caracterização dos *primers*

Dos *loci* encontrados pelo programa computacional, que possuíam *primers* desenhados, 26 foram selecionados para análise de amplificação e polimorfismo em *F. paludicola*. O teste de amplificação dos pares de *primers* selecionados foram realizados submetendo-se 15 indivíduos da população de Mogi das Cruzes a reações de PCR em volume de 10 μ L, contendo 0,2 mM de dNTPs (*Promega*), tampão de amplificação 1X (*Promega*), 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 μ M de cada *primer*, 1 U de *Taq polimerase* (*Promega*) e aproximadamente 100 ng de DNA.

A reação foi realizada em Termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*[®]), programado para uma desnaturação inicial de 94°C (3 minutos), 29 ciclos de 94°C (30 segundos), 30 segundos à temperatura de anelamento pré-definida e 72°C (30 segundos), seguido de uma extensão final de 72°C (5 minutos). A temperatura de anelamento para cada *locus* foi definida por uma prévia reação de PCR utilizando duas temperaturas (55,0 e 60,0°C). Foram selecionadas somente duas temperaturas de anelamento por existir pouca disponibilidade de amostras dos indivíduos para o teste de um maior número de temperaturas. No entanto, estas foram escolhidas por terem sido as mais eficientes na amplificação dos *loci* heterólogos.

A eficiência de amplificação dos *loci* foi verificada em gel de agarose 1% e o polimorfismo destes foi visualizado em gel de poliacrilamida 7%, utilizando coloração por nitrato de Prata (COMINCINI et al., 1995).

3.4.3 Amplificação cruzada dos *primers* de *Myrmeciza exsul*

Além do isolamento de novos *loci* de microssatélites para a espécie em estudo, foi realizado um teste de amplificação cruzada com *primers* heterólogos, desenvolvidos para a espécie *Myrmeciza exsul* (*chestnut-backed antbird*) (BARNETT et al., 2007; FELDHEIM et al., 2010), também pertencente à Família *Thamnophilidae*, que ocorre no oeste da Colômbia e Equador (RIDGELY; TUDOR, 1994). Os *loci* de microssatélites foram selecionados priorizando-se as repetições dinucleotídicas, trinucleotídicas e tetranucleotídicas que não possuíam impurezas ou incertezas na espécie original (Tabela 1).

Tabela 1 – Nome do *locus* de microssatélite, motivo de repetição (*Motif*), amplitude alélica, em pares de bases (pb) (T) na espécie original, temperatura de anelamento (T_A) e referência na literatura em que foram retirados dados dos *loci* desenvolvidos para *M. exsul* e testados em *F. paludicola*.

<i>Locus</i>	<i>Motif</i>	T (pb)	T_A (°C)	Referência
MyEx19	(ATC) ₁₆	281-326	58,0	Barnett et al. (2007)
MyEx24	(GT) ₉	342-353	60,0	Barnett et al. (2007)
MyEx26	(CA) ₇ A(CA) ₆	255-257	58,0	Barnett et al. (2007)
MyEx27	(GT) ₃ (AT) ₂ (GT) ₂₀	262-298	60,0	Barnett et al. (2007)
MyEx36	(GT) ₁₀	176-182	51,0	Barnett et al. (2007)
MyEx41	(GGAT) ₁₆	233-261	45,0	Barnett et al. (2007)
MyEx46	(AT) ₅ (GT) ₈	287-293	51,0	Barnett et al. (2007)
MyEx52	(GT) ₂ TT(GT) ₉ TT(GT) ₈	213-283	58,0	Barnett et al. (2007)
MyEx61	(GGAT) ₁₈	142-178	60,0	Feldheim et al. (2010)
MyEx74	(GGCA) ₈ (GGAA) ₉ (CGAA) ₁₂	291-331	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex020	(TATC) ₉	203-231	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex024	(TAGA) ₆ TCGA(TAGA) ₈	161-241	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex028	(TATC) ₁₁ TGTC(TATC) ₄	185-229	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex033	(TATC) ₁₃	220-252	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex034	(TAGA) ₁₃	243-271	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex072	(ATC) ₁₀	161-209	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex089	(TTTC) ₁₇	193-253	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex090	(ATG) ₁₂	217-247	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex120	(AG) ₂₂	155-175	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex130	(ATC) ₁₀ ACC(ATC) ₁₃	184-208	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex140	(TCCA) ₁₁	165-245	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex162	(TAGA) ₁₃	203-215	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex166	(TAGA) ₁₃	226-262	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex176	(TAGA) ₁₂	209-233	55,0	Feldheim et al. (2010)
Mex178	(TGGA) ₁₄	229-253	60,0	Feldheim et al. (2010)
Mex191	(TAGA) ₁₂	184-216	60,0	Feldheim et al. (2010)

A amplificação dos *loci* de microssatélites e a análise de polimorfismo foram feitas seguindo os procedimentos previamente descritos para a caracterização dos *loci* específicos de *F. paludicola*. A modificação realizada foi referente às temperaturas de anelamento dos *primers*, seguindo as informações descritas na Tabela 1.

3.4.4 Visualização dos resultados

Todos os *loci* de microssatélites (específicos e heterólogos) que se mostraram polimórficos em *F. paludicola* foram marcados com fluorescência (fluorocromos FAM e

HEX). Os *loci* foram analisados em sequenciador automático ABI 3730 ou ABI 3500 (*DNA Analyzer – Applied Biosystems*) pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP) e pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento (Departamento de Microbiologia-Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP). Os *loci* tiveram os tamanhos de alelos calibrados no novo equipamento, quando realizada a análise pela primeira vez. A visualização dos genótipos de cada indivíduo foi realizada no programa computacional GENEMARKER 2.4.0 (*Softgenetics*).

3.5 DESENVOLVIMENTO DOS SNPs

3.5.1 Preparação das bibliotecas

A preparação das bibliotecas para sequenciamento de nova geração e para desenvolvimento dos *loci* de SNPs por meio da metodologia de RAD-seq foi feita por meio de digestão do DNA genômico com duas enzimas de restrição, seguida de ligação dos fragmentos gerados a oligonucleotídeos adaptadores P1 e P2. Foi então realizada uma seleção de tamanho dos fragmentos em gel de agarose, seguida da eluição do DNA no gel. As bibliotecas foram posteriormente amplificadas por PCR e foi realizada uma PCR quantitativa (qPCR) para determinar a concentração da biblioteca de cada indivíduo, o que resultou na elaboração de um *pool* com todas as 21 bibliotecas, que foi então encaminhado para o sequenciamento. As etapas para a preparação das bibliotecas encontram-se descritas detalhadamente a seguir.

3.5.1.1 Clivagem do DNA

A digestão do DNA foi realizada simultaneamente com duas enzimas de restrição, *EcoRI* (*New England BioLabs[®] Inc.*) e *SbfI* (*New EnglandBioLabs[®] Inc.*), numa reação de volume final igual a 25 μ L, contendo 2,5 μ L do tampão 10x NE *Buffer 4* (*New England BioLabs[®] Inc.*), 1 μ L de BSA (*Fisher Scientific*), 10 μ L de água estéril, 0,75 μ L de cada enzima e 150 ng de DNA (10 μ L de DNA a 15 ng/ μ L). Todo o preparo da reação foi realizado em gelo. A reação foi levada ao Termociclador *Mastercycler[®] ep* (*Eppendorf[®]*), programado nas seguintes condições físicas: 60 minutos a 37°C, seguidos de 20 minutos a 65°C, e manutenção final da reação a 4°C.

3.5.1.2 Ligação de oligonucleotídeos adaptadores

Após a digestão enzimática, foi realizada a ligação dos fragmentos de DNA obtidos com um par de oligonucleotídeos adaptadores (P1 e P2). Estes possuem uma estrutura que contém (1) bases complementares às extremidades coesivas resultantes da clivagem com as enzimas; (2) uma sequência de seis bases que serão associadas unicamente a cada amostra (*barcodes*) nos adaptadores P1; e (3) uma sequência de seis bases nitrogenadas exclusivas que irão identificar amostras de origens distintas (*indexes*) nos adaptadores P2 (Figura 5).

Adaptador P1		Sítio de ligação dos primers <i>KAPA/RAD1.F</i>	Sequência do primer <i>Paired End Read 1</i>	Barcode	Extremidade gerada pelo corte com <i>SbfI</i>
Top:	5'	AATGATACGGCGACCACCGA	GATCT ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	XXXXXX	TGCA 3'
Bottom:	3'	TTACTATGCCGCTGGTGGCT	CTAGA TGTGAGAAAGGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAGA	XXXXXX-Phos	5'

Adaptador P2		Extremidade gerada pelo corte com <i>EcoRI</i>	Sequência do primer <i>Multiplexing Read 2</i>	Index	Sítio de ligação dos primers <i>KAPA/RAD2.R</i>
Top:	5'	Phos-AATT	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC	XXXXXX	ATC AGAACAA 3'
Bottom:	3'		TCTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTG	XXXXXX	TAG AGCATACGGCAGAAGACGAAC 5'

Figura 5 – Dados dos adaptadores que foram ligados aos fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição. Fonte: Traduzido do protocolo de RAD-seq utilizado pelo *Gibbs Laboratory, Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, OSU, Columbus-OH, EUA*.

Toda a preparação da reação de ligação foi realizada em gelo. Foram escolhidos 21 oligonucleotídeos adaptadores P1 com *barcodes* diferentes, identificando cada amostra e um adaptador do tipo P2 (Quadro 2), identificando o conjunto das bibliotecas. A utilização de um adaptador P2 foi devido o sequenciamento ser realizado em apenas 20% de uma linha da plataforma HiSeq, o que implicou nas bibliotecas sendo sequenciadas com bibliotecas provenientes de outros laboratórios. A reação foi realizada em um volume final de 35 µL, contendo 1,0 µL do tampão 10X NE Buffer 2 (*New England BioLabs® Inc.*), 0,3 µL de rATP (100 mM - Promega), 0,2 µL de água estéril, 6 µL do adaptador P2, 2,0 µL do adaptador P1 e 0,5 µL da enzima T4 DNA Ligase (*New England BioLabs® Inc.*). Estes reagentes foram adicionados ao volume de 25 µL da reação de digestão. A reação foi levada ao Termociclador *Mastercycler® ep (Eppendorf®)*, programado nas seguintes condições físicas: 30 minutos a 24°C, seguidos de 20 minutos a 65°C (voltando à temperatura ambiente, decrescendo 1°C por minuto – 41 ciclos), e manutenção final da reação a 4°C. Após a reação no termociclador, esta foi mantida em *freezer (-20°C)* até a próxima etapa.

Quadro 2 – Descrição da identificação de *barcodes* dos adaptadores P1 e da identificação dos *indexes* dos adaptadores P2 para cada amostra de DNA utilizada na preparação das bibliotecas.

Amostra de DNA	<i>Barcode</i> (Adaptadores P1)	<i>Index</i> (Adaptadores P2)
MC02	ACAGCA	CGATGT
MC06	ACCAAG	CGATGT
MC18	ACCTAC	CGATGT
MC19	ACGTAG	CGATGT
MC20	ACTCGT	CGATGT
MC22	AGACCA	CGATGT
MC23	AGGTAC	CGATGT
MC24	AGTCGA	CGATGT
MC25	CACTCA	CGATGT
MC26	CAGTCT	CGATGT
MC27	CTAGAG	CGATGT
MC28	CTAGTC	CGATGT
MC29	CTCAGT	CGATGT
SL01	CTGTGT	CGATGT
SL02	GAAGAG	CGATGT
SL03	GACAGT	CGATGT
SL04	GATCTC	CGATGT
SL05	GTCAGA	CGATGT
SL06	TCCATG	CGATGT
SL10	TCTCGA	CGATGT
SL12	TGCAAG	CGATGT

3.5.1.3 Seleção de tamanho dos fragmentos

3.5.1.3.1 PCR Padrão de tamanho

Primeiramente, foi realizada uma PCR padrão utilizando uma amostra de DNA de *Aythya americana* (Zarro-Americano) e dois conjuntos de *primers* que amplificam duas

regiões de DNA mitocondrial de cerca de 300 e 450 pares de bases (Quadro 3). Esta PCR foi utilizada como guia para os cortes a serem realizados no gel para posterior eluição de DNA.

Quadro 3 – Sequências dos *primers* de DNAmT do Zarro-Americano (*Aythya americana*). RH300 e RH450 geram fragmentos de 300 pb e 450 pb, respectivamente. (F: *forward*, R: *reverse*).

RH300.F	5'-TGAGTAACTTGGGGCCACATC-3'
RH300.R	5'-TGATTGCGCTACCTTTGCAC-3'
RH450.F	5'-CACAAGATGCACCTAAACACACC-3'
RH450.R	5'-CTGCTAAATCCGCCTTCCAG-3'

A PCR foi conduzida em volume final de 30 μL , contendo 3,0 μL do tampão 10X PCR Buffer (New England BioLabs[®] Inc.), 2,5 μL de Mg^{+2} (50 mM – New England BioLabs[®] Inc.), 1,0 μL de dNTPs, 2,5 μL de BSA (1,0 mg/mL), 0,125 μL de Taq DNA Polimerase (New England BioLabs[®] Inc.), 1,0 μL de DNA (15 ng/ μL) e 0,75 μL de cada *primer* (10 μM). A reação foi realizada em Termociclador *Mastercycler[®] ep* (Eppendorf[®]), programado para uma desnaturação inicial de três minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de 94°C (10 segundos), 60°C (30 segundos) e 72°C (1,5 minutos), extensão final de cinco minutos a 72°C, seguida de manutenção final da reação a 4°C.

3.5.1.3.2 Eletroforese e seleção dos fragmentos

A eletroforese para seleção do tamanho dos fragmentos é realizada com um tampão específico (*LB Buffer*) e com uma agarose que possui um baixo ponto de derretimento (*LMP agarosis*). O gel é feito em concentração de 2%, contendo 1,3 g de agarose e 65,0 mL do *LB Buffer* 1x. Depois de preparado, o gel foi deixado polimerizando por uma hora e meia com um pente de 20 μL .

Foram utilizadas as amostras resultantes das etapas de digestão e ligação, que possuíam 35 μL de volume. Elas foram secas em uma centrífuga a vácuo (*Eppendorf Vacufuge[™] Concentrator 5301*) para o volume de 10 μL . Estas foram, posteriormente, misturadas com 4,0 μL do *Loading Dye* e 3,0 μL da PCR padrão. As amostras foram carregadas no gel de maneira a se deixar um *slot* livre entre cada amostra e, em um dos *slots* do centro foi adicionado um marcador de peso molecular de 100 pb (*Life Technologies*) (Figura 6). A eletroforese correu a 110 V por 2 horas e 45 minutos.

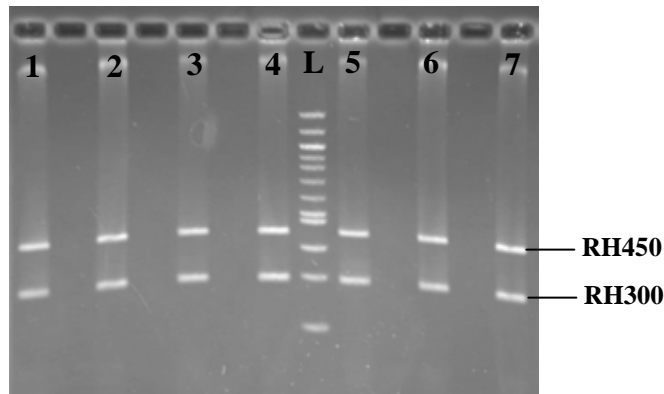


Figura 6 – Gel de agarose 1% evidenciando amostras de DNA resultantes das etapas de digestão e ligação (1 a 7). (L): marcador de peso molecular conhecido. (RH300 e RH450): bandas guias resultantes das PCRs com os primers de DNAmT de *Aythya americana*.

Após o tempo de corrida eletroforética, os géis foram corados com Brometo de Etídio (*Sigma*), visualizados e fotografados em fotodocumentador (*Gel Logic 200 Imaging System, Kodak*). Em seguida, utilizou-se um transiluminador comum (*Eletronic UV Transilluminator, ULTRA-LUM*) e equipamentos de segurança para o corte dos fragmentos dos géis, seguindo os procedimentos exemplificados na Figura 7. Cada fragmento extraído foi colocado individualmente em um tubo de 2,0 mL.

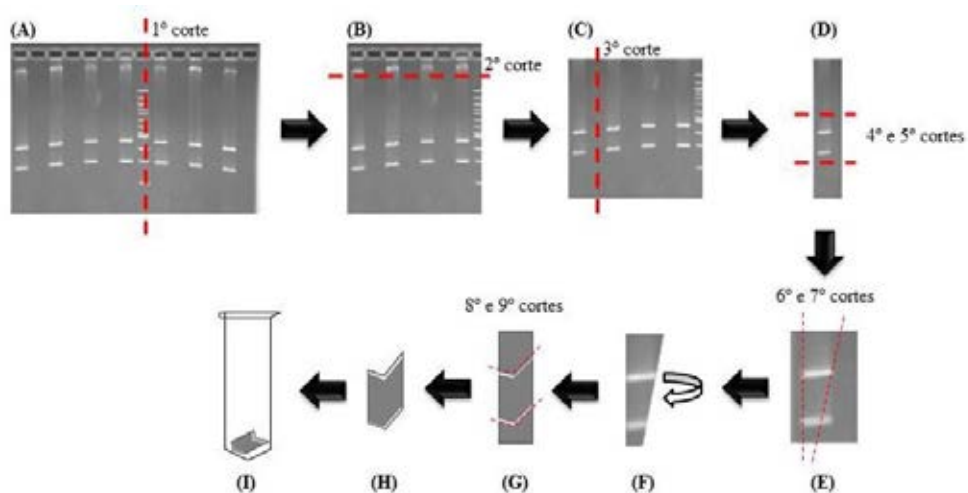


Figura 7 – Procedimentos para o corte do gel para a seleção de tamanho dos fragmentos de DNA. Os procedimentos foram seguidos para cada uma das amostras utilizadas. (A), (B), (C), (D), (E) e (F) vista frontal do gel. (G) e (H) vista lateral do gel.

3.5.1.4 Extração do gel

Seguindo-se o protocolo de extração do gel do kit *MinElute® Gel Extraction (Qiagen)*, foi colocado em cada tubo o *Buffer QG*, de maneira que a quantidade deste tampão adicionada fosse igual ao triplo do peso do gel dentro do tubo. Para isso, todos os tubos

contendo gel foram pesados e anotou-se o maior valor, que foi subtraído do peso do tubo vazio. Em seguida, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos.

Foram adicionados 230 μL de isopropanol 100% a cada amostra. Todo o conteúdo do tubo foi transferido para uma coluna, e centrifugou-se (*Eppendorf Centrifuge 5415D*) por um minuto a 13.000 rpm. O líquido do tubo coletor foi descartado. Adicionou-se 500 μL do *buffer QG*, e novamente centrifugou-se por um minuto (mesma rotação). Após descartar o conteúdo do tubo coletor, foram adicionados 750 μL do tampão PE à coluna e os tubos foram centrifugados por um minuto. Trocou-se o tubo coletor das colunas e centrifugou-se novamente. Este procedimento foi realizado para retirar qualquer resíduo de isopropanol existente.

As colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL previamente identificados, e foram adicionados 40 μL do tampão EB (*Elution Buffer*) no centro do filtro. Incubou-se por um minuto a temperatura ambiente e centrifugou-se por mais um minuto. Os tubos finais foram guardados na geladeira.

Foi realizada uma PCR quantitativa (qPCR) para quantificação dos produtos extraídos do gel em volume final de 10 μL , contendo 6,0 μL do KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (*KAPA BIOSYSTEMS*), 2,0 μL de água estéril e 2,0 μL da amostra (bibliotecas extraídas do gel, os seis padrões do *kit* KAPA, um controle negativo e um positivo). A placa de qPCR foi levada ao Termociclador *Mastercycler[®] ep realplex** (*Eppendorf*), programado para uma desnaturação inicial a 95°C (três minutos) e 35 ciclos de 95°C (30 segundos) e 60°C (45 segundos).

Com base na concentração (pM) das amostras, foi calculado o número de moléculas existentes em cada biblioteca. Tomou-se como padrão ideal a ocorrência de um número superior a 200.000 moléculas nas bibliotecas.

3.5.1.5 Amplificação e purificação das bibliotecas

Primeiramente, as bibliotecas foram centrifugadas em centrífuga a vácuo (*Eppendorf Vacufuge[™] Concentrator 5301*) até obter um volume de aproximadamente 10 μL . A PCR de amplificação das bibliotecas foi realizada em um volume de 30 μL , contendo 15 μL de *Phusion HF Master Mix* (*New England BioLabs[®] Inc.*), 1,5 μL de cada *primer* (RAD1.F e RAD2.R – *Sigma*, Quadro 4), 2,0 μL de água estéril e todo o conteúdo das bibliotecas obtidas na extração do gel (cerca de 10 μL). O volume inicial foi dividido em três *slots* de uma placa de PCR, tendo cada biblioteca sua PCR correndo em triplicatas a fim de

minimizar a probabilidade de amplificação de artefatos. A reação foi realizada em Termociclador *Mastercycler[®] ep (Eppendorf[®])*, programado para uma desnaturação inicial de 30 segundos a 98°C, seguida de 18 ciclos de 98°C (10 segundos), 60°C (30 segundos) e 72°C (40 segundos), extensão final de cinco minutos a 72°C, com manutenção da reação de amplificação a 4°C.

Quadro 4 – Sequências dos *primers* utilizados na amplificação das bibliotecas (RAD1.F: *forward*; RAD2.R: *reverse*).

RAD1.F	5'-AATGATACGGCGACCACCGAG-3'
RAD2.R	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAG-3'

Após a PCR, as triplicatas de cada amostra foram colocadas em um mesmo *slot*. A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o *kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)*. Foram adicionados, ao volume de cada *slot* da placa de PCR, 54 µL da solução de *beads* e as amostras foram incubadas por cinco minutos. A placa foi colocada sobre uma placa magnética (*Alpaqua[®]*) e incubada por dois minutos. Aspirou-se o líquido dos *slots* com uma micropipeta, com o devido cuidado para não retirar as *beads* da parede dos *slots*. Sem remover a placa de PCR da placa magnética, adicionou-se 195 µL de álcool etílico 70% a cada amostra e incubou-se por 30 segundos. O líquido foi aspirado com o auxílio de uma micropipeta e o procedimento foi repetido. Após a repetição, incubou-se a placa por cerca de 10 minutos para evaporar qualquer resíduo de álcool, evitando, porém, deixar as *beads* racharem. Retirou-se a placa de PCR da placa magnética e adicionou-se 40 µL do tampão de eluição (*Buffer EB, Qiagen*). Misturou-se bem, lavando a parede do *slot*. A placa foi novamente colocada sobre o imã, aguardou-se aproximadamente um minuto e o sobrenadante de cada *slot* foi transferido para um tubo de 0,5 mL previamente identificado.

Para realizar uma nova qPCR para quantificação das bibliotecas, primeiramente, diluiu-se os produtos de purificação em uma razão de 1:1.500, utilizando o tampão de diluição das bibliotecas (49,5 mL de água estéril e 500 µL de Tris 1M ajustados para um pH 8,0; com adição de 25 µL de *Tween 20 – BioRad*).

A qPCR foi realizada em volume final de 10 µL, contendo 6,0 µL do KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (*KAPA BIOSYSTEMS*), 2,0 µL de água estéril e 2,0 µL da amostra (bibliotecas diluídas, os seis padrões do *kit* KAPA, um controle negativo e um positivo). A placa de qPCR foi levada ao Termociclador *Mastercycler[®] ep Realplex**

(Eppendorf), programado para uma desnaturação inicial a 95°C (três minutos) e 35 ciclos de 95°C (30 segundos) e 60°C (45 segundos).

3.5.1.6 Criação do pool de bibliotecas e envio para sequenciamento

Baseado na concentração (pM) das amostras obtida na qPCR, foi calculada a quantidade de cada biblioteca que deveria ser adicionada ao *pool* final de bibliotecas que seria enviado ao sequenciamento, de maneira que estas estivessem em uma concentração equimolar. O *pool* final (com um volume de 10 µL a uma concentração de 40 fmol) foi enviado para o sequenciamento em equipamento HiSeq 2000 (*Illumina*), realizado pelo Laboratório *Nucleic Acid Shared Resources* (NASR) (*The Ohio State University Comprehensive Cancer Center - OSUCCC*). O sequenciamento utilizado foi o de *single-read*, com extensão de 50 pb.

3.5.2 Análise dos reads e seleção dos RAD-tags

Para analisar o arquivo gerado pelo sequenciamento de nova geração, foi utilizado o *script* *AftrRAD* v.2.4⁶, editado em Perl e R pelo Dr. Michael Sovic (*Ohio State University, Ohio, EUA*). O *script* utilizado filtrou e definiu possíveis *loci* de *RAD-tags* que continham mutações de bases únicas (SNPs) que variavam entre os indivíduos das populações e gerou as matrizes de genotipagem dos indivíduos.

3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As análises descritas a seguir foram realizadas para os marcadores microssatélites e para marcadores desenvolvidos por meio de RAD-seq. As análises de detecção de excesso de homozigotos (alelos nulos), desequilíbrio de ligação, parâmetros de variabilidade genética (F_{IS} e R_S) foram realizadas somente para os *loci* microssatélites.

⁶ SOVIC, M. (*Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, OSU*). Comunicação pessoal, 2014. Disponível em: <<https://u.osu.edu/sovic.1/downloads/>>

3.6.1 Excesso de homozigotos e desequilíbrio de ligação

Para avaliar a ocorrência de excesso de homozigotos nos *loci* de microssatélites específicos e, também, nos *loci* heterólogos foi analisada a população de Mogi das Cruzes ($N = 26$), utilizando-se o programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004). O programa randomiza os dados de entrada (genótipos dos indivíduos) e gera genótipos aleatórios para cada *locus*. Em seguida, este compara os dados observados com a distribuição dos dados gerados randomicamente. Após calcular os valores de probabilidade (P) para o número de homozigotos observados dentro de cada classe de tamanho, utilizando uma distribuição binomial cumulativa, e para as frequências observadas nas distribuições dos genótipos randomizados, um teste de probabilidade combinada de Fisher é realizado para todas as classes de homozigotos. Dessa maneira, desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser identificados e, então, o programa indica se este fato pode estar correlacionado com a ocorrência de alelos nulos (se existir um excesso significativo de homozigotos homogêneo na amostragem), dominância de alelos curtos (*large allele dropout*, caso o excesso de homozigotos esteja acontecendo para alelos pequenos no extremo da distribuição das classes de tamanho dos alelos) ou erros de genotipagem ocasionados por bandas *stutter* (no caso de haver um *déficit* de heterozigotos com alelos diferindo apenas um par de bases), que podem ser geradas por *slippage* da DNA polimerase durante a PCR (OOSTERHOUT et al., 2004).

Para calcular a ocorrência de desequilíbrio de ligação foram feitas tabelas de contingência para cada par de *loci*, utilizando-se o teste exato de Fisher para estimar se os genótipos de um *locus* foram independentes dos genótipos do outro, em termos de frequência de ocorrência. A análise foi realizada no programa GENEPOP 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Os valores de significância foram corrigidos utilizando-se o método de correção sequencial de Bonferroni descrito em Rice (1989), utilizado pelo programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

3.6.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Variabilidade Genética

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi estimado comparando-se as heterozigosidades observadas (H_O) e esperadas (H_E) e calculando-se o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). Os valores de H_O e H_E foram obtidos para cada *locus* separadamente e para a média de todos os *loci*. Os valores de F_{IS} foram obtidos para cada *locus*

individualmente, e também foi obtido o valor global. A significância das diferenças entre os valores de H_E e H_O foram obtidas utilizando-se o programa GENEPOP 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A partir dos dados observados (genótipos) foram gerados novos genótipos por meio da união aleatória dos alelos e foi calculada a probabilidade dessa união ter sido randômica por meio do *score test* (*U test*) (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

O F_{IS} foi calculado de acordo com Weir e Cockerham (1984), utilizando-se o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Para se verificar se os valores de F_{IS} diferiram significativamente de zero, foi utilizado o mesmo procedimento realizado para as heterozigosidades, a randomização dos dados observados. A diversidade genética foi estimada calculando-se a Riqueza Alélica (R_S) de El Mousadik e Petit (1996), também utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

Os parâmetros foram calculados para cada população individualmente. Os valores de riqueza alélica (R_S) foram comparados entre as populações de Mogi das Cruzes e Salesópolis utilizando-se o teste paramétrico T, pois os dados apresentaram normalidade e homogeneidade das variâncias. As análises foram realizadas no programa R (R CORE TEAM, 2013).

3.6.3 Estruturação populacional e detecção de migrantes de primeira geração

A diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de *F. paludicola* foi calculada de acordo com Weir e Cockerham (1984) e, para testar se os valores encontrados foram significativos, as probabilidades foram calculadas por meio do teste exato de Fisher. A análise foi realizada no programa GENEPOP 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Esta análise foi realizada para ambos os marcadores (microsatélites e RAD-tags).

O procedimento Bayesiano implementado pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado para identificar se há estrutura genética entre as populações de *F. paludicola*. O modelo assume que há diferentes grupos gênicos (K) em um conjunto de genótipos, com frequências alélicas distintas em cada *locus*. Portanto, ele infere sobre o número K de conjuntos gênicos presentes em uma amostragem criando grupos com composições diferentes e aleatórias (que seriam as populações), buscando grupos que estejam o mais próximo possível do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que cada população é caracterizada por um conjunto de frequências alélicas em cada *locus*. Baseando-se nestas

frequências alélicas, o programa estima-se a probabilidade (Q) de cada indivíduo pertencer a uma ou mais populações.

As análises foram realizadas para $K = 1$ até $K = 4$, com cinco repetições cada valor de K . Foram utilizadas 1.000.000 re-amostragens pelo método de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) e 10.000 re-amostragens como período de *Burn-in*, utilizando-se frequência correlacionada de alelos e o modelo que permite mistura de genomas (*admixture model*). Para visualizar os resultados obtidos com o programa STRUCTURE e encontrar o valor de K mais adequado para os dados foi utilizado o método de *Evanno* (EVANNO et al., 2005), implementado pelo programa STRUCTURE HARVESTER v.0.6.93 (EARL; VONHOLDT, 2012).

A detecção de migrantes de primeira geração foi realizada utilizando-se o método frequentista implementado pelo programa GENECLASS2 (PIRY et al., 2004), utilizando a probabilidade de cada indivíduo de pertencer a população onde foi coletado (*L_{home} likelihood*) e um valor crítico de 0,05. Esta análise exclui possíveis imigrantes de pertencer à população na qual o indivíduo foi amostrado. Em seguida, foi realizada uma análise de atribuição de cada indivíduo às duas populações amostradas (*assignment test*), que permite identificar se os prováveis imigrantes são oriundos da outra população analisada.

As análises realizadas nos programas STRUCTURE e GENECLASS2 foram realizadas apenas para os marcadores microssatélites.

3.6.4 Tamanho efetivo populacional e detecção de gargalos populacionais

O tamanho efetivo da população foi estimado utilizando o modelo de desequilíbrio de ligação realizado pelo programa NEESTIMATOR v2 (DO et al., 2014). Baseado no padrão reprodutivo da espécie-irmã de *F. paludicola* (*F. acutirostris*), que é majoritariamente monogâmico (REINERT, 2008), foi selecionado o modelo Monogâmico do programa para a realização da análise. O valor crítico da frequência alélica para descartar alelos raros foi de 0,02. Para detecção de gargalos populacionais recentes foi utilizado o programa BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996), utilizando como modelo de mutação dos microssatélites o *two-phase model* (TPM), uma vez que este modelo foi o indicado pelos autores do programa como mais eficiente na detecção de gargalos populacionais recentes. Esta análise foi realizada somente para os marcadores microssatélites.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão dos dados obtidos apresentam-se na forma de capítulos, referentes a trabalhos científicos. As revistas em que serão submetidos à publicação encontram-se discriminadas no início de cada capítulo, no caso dos Capítulos 1 e 2. As citações bibliográficas de cada um destes trabalhos não foram listadas ao final dos mesmos e, sim, no item *Referências Bibliográficas* ao fim da Dissertação, a fim de padronizar a apresentação geral deste trabalho.

CAPÍTULO 1

Novel and cross-amplified microsatellite loci for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren, *Formicivora paludicola* (Aves: Thamnophilidae)

CAPÍTULO 2

High genetic structure between populations of the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*)

CAPÍTULO 3

Comparative population genetic parameters for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*) based on SNPs and microsatellite markers

CAPÍTULO 4

Triplody in São Paulo Marsh Antwren provides further evidences for the role of W chromosome on sex determination in passerine birds

CAPÍTULO 1

Camargo C, Costa MC, Del Rio GC, Gibbs HL, Glenn TC, Bagal U, Silveira LF, Wasko AP and Francisco MR (em preparação). **Novel and cross-amplified microsatellite loci for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren, *Formicivora paludicola* (Aves: Thamnophilidae).** *International Journal of Molecular Sciences*.

Novel and cross-amplified microsatellite loci for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren, *Formicivora paludicola* (Aves: Thamnophilidae)

Abstract

The São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*) is a critically endangered bird which is endemic to marshes located in the metropolitan region of the city of São Paulo, Brazil. The total population of this bird is estimated to be around 300-900 individuals, distributed in 15 fragments, all smaller than 50 ha, which suggests that loss of genetic variability resulting from inbreeding and genetic drift may be occurring. As a result, measures of effective population sizes, levels of inbreeding, and gene flow are essential for making management decisions. Although microsatellite markers have been widely used to estimate these population genetic parameters in other endangered species, our ability to do so for *F. paludicola* is limited because only a few loci have been described for Thamnophilidae species. Here, we described 9 species-specific polymorphic microsatellites of *F. paludicola* that were isolated from a genomic library. Variation in these microsatellites and 8 additional heterologous loci that were developed for the chestnut-backed antbird (*Myrmeciza exsul*) were analyzed in *F. paludicola*. Expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosities averages were 0.72 and 0.70, respectively, and the number of alleles ranged from 3 to 10. These loci will permit, among other assessments, evaluation of whether artificial translocations are necessary for long-term viability of populations of this rare bird.

Keywords: Passeriformes; *Formicivora*; São Paulo marsh antwren; microsatellite loci; Illumina Next-generation sequencing; conservation genetics

Introduction

São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*, Thamnophilidae) is a small insectivorous bird recently described as a distinct species (BUZZETTI et al., 2013). It is endemic to São Paulo State, Brazil, occurring in the Atlantic Forest, and its total population is estimated to be no more than 900 individuals. After exhaustive searches, it was located in only 15 isolated marshland fragments, all around the metropolitan region of São Paulo city, in Tietê and Paraíba do Sul river Basins (BUZZETTI et al., 2013). Due to the limited population size, and its restricted distribution, this species has been classified as “Critically Endangered” in São Paulo State Red List, and will also be included in global lists with a similar classification in the near future (SILVEIRA, 2009).

Ongoing threats for the existing populations include marsh degradation due to sand mining, drainage for pasture and agriculture, fire, and invasion by exotic grasses (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013). These problems, along with the small size and isolation of marsh areas (all smaller than 50 ha) suggest that loss of genetic variability resulting from inbreeding and genetic drift may be occurring, although information on this case is not yet available. In this scenario, knowledge on effective population sizes, levels of inbreeding, and gene flow is essential for making management decisions. It will permit, among other assessments, to evaluate if artificial translocations are necessary in order to maintain the long term viability of individual populations.

Microsatellite markers have been widely used to estimate these population genetic parameters, but only a few loci are described for Thamnophilidae species (AGREDA et al., 2006; BARNETT et al., 2007; CHAVES-CAMPOS; DEWOODY, 2008; FELDHEIM et al., 2010). Then, the goal of this work was to isolate and characterize microsatellite markers for *F. paludicola*. We did this by isolating species-specific polymorphic microsatellites of *F. paludicola* from a genomic library, and using previously-isolated heterologous microsatellite loci from a related species, the chestnut-backed antbird, *Myrmeciza exsul* (Thamnophilidae) (BARNETT et al., 2007; FELDHEIM et al., 2010). We believe that these loci will be valuable to develop management strategies to the critically endangered São Paulo marsh antwren.

Results and Discussion

All of the 20 microsatellite loci isolated from *F. paludicola* were successfully amplified, and 10 were polymorphic. Of the 26 loci previously isolated from *M. exsul*, 24 could be amplified in *F. paludicola*, and 10 of these loci were polymorphic. Therefore, we identified 20 polymorphic loci which were used to characterize locus-specific variation in up to 26 individuals of *F. paludicola* (Table 1.1). MICRO-CHECKER software showed evidences for homozygote excess in loci *Fpa21*, *Mex024*, and *Mex089*. Indeed, only loci *Mex024* and *Mex089* were not amplified in some individuals, suggesting the presence of null alleles. No significant linkage disequilibrium was detected among pairs of loci. The number of alleles among polymorphic loci in HW equilibrium ($N = 17$) ranged from 3 to 10, and observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities ranged from 0.35 to 0.89, and from 0.36 to 0.87, respectively.

Experimental Section

Total DNA was extracted from four individuals of *F. paludicola* using a standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol (SAMBROOK et al., 1989). A paired-end shotgun library was constructed with Illumina Nextera reagents according to the manufacturer's protocol except that custom primers were used and clean-up used Speedbeads instead of supplied reagents. Sequencing was conducted on the Illumina MiSeq platform with version 2, 250 base paired-end reads. A total of 3,108,418 reads were analyzed in the program PAL_FINDER_v0.02.03 (CASTOE et al., 2012) to identify 49,093 reads containing 58,694 microsatellites (from dinucleotides to hexanucleotides) and design 8,619 primer pairs using program PRIMER3 (version 2.0.0) (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Twenty loci were chosen for amplification and polymorphism analyses. Another 26 heterologous microsatellite loci, developed for *M. exsul* (BARNETT et al., 2007; FELDHEIM et al., 2010), were also tested.

Variation at these loci was then analyzed by PCR for up to 26 individuals of *F. paludicola* from a single population located in Mogi das Cruzes, southeastern Brazil (23°32'S, 46°07'W). PCR reactions were performed in Eppendorf Master Cycler Gradient thermal cycler in a 10 μ L volume containing 150 ng of DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, and 500 mM KCl), 0.2 μ M of each primer, 3 mM $MgCl_2$ and 1 U of *Taq* DNA-Polymerase. Amplification conditions were 94°C (5 min), 30 cycles of 94°C (30 s), 30 s at the annealing temperature specified in Table 1.1, and 30 s at 72°C,

followed by a final extension of 72°C (10 min). Amplified products were scored on an automated sequencer (ABI 3500).

We calculated the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, the probability of heterozygosity deficit (P), and linkage disequilibrium using softwares GENEPOP 4.0 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) and FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995), respectively. Levels of significance for multiple tests were corrected through sequential Bonferroni method (RICE, 1989). Evidences for null alleles were evaluated using software MICRO-CHECKER (OOSTERHOUT et al., 2004).

Conclusions

Conservation activities for the *F. paludicola* may involve the protection of the areas in which this species still occurs by increasing marshes surveillance, and by constraining or better regulating economic activities, such as agriculture and mining nearby these wetlands (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013). Genetic analyses using the microsatellite loci described above will permit to assess the patterns of genetic variability, both within and between the currently small and recently isolated populations of these birds, and indicate whether reestablishing gene flow among them using translocations is a desirable management activity. Moreover, some of the currently evaluated microsatellite loci were firstly described for the genus *Formicivora*, which includes three other endangered species: the marsh antwren (*F. acutirostris*), the restinga antwren (*F. littoralis*), and the black-hooded antwren (*F. erythronotos*) (IUCN, 2013), and, therefore, could also be useful to support management activities for these species.

Table 1.1 – Data of novel (Fpa loci) and cross-amplified (MyEx and Mex loci) polymorphic microsatellites in *F. paludicola*: Repeat motifs, references in the literature, number of screened individuals (n), PCR annealing temperatures (T_A), number of alleles (N_A), allele range in base pairs (bp), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, and probability of heterozygote deficits (P).

Locus	Motif	References	n	T_A (°C)	N_A	Allele Range (pb)	H_O	H_E	P
<i>Fpa11</i>	(AAGGAG) ₈	The present study	26	60.0	10	395-467	0.81	0.84	0.308
<i>Fpa13</i>	(TTTG) ₁₃	The present study	26	55.0	3	368-393	0.35	0.36	0.544
<i>Fpa14</i>	(ATCT) ₁₆	The present study	26	60.0	6	575-599	0.73	0.70	0.450
<i>Fpa15</i>	(TTCC) ₁₆	The present study	26	60.0	4	216-264	0.77	0.73	0.586
<i>Fpa17</i>	(ATCT) ₁₅	The present study	26	60.0	6	452-472	0.89	0.82	0.807
<i>Fpa18</i>	(ATCT) ₁₈	The present study	26	60.0	6	364-388	0.69	0.77	0.297
<i>Fpa21</i>	(ATCT) ₁₇	The present study	26	60.0	10	417-489	0.58	0.83	0.001*
<i>Fpa23</i>	(ACTCCC) ₁₁	The present study	26	60.0	4	237-255	0.73	0.73	0.112
<i>Fpa24</i>	(AATAG) ₁₈	The present study	26	60.0	7	429-479	0.65	0.76	0.207
<i>Fpa25</i>	(AAAAG) ₁₈	The present study	26	60.0	5	252-288	0.69	0.67	0.457
MyEx19	(ATC) ₁₆	Barnett et al. (2007)	26	58.0	5	292-313	0.65	0.62	0.300
MyEx41	(GGAT) ₁₆	Barnett et al. (2007)	26	45.0	5	247-275	0.65	0.67	0.413
MyEx46	(AT) ₅ (GT) ₈	Barnett et al. (2007)	26	51.0	10	298-346	0.85	0.87	0.378
Mex024	(TAGA) ₆ TCTGA(TAGA) ₈	Feldheim et al. (2010)	24	60.0	11	472-696	0.58	0.86	0.001*
Mex034	(TAGA) ₁₃	Feldheim et al. (2010)	26	60.0	6	251-275	0.81	0.79	0.559
Mex089	(TTTC) ₁₇	Feldheim et al. (2010)	25	60.0	17	542-638	0.64	0.91	0.000*
Mex120	(AG) ₂₂	Feldheim et al. (2010)	26	60.0	6	223-243	0.89	0.80	0.852
Mex140	(TCCA) ₁₁	Feldheim et al. (2010)	26	60.0	9	196-240	0.58	0.82	0.003
Mex162	(TAGA) ₁₃	Feldheim et al. (2010)	25	60.0	5	232-252	0.60	0.66	0.029
Mex176	(TAGA) ₁₂	Feldheim et al. (2010)	26	55.0	5	206-234	0.58	0.54	0.587

* Significant deviation after Bonferroni correction ($P < 0.0025$)

CAPÍTULO 2

Camargo C, Costa MC, Del Rio GC, Gibbs HL, Silveira LF, Wasko AP and Francisco MR (em preparação). **High genetic structure between populations of the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*).** *Molecular Ecology*.

High genetic structure between populations of the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*)

Abstract

Small populations are susceptible to genetic drift and inbreeding effects, which may translate into loss of genetic variability, commonly causing several effects in their fertility, and capability of adaption to environmental changes. These factors can, in turn, increase the risk of extinction. Gene flow may balance these effects, maintaining genetic variability and reducing genetic divergences among populations. However, in isolated and small populations, genetic variability may preserve an important variation to local adaptation, which means that gene flow could disrupt this characteristic. Therefore, it is essential to understand genetic variability levels, gene flow, and population structure when it comes to conserve threatened species. São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*) is an endemic bird from São Paulo State (Brazil), recently described. Total estimated population is around 300-900 individuals, distributed in 15 isolated marshes around São Paulo metropolitan region, all smaller than 50 ha. Especially due to habitat reduction (correlated to anthropic activities, fire and exotic grasses invasion), it is considered as "Critically Endangered". Then, this study aimed to evaluate effective population sizes, gene flow, and genetic variability within and between the two major populations of this species. Although we found a strong genetic structure between them ($F_{ST} = 0.10$), and a small effective population size (116.00 and 31.0), high levels of genetic variability and allelic richness were revealed, indicating no inbreeding. The main implication in the species conservation is that both populations should be managed independently, but along with other areas that may be providing migrants for maintaining genetic variability levels.

Keywords: Thamnophilidae, gene flow, conservation genetics, effective population size, microsatellite markers

Introduction

In addition to the risks of extinction due to environmental and demographic events (SHAFFER, 1987), small populations are prone to suffer the effects of inbreeding and genetic drift, which may translate into loss of genetic variability and population structuring (SHAFFER, 1987; FRANKHAM, 2005). This can have serious consequences, reducing survival, fertility, and the capability of populations to adapt to changing environments, increasing the chances of extinction (HUDSON et al., 2000; FRANKHAM, 2005). Gene flow is the evolutionary force that can balance genetic drift, rescuing genetic variability within populations and homogenizing the genetic diversity among them (FRANKHAM, 2005). But, in the case of small populations, drift can overcome the effects of gene flow, as more migrants per generation are required to impede the loss of genetic variability (WRIGHT, 1931; VUCETICH; WAITE, 2000; WANG, 2004). When populations were reduced due to habitat fragmentation, the surrounding anthropogenic matrices of habitats often restrict the movements of individuals among populations, decreasing even more the benefits of gene flow (SHAFFER, 1987; STORFER, 1999; MÉNDEZ et al., 2011).

Then, when small populations of endangered species are genetically depauperate, the translocation of some individuals between the remaining areas can augment genetic variability of smaller populations to the levels of the larger ones (HUDSON et al., 2000). Especially when population differentiation is low, there is no genetic impediments for this kind of management (HUDSON et al., 2000). Nevertheless, when populations are structured because gene flow is naturally limited, translocations may not be indicated due to the risks of disrupting local adaptations. Consequently, understanding population structuring, levels of genetic variability, and gene flow is pivotal to the conservation and management of endangered species (STORFER, 1999).

The São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*) is a small insectivorous bird recently described by Buzzetti et al. (2013). Its total population is estimated around 300-900 individuals, and it occurs in 15 isolated marshes, all around the densely urbanized metropolitan region of São Paulo city, in Tietê and Paraíba do Sul river Basins (BUZZETTI et al., 2013). *F. paludicola* has already been classified as “Critically Endangered” in São Paulo State Red List (BRESSAN et al., 2009; BUZZETTI et al., 2013), specially due to marsh degradation (correlated to sand mining, drainage for pasture and agriculture, fire, and invasion by exotic grasses). Moreover, the small size and isolation of marsh areas (all smaller than 50

ha) suggest that loss of genetic variability resulting from genetic stochasticity can be occurring.

Then, in this work we examined the effective population sizes, gene flow, and levels of genetic variability within and between the two major populations of São Paulo marsh antwren, aiming to develop conservation strategies. To understand if the size of the habitats is constraining genetic variability, we compared levels of inbreeding and allelic richness between these populations and the existence of recent bottlenecks, as one distribution area of the species is about half the size of the other. It will permit to indicate the best strategy for this species conservation, in order to keep the long term viability of its populations.

Materials and Methods

Study Area

From 2012 to 2014, we collected blood samples of 44 birds at two marshes areas located in the Tietê River Basin, near São Paulo metropolitan region, in southeastern Brazil. The antwrens were sampled at Mogi das Cruzes marsh area (MC) (23°32'S, 46°07'W, altitude: 688 m, around 40 ha), and Salesópolis marsh area (SL) (23°34'S, 45°49'W, altitude: 866 m, around 25 ha). The first area (MC) comprises mainly cattail (*Typha dominguensis*), and some grasses (*Panicum* sp.). The region around the marsh area is composed by secondary growth matrix (personal observations). The second area sampled (SL) presents mainly bulrushes (*Schoenoplectus californicus*), and cattail (*T. dominguensis*), having some areas dominated by grass (*Panicum* sp). Around this area there are *Eucalyptus* sp. plantations (personal observations). Both areas are located in the margins of Tietê River, and SL is approximately 8 km far from its source. The linear distance between both sample locations is around 30 km.

Bird sampling and DNA extraction

At each site, we captured birds using one 12 × 2.5 m mist nets placed in the trail where *F. paludicola* responded for the playback sound (Xeno-Canto data bank; www.xeno-canto.org). All sampled birds were banded with colored rings for identification, and a 10-20 µL blood sample was obtained from each bird by cutting the nail tip. Blood was then mixed with an amount of 0.5 M EDTA, and this was immediately added to a 1.5 mL tube containing

100% ethanol. After returning from the field, samples were placed in a -20°C freezer. DNA was extracted using a standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol (SAMBROOK et al., 1989).

Microsatellite genotyping

DNA samples from all individuals were amplified for 9 species-specific microsatellite loci (*Fpa11*, *Fpa13*, *Fpa14*, *Fpa15*, *Fpa17*, *Fpa18*, *Fpa23*, *Fpa24*, and *Fpa25* – Camargo et al., in prep-a), and 8 heterologous loci, that cross-amplify in *F. paludicola* (MyEx19, MyEx41, MyEx46, Mex034, Mex120, Mex140, Mex162, and Mex176 – Camargo et al., in prep-a), using fluorescent labelled primers. PCR reactions details and amplification conditions were described in Camargo et al. (in prep-a). Amplified products were run on an ABI 3500 sequencer, and allele sizes scored using the software program GENEMARKER 2.4.0 (Softgenetics).

Genetic variability and Hardy-Weinberg equilibrium

Hardy-Weinberg equilibrium was estimated by comparing observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, and calculating the inbreeding coefficient (F_{IS}). H_O and H_E values were obtained for each locus, and for all average loci. F_{IS} values were obtained for each locus, and a global value. We calculated whether H_O and H_E values were different using the software GENEPOP 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995), that implements an exact test. F_{IS} value was calculated according to Weir e Cockerham (1984), using the software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). In order to evaluate whether these values were significantly different from zero, a randomic procedure was used. Genetic diversity was estimated by calculating allelic richness (R_S) (EL MOUSADIK; PETIT, 1996) also using FSTAT. Allelic richness from both populations was compared using a parametric T test, performed in software R (R CORE TEAM, 2013).

Population structure

We accessed the levels of population differentiation between the two sample areas using FSTAT to estimate F_{ST} as defined by Weir e Cockerham (1984) across all loci for each pairwise comparison of populations. To test whether the values were significantly different

from zero, we used the permutation procedure implemented in FSTAT, not assuming Hardy-Weinberg equilibrium. Pairwise population differentiation in genotype frequencies was assessed using an exact test, as implemented in GENEPOP.

Population structure was inferred using the Bayesian method implemented by software STRUCTURE (PRITCHARD et al, 2000). We used an admixture model with correlated allele frequencies, and other default parameter settings. For the analysis, we ran 1,000,000 MCMC iterations (discarding 10,000 as burn-in) of each K (from $K = 1$ to $K = 4$). The most appropriate K was defined using the Evanno method (EVANNO et al., 2005), implemented by software STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012).

First generation migrants detection was conducted through the frequency-based method implemented on GENECLASS2 (PIRY et al., 2004), using the individual probability to belong to its home population (where it was sampled, *L_home likelihood*) and a critical value (α) of 0.05. This analysis excludes possible migrants from its sampled population. Then, in the same software we used the assignment test analysis to identify whether the individuals excluded in the first analysis could be assigned to the other sampled population or not.

Effective population size and recent bottlenecks

Effective population size was accessed using the linkage disequilibrium method implemented by software NEESTIMATOR v2 (DO et al., 2014), using Monogamy mating – inferred by the reproduction system of its sister-species, *F. acutirostris* (REINERT, 2008) – and a critical value of 0.02 to discard rare alleles. We evaluated possible recent bottlenecks on software BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996), using as microsatellite mutation model the two-phase model (TPM), since the authors suggest that this is the best model to detect recent bottlenecks.

Results

Genetic variability

The average allelic richness (R_S) was 5.56 alleles (amplitude 2.95-9.12) in MC, and 4.72 alleles (amplitude: 2,00-7,82) in SL. Observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity average was, respectively, 0.70 (amplitude: 0.35-0.89) and 0.71 (amplitude: 0.36-0.87) in MC, and 0.66 (amplitude: 0.41-0.88) and 0.66 (amplitude: 0.50-0.82) in SL

(Table 2.1 and 2.2). Global test for heterozygosity deficit was not significant either in MC ($P = 0.050$) or in SL ($P = 0.665$). F_{IS} values also showed no significant divergence from zero in both populations (MC: $P = 0.238$; SL: $P = 0.484$) (Table 2.1), indicating that inbreeding may not be occurring in them. Allelic richnesses (R_S) compared between MC and SL were not significant different, based on T test ($t = 1.615$; $P = 0.117$).

Table 2.1 – Number of analyzed individuals (N), average of alleles number (N_A), allelic richness (R_S), observed (H_O) and expected (H_E) average heterozygosities, heterozygotes excess probability (P_d), inbreeding coefficient (F_{IS}), and its probability of being different from zero (P) found in two populations of the São Paulo marsh antwren. (SD: Standard Deviation)

Population	N	N_A (SD)	R_S (SD)	H_O (SD)	H_E (SD)	P_d	F_{IS}	P
Mogi das Cruzes	26	6.00 (± 2.00)	5.56 (± 1.69)	0.70 (± 0.14)	0.71 (± 0.13)	0.050	0.019	0.238
Salesópolis	17	4.76 (± 1.39)	4.72 (± 1.35)	0.66 (± 0.14)	0.66 (± 0.09)	0.665	-0.000	0.484

Other parameter was the existence of private alleles, which average was 2.6 (SD = 2.0) among loci, with the larger population (MC) presenting a larger absolute number (33 alleles from 102 alleles, ~32.4%), while SL presented 12 private alleles (from 81, ~15.0%) (Table 2.2).

Table 2.2 – Number of analyzed individuals (N), number of alleles (N_A), allelic richness (R_S), number of private alleles (A_P), allele range in base pairs (T), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, heterozygotes excess probability (P_d), inbreeding coefficient (F_{IS}), and its probability of being different from zero (P) found for each analyzed locus in two populations of the São Paulo marsh antwren. Critical value after Bonferroni correction is 0.002.

Population/ Analyzed locus	N	N_A	R_S	A_P	T (pb)	H_O	H_E	P_d	F_{IS}	P
Mogi das Cruzes										
Fpa11	26	10	8.84	4	395-467	0.81	0.84	0.308	0.035	0.425
Fpa13	26	3	2.95	1	368-393	0.35	0.36	0.544	0.034	0.534
Fpa14	26	6	5.42	1	575-599	0.73	0.70	0.450	-0.038	0.700
Fpa15	26	4	4.00	1	216-264	0.77	0.73	0.586	-0.052	0.762
Fpa17	26	6	5.99	1	452-472	0.89	0.82	0.807	-0.084	0.893
Fpa18	26	6	5.47	2	364-388	0.69	0.77	0.297	0.097	0.252
Fpa23	26	4	4.00	0	237-255	0.73	0.73	0.114	-0.008	0.582
Fpa24	26	7	6.16	4	429-479	0.65	0.76	0.200	0.142	0.134
Fpa25	26	5	4.98	1	252-288	0.69	0.67	0.452	-0.040	0.721
MyEx19	26	5	4.80	2	292-313	0.65	0.62	0.294	-0.048	0.737
MyEx41	26	5	4.47	1	247-275	0.65	0.67	0.415	0.030	0.490
MyEx46	26	10	9.12	6	298-346	0.85	0.87	0.401	0.026	0.466
Mex034	26	6	5.61	2	251-275	0.81	0.79	0.534	-0.019	0.666
Mex120	26	6	5.61	1	223-243	0.89	0.80	0.850	-0.115	0.916
Mex140	26	9	7.98	5	196-240	0.58	0.82	0.001*	0.299	0.003
Mex162	25	5	4.60	0	232-252	0.60	0.66	0.030	0.086	0.309
Mex176	26	5	4.56	1	206-234	0.58	0.54	0.599	-0.064	0.790

Salesópolis										
Fpa11	17	8	7.82	2	383-449	0.77	0.77	0.680	0.002	0.603
Fpa13	17	2	2.00	0	388-393	0.71	0.50	0.992	-0.433	0.990
Fpa14	17	6	5.88	1	575-595	0.77	0.67	0.937	-0.156	0.921
Fpa15	17	3	3.00	0	216-264	0.71	0.53	1.000	-0.352	1.000
Fpa17	17	5	4.94	0	456-472	0.41	0.62	0.029	0.347	0.028
Fpa18	17	4	3.94	0	364-376	0.47	0.57	0.320	0.179	0.199
Fpa23	17	5	5.00	1	231-255	0.59	0.75	0.100	0.216	0.069
Fpa24	17	4	4.00	1	429-459	0.77	0.71	0.498	-0.078	0.774
Fpa25	17	5	4.94	1	260-288	0.41	0.62	0.153	0.343	0.025
MyEx19	17	3	3.00	0	301-313	0.53	0.64	0.238	0.182	0.222
MyEx41	17	5	4.94	1	247-263	0.65	0.63	0.624	-0.023	0.693
MyEx46	17	5	4.94	1	298-338	0.77	0.64	0.966	-0.199	0.952
Mex034	16	4	4.00	0	251-271	0.75	0.71	0.644	-0.056	0.731
Mex120	17	6	5.88	1	223-251	0.82	0.72	0.937	-0.143	0.928
Mex140	17	5	4.94	1	204-232	0.53	0.53	0.621	-0.007	0.647
Mex162	17	6	6.00	1	232-256	0.65	0.82	0.157	0.211	0.074
Mex176	17	5	4.94	1	222-238	0.88	0.74	0.927	-0.203	0.972

Population differentiation

Fixation index value (F_{ST}) revealed a remarkable differentiation between populations, being highly significant ($F_{ST} = 0.10$; $P < 0.0001$). Indeed, the Bayesian analyses run in software STRUCTURE showed that there is a strong genetic structure, and software STRUCTURE HARVESTER determined two as the best K for the sample (Figure 2.1).

Software BOTTLENECK revealed a highly significant heterozygotes excess for Mogi das Cruzes ($P = 0.004$), suggesting that a recent bottleneck may have occurred in this population, but it did not show the occurrence of recent bottlenecks in Salesópolis, since there was no significant heterozygotes excess ($P = 0.132$).

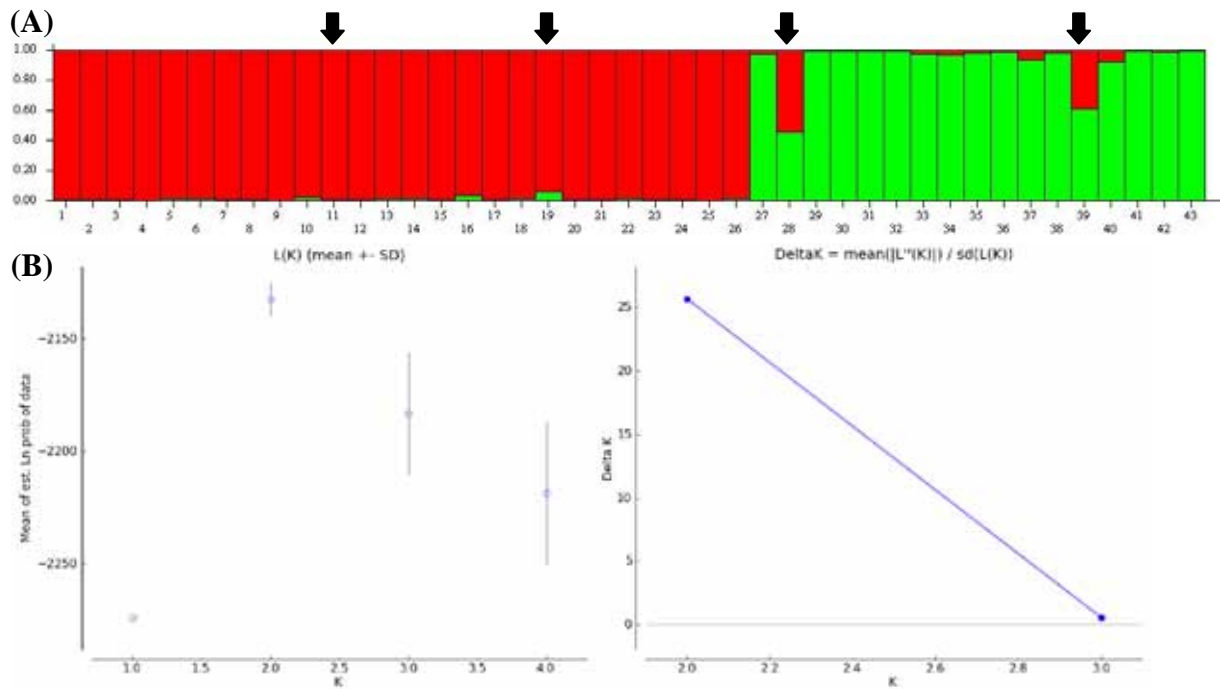


Figure 2.1 – (A) Proportional membership (Q) of each São Paulo marsh antwren in the genetic cluster inferred by Structure ($K = 2$). This graphic represents each individual as a bar, and its membership probability in each cluster. Individuals **1** to **26**: Mogi das Cruzes population; Individuals **27** to **43**: Salesópolis population. Black arrows identify individuals indicated as first generation migrants. (B) Outputs graphics from Structure Harvester, indicating the higher value of $\ln P(K)$ (left), and ΔK (right).

Gene flow and effective population size

First generation migrant analysis showed there are four sampled individuals that may be migrants in both populations (two individuals from MC, and two from SL, $P < 0.05$). Although both individuals from Salesópolis seem to be migrants from Mogi das Cruzes, according to the obtained STRUCTURE graphic, GENECLASS assignment tests revealed that they are not from Mogi das Cruzes, as well as the individuals from this population that were scored as migrants are not from Salesópolis. These results suggest that gene flow is low between the two analyzed populations, and that this is occurring among these populations and other ones, which were not sampled on this study.

The estimated effective population size was 116.0 individuals (CI95%: 77.5-211.7) for Mogi das Cruzes population, and 31.0 individuals (CI95%: 22.9-44.8) for Salesópolis population.

Discussion

Genetic variability and population structure

There is no previous information on the genetic variability levels or gene flow patterns in the São Paulo marsh antwren (*F. paludicola*), and this study represents one of a few that analyzes population structuring in Neotropical passerines that inhabits marshlands, as the one conducted by Cardoni et al. (2013).

Our results failed to find evidences of inbreeding in the two largest populations of São Paulo Marsh Antwren, as both of them were in equilibrium. However, the recent bottleneck detected in the larger area is evidence that allelic richness must have been recently reduced to a level comparable to the smaller population, resulting in the similar allelic richness found between them. This bottleneck could be attributed not only to the reduction of the marsh area, but also to historical factors, such as fire, or the invasion of exotic grasses (BUZZETTI et al, 2013), which creates patches of hostile habitats that may constrain the population size.

The highly significant population structuring and the absence of first generation migrants between the two largest populations indicate low levels of gene flow, and that these areas are in fact isolated. These populations are about 30 km apart, and the existence of agricultural areas and pasturelands between them form an anthropogenic matrix that could be limiting dispersal of the animals. Moreover, there is an 2,800 ha artificial reservoir (Ponte Nova reservoir) on Tietê River separating these populations, in which margins there is no *F. paludicola* populations, indicating that this could be an important barrier for gene flow. Behavioral aspects of the *F. paludicola* also may have implications in this result, as Reinert et al. (2007) obtained evidences that individuals of its sister species, the marsh antwren (*F. acutirostris*), cannot fly more than 25 m without landing, and that this bird avoid crossing open areas. Their wings are small and round, without long primary remiges, typical of birds that do not fly long distances (BATES, 2000), a feature that is also observed in *F. paludicola*.

On the other hand, the presence of immigrants in both studied populations must be contributing with the absence of inbreeding, despite the small effective population sizes, especially in SL. As immigrants found in SL were excluded from MC, and vice-versa, it is parsimonious to assume that the larger populations in each side of the reservoir may maintain a metapopulation dynamic with the nearby relictual populations (all smaller than 11 ha). Indeed, these smaller populations certainly would not be viable if there was no gene flow.

Implications for conservation

Most of the *F. paludicola* populations were found at isolated and degraded marshlands, neither of which is located inside a protection area or a conservation unit (BUZZETTI et al., 2013). Wetlands ecosystems are naturally isolated and dynamic, and with several anthropic activities changing the landscape, wetlands-associated species have to be capable of adaptation for different conditions (GIBBS, 2000). In the antwren case, because of its limited dispersal capability, it would depend on continuous corridors, which may not exist in fragmented landscapes, as might be occurring around the marshes sampled areas.

Our results permit us to suggest that each *F. paludicola* population should be conserved independently, as much the genetic variability is found between populations, which could be important for the species long-term viability. Nevertheless, it is also important to preserve the other small populations that may be contributing with the maintenance of genetic variability in Mogi das Cruzes and Salesópolis regions. Another important conclusion is that, as inbreeding is not occurring within each major population, artificial translocations do not seem to be necessary, and protecting the remaining areas of the species must be the priority.

CAPÍTULO 3

Camargo C, Costa MC, Gibbs HL, Sovic M, Fries A, Silveira LF, Wasko AP and Francisco MR (em preparação). **Comparative population genetic parameters for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*) based on SNPs and microsatellite markers.**

Comparative population genetic parameters for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*) based on SNPs and microsatellite markers

Abstract

The São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*) is an endemic species of São Paulo State (Brazil) that has been recently described in the metropolitan region of São Paulo city. It occurs in natural marsh wetlands and, especially due to its habitat destruction, is already considered as "critically endangered". Conservation approaches to this species include genetic analyses in order to establish a monitoring and management program of its populations. Nowadays, microsatellites represent the major molecular markers used on conservation genetic studies. However, with the advance of high-throughput sequencing technologies, other molecular markers, as SNPs, have become more assessable for this kind of analyses. Therefore, the present work aimed to compare genetic data based on microsatellite markers that have already been characterized for *F. paludicola*, and SNPs loci that were hereby developed for the species through a new approach, the restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq). We found 1,227 RAD-tags loci for 21 individuals of the species that provided information to conduct a preliminary analysis of the genetic variability and differentiation between two sampled populations. Although microsatellite loci showed a higher level of genetic variability, both data on RAD-tags and microsatellites evidenced similar values for the genetic differentiation between populations. Due to the lower heterozygosity values of SNPs loci as compared to microsatellites, it would be feasible to use dense sets of SNPs on further population analyses of *F. paludicola*. Nevertheless, the described RAD-seq approach stands for a powerful technology and could lead to relevant data on the population genetic structure of this species.

Keywords: Passeriformes; RAD-seq; SNPs; population genomics; *Formicivora*; microsatellite loci; conservation genetics

Introduction

The São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*, *Thamnophilidae*) is a small insectivorous bird that was recently described as a distinct species from *F. acutirostris* (BUZZETTI et al., 2013). It is endemic to Atlantic Forest of São Paulo State, Brazil, in only 15 isolated marshland fragments, all around the metropolitan region of São Paulo city, in Tietê and Paraíba do Sul river Basins (BUZZETTI et al., 2013). Total population is estimated to include no more than 900 individuals. Mainly due to its habitat destruction (correlated to hydroelectric dam construction, forest fire, and exotic species introduction), limited population size, and restricted distribution, it has been classified as “Critically Endangered” in São Paulo State Red List (BRESSAN et al., 2009).

Habitat fragmentation is responsible for decreasing connectivity between populations, restricting their gene flow, which causes genetic variation losses and, in some cases, inbreeding depression (SHAFFER, 1987; STORFER, 1999; SEGELBACHER et al., 2010; MÉNDEZ et al., 2011). In fact, many studies have shown that small populations are more susceptible to genetic drift, inbreeding, and founder effects (LANDE; BARROWCLOUGH, 1987; SHAFFER, 1987; FRANKHAM et al., 2002; BULGIN et al., 2003). Thus, genetic studies in natural populations are quite important for their conservation, since we can assess the levels of genetic diversity and gene flow, the presence of inbreeding, and even the existence of recent bottlenecks, assisting in the determination of population viability, as well as in their monitoring and managing (AMOS; HOELZEL, 1992; FRANCISCO et al., 2007; MÉNDEZ et al., 2011).

Microsatellites have been widely used for this purpose (HUDSON et al., 2000; BULGIN et al., 2003; FRANCISCO et al., 2007; MÉNDEZ et al., 2011). Since they are spread through the eukaryotic and prokaryotic genomes, and most of the loci occur in non-coding regions, it is suggested that they may be neutral markers. These features, combined with the great advance of statistical analyses for this kind of marker, lead microsatellites to be an informative tool for population genetic studies, and for assessing relatedness levels among individuals (PRITCHARD et al., 2000; JONES et al., 2002).

Nevertheless, the advance of sequencing technologies comes together with the rise of different types of molecular markers. With the next-generation sequencing (NGS), methodologies that use a large number of markers have become more common. Moreover, the increment of new technologies has reduced the costs of genomic markers development and set up the analyses of even non-models species (PRIMMER, 2009; ALLENDORF et al., 2010;

AVISE, 2010; FRANKHAM, 2010b; ALLENDORF et al., 2013). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) stand as one of the molecular markers that have been currently analyzed by NGS technologies (HOHENLOHE et al., 2010, 2011; BAXTER et al., 2011; ANDERSON et al., 2012). Although their loci are often biallelic, the number of loci is often higher than other markers, making SNPs very useful to study genetic variation and other population parameters, such as relationships among individuals, gene flow, and population structure (MORIN et al., 2004; SEEB et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013).

The high-throughput sequencing of some individuals from different populations requires a large investment to develop SNPs. However, some cost-effective methodologies were established, which have made SNPs more accessible than before (SEEB et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013). Among these methods, Restriction site associated DNA sequencing (RAD-seq) has been more frequently used to analyze populations (BAIRD et al., 2008; DAVEY; BLAXTER, 2010).

The present study aimed to isolate SNPs through a RAD-seq methodology and verify the effectiveness of these markers on population genetic analyses of São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*), comparing to microsatellite data already obtained for the species.

Materials and Methods

RAD sequencing

RAD sequencing libraries were obtained for 21 DNA samples of *F. paludicola* collected at two marshes areas located in the Tietê River Basin, near São Paulo metropolitan region, in southeastern Brazil. Thirteen bird samples were from Mogi das Cruzes marsh area (MC) (23°32'S, 46°07'W, altitude: 688 m, around 40 ha), and eight samples were from Salesópolis marsh area (SL) (23°34'S, 45°49'W, altitude: 866 m, around 25 ha). DNA samples were individually digested using two restriction enzymes (*EcoRI* and *SbfI*), and linked to Illumina sequencing specific adaptors (P1 and P2). The P1 adaptor had six bases barcodes (which differs at least in three nucleotides from each other) that identify each individual. The digested fragments were size selected through agarose electrophoresis using a gel slice comprising around 300 and 450 bp fragments. After libraries quantification and amplification, a pooled library composed by the 21 DNA samples was used to run a 50 bp single-read sequencing. This run was performed in 20% of a lane on a HiSeq 2000 platform at

the Nucleic Acid Shared Resources facility (NASR) at Ohio State University Comprehensive Cancer Center (OSUCCC-James). Sequence data were processed and RAD-tags loci were identified using the script AftrRAD v.2.4 (<https://u.osu.edu/sovic.1/downloads/>).

Microsatellite genotyping

Seventeen microsatellite loci were previously analyzed (Camargo et al., in prep-a) using the 21 DNA samples of *F. paludicola* that were used in RAD-seq methodology. PCR reactions details and amplification conditions were described in Camargo et al. (in prep-a). Amplified products were run on an ABI 3500 sequencer, and allele sizes were scored using the software program GENEMARKER 2.4.0 (Softgenetics).

Genetic analyses and effective population size

Genetic parameters, such as heterozygosity deficits, and F_{ST} value were calculated using software GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Effective population size of *F. paludicola* was accessed using the linkage disequilibrium method implemented by NEESTIMATOR v2 (DO et al., 2014), using Monogamy mating – a feature that was inferred by the reproduction system of a sister-species (*F. acutirostris*) of *F. paludicola* (REINERT, 2008) – and a critical value to discard rare alleles of 0.02.

Results

High-throughput sequencing generated more than 31 million of raw reads. From this total, 25 million passed the quality filtering (79.6%), and the number of reads per individual was around 1,200,000. We were able to identify 1,227 SNPs loci through the analysis of 21 *F. paludicola* samples. All of these loci were scored in all individuals, but only 931 loci (75.9%) were polymorphic in both populations. Although the remaining loci (24.1%) presented two or three alleles in one population, they were monomorphic in the other one, presenting only homozygous individuals.

Population analyses with these markers revealed a highly significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (significant heterozygous deficit) for MC population ($P = 0.000$), but no deviation for SL population ($P = 0.959$) (Table 3.1). On the other hand,

microsatellite loci did not show any significant heterozygous deficit for neither the populations (MC: $P = 0.091$; SL: $P = 0.923$).

Table 3.1 – Comparisons between microsatellite and SNPs data. Number of analyzed individuals (N), observed (H_O) and expected (H_E) average heterozygosities, heterozygotes excess probability (P) found in two populations of the São Paulo marsh antwren. (SD: Standard Deviation).

Population	N	Microsatellites			SNPs (RAD-tags)		
		H_O (SD)	H_E (SD)	P	H_O (SD)	H_E (SD)	P
Mogi das Cruzes	13	0.69 (± 0.16)	0.71 (± 0.13)	0.091	0.33 (± 0.02)	0.35 (± 0.01)	0.000*
Salesópolis	8	0.71 (± 0.18)	0.66 (± 0.14)	0.923	0.32 (± 0.02)	0.31 (± 0.02)	0.959

Data on SNPs loci evidenced that the effective population sizes were 51.9 (CI95%: 50.3-53.6) for MC, and 13.7 (CI95%: 13.3-14.0) for SL. Using microsatellites markers, effective population sizes were 69.5 (CI95%: 39.4-211.0) for MC, and 11.6 (CI95%: 6.9-20.6) for SL. Genetic differentiation between MC and SL populations, obtained through the use of both molecular markers, was highly significant ($P < 0.0001$), and F_{ST} values were 0.10 using SNPs, and 0.12 with microsatellites.

Discussion

The RAD sequencing approach used in the present work proved to be a suitable source of SNPs in *F. paludicola*, providing thousands of co-dominant markers that could be broadly used on population genetic analyses of this critically endangered species.

The preliminary analyses that were performed on 21 individuals of *F. paludicola* evidenced a reasonable number of SNPs loci that were monomorphic in one of the analyzed populations. This result could be due to (1) adaptive or functional association of these SNPs with coding regions, which may cause different alleles fixation in distinct populations, or (2) an ascertainment bias on the SNPs loci caused by the reduced sample size used in this primary analysis, which lead to an underrepresented identification of SNPs loci with rare alleles (e.g., not recognizing these alleles, and making the loci monomorphic) (HOHENLOHE et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013; KRÜCK et al., 2013). Indeed, Kruck et al. (2013) found a similar result analyzing cryptic speciation in the Australian sea mullet (*Mugil cephalus*), and called these loci as “diagnostic SNPs”, once they could help to assign each individual to the origin population. Moreover, due to the fixation of different alleles in each population, diagnostic

SNPs may cause a high genetic differentiation between them (ALLENDORF et al., 2013; HOHENLOHE et al., 2013).

The F_{ST} value between the analyzed populations, that was obtained using SNPs data, was not different from the observed value using a more traditional marker – microsatellite loci. This suggests that, at least for genetic differentiation analyses of populations with a highly pronounced structure, as found in *F. paludicola* (Camargo et al., in prep-b), SNPs could be considered suitable markers. Otherwise, SNPs do not have the potential of microsatellites to detect subtle population differentiations lower than 0.005, which could be an evidence that the population should be managed as separate units (DEFAVERI et al., 2013; KRÜCK et al., 2013).

Microsatellites evidenced higher genetic variation levels than SNPs in *F. paludicola* samples. Some studies correlate this divergence to differences in the mutations patterns of each molecular marker. Microsatellites present a mutation rate of about 10^{-2} - 10^{-4} per generation while single nucleotide substitutions are estimated to be between 1×10^{-9} and 5×10^{-9} per nucleotide and per year at neutral positions (ELLEGREN, 2000; ALLENDORF et al., 2013; DEFAVERI et al., 2013; LOZIER, 2014). Therefore, the probability of two independent base changes occurring at a single position is very low (VIGNAL et al., 2002).

The present results corroborate other data based on differences between microsatellites and SNPs loci. Kruck et al. (2013) showed that SNPs were less robust to detect genetic diversity within a population, as more than six SNPs would be necessary to have the same variation levels (e.g., allelic richness) as one microsatellite locus. DeFaveri et al (2013) also associated the lack of correlation between markers to ascertainment bias, and Lozier (2014) showed that these differences could be due to the inclusion of loci under strong selection in the analyses.

Even though SNPs are generally only a biallelic type of marker, their allele nomenclature is much simpler than for microsatellites. While inconsistencies in allele size calling can be common with microsatellites, SNPs results can be coded as just the presence or absence of each of the two alleles (VIGNAL et al., 2002). Therefore, the new opportunities provided by next-generation sequencing technologies such as the RAD-seq approach are very relevant to population and conservation genetics studies, once they facilitate the development of different molecular markers. Nevertheless, it is important to diagnose the impact of distinct DNA markers on genetic analyses (DEFAVERI et al., 2013) in order to choose a more appropriate approach for each question. In the present work, correlated data on population differentiation (F_{ST}) and effective population size were obtained by microsatellites and SNPs

loci, although divergences in the genetic variability results could be evidenced by these two different markers. The pertinence of using SNPs in order to understand the population dynamics of *F. paludicola*, specially joined with other molecular markers as microsatellites, should be increased with the use of a higher number of sampled individuals, a fact that could equate and consolidate genetic analyses on this critically endangered species.

CAPÍTULO 4

Camargo C, Costa MC, Silveira LF, Wasko AP and Francisco MR (em preparação).

Triplody in São Paulo Marsh Antwren provides further evidences for the role of W chromosome on sex determination in passerine birds.

Triplody in São Paulo Marsh Antwren provides further evidences for the role of W chromosome on sex determination in passerine birds

Abstract

We reported a putative triploid individual of *Formicivora paludicola* (São Paulo marsh antwren) a critically endangered species that occurs in 15 localities abroad small and isolated marshes near São Paulo city (São Paulo, Brazil). This individual presented three alleles in several analyzed microsatellite loci, plumage pattern of a young male, but molecular sexing as a female bird, which indicates the occurrence of a potential ZZW triploid pattern. This finding provided an opportunity to discuss the mechanisms of sex determination in avian species.

Keywords: Thamnophilidae; *Formicivora*; triploidy; microsatellite loci; sex determination; birds

Several cases of triploidy have been found in birds (TIERSCH et al., 1991; BONAMINIO; FECHHEIMER, 1993; GRAVES, 2003; ARLT et al., 2004; NAKAGAWA, 2004; FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010; KÜPPER et al., 2012). This phenomenon often leads to the death of the affected individuals during the embryo development (GRAVES, 2003; FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010; KÜPPER et al., 2012), or has implications on fertility aspects, such as inappropriate development of the gonads, abnormal sperm parameters, and poor reproductive performance (BONAMINIO; FECHHEIMER, 1993; ARLT et al., 2004; NAKAGAWA, 2004). Although studies reporting triploid birds that have survived in nature are rare, Artl et al. (2004) and Küpper et al. (2012) have observed adult females of the great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*) and of the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*), respectively, that lived normally, were fertile and have reproduced successfully in natural populations.

The findings of wild triploid birds provide rare opportunities to evaluate the mechanisms of sex determination. There are two main models that attempt to explain sex determination in birds (*Z Dosage* and *W Domination* models), and they open an important debate on the role of the W chromosome on the development of sexual characteristics (CLINTON, 1998; CLINTON; HAINES, 1999; ARLT et al., 2004; NAKAGAWA, 2004; SMITH et al., 2009; ELLEGREN, 2011; KÜPPER et al., 2012). The *Z Dosage* model suggests that the number of Z chromosomes would influence on the determination of sex in birds, and it includes the involvement of *DMRT1* gene in the definition of the male sex (CLINTON, 1998; CLINTON; HAINES, 1999; KÜPPER et al., 2012). The *W Domination* model postulates that a specific gene in W chromosome may have an important role on the regulation of *DMRT1* gene expression (TERANISHI et al., 2001; ELLEGREN, 2002; ARLT et al., 2004; SMITH et al., 2009).

All the studies reporting the occurrence of wild triploid individuals in non-Galliformes birds have analyzed species that did not present sexual dimorphism (TIERSCH et al., 1991; ARLT et al., 2004; KÜPPER et al., 2012). Therefore, it would be difficult to confirm the effects of an extra chromosome in the individual phenotype and in its sexual determination. In this study, we report a putative triploid in the São Paulo marsh antwren (*Formicivora paludicola*), a Neotropical small Thamnophilidae passerine. The marsh antwren was recently described as an endemically species of Atlantic Forest marshes from São Paulo State (Brazil) and it is already critically endangered due to habitat destruction. Males and females of this species present remarkable sexual dimorphism (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013).

Most of the studies reporting triploidy in birds were based on the detection of microsatellite genotypes with three alleles, instead of two, as it is expected for diploid species (ARLT et al., 2004; FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010; KÜPPER et al., 2012). Indeed, microsatellite genotyping has been proved to be an accurate tool to detect triploid individuals in a population (BAI et al., 2011; HERNÁNDEZ-URCERA et al., 2012).

In order to analyze the genetic variability and gene flow levels between two populations of *F. paludicola* (Mogi das Cruzes (MC): 23°32'S, 46°07'W, and Salesópolis (SL): 23°34'S, 45°49'W), DNA samples of 44 individuals (26 from MC and 18 from SL) were used to amplify 17 microsatellite loci, as described in Camargo et al (in prep-a). Amplified products were run on an ABI 3500 sequencer, and allele sizes were scored using the software GENEMARKER 2.4.0 (Softgenetics). Since young males present a female-like plumage, all individuals were molecular sexed using the method described in Han et al. (2009) that uses three primers, two of which amplify an intron of the *CHD-W* and *CHD-Z* genes – and the third one amplifies a unique sequence in W chromosome –, in order to confirm the identified morphological gender.

Among all screened samples, one individual from SL (SL14) presented an extraordinary pattern of three alleles, a character that was observed for eight of the 17 analyzed microsatellite loci (47.1%) (Table 4.1, Figure 4.1B).

Table 4.1 – Genotypes of a putative triploid individual of *Formicivora paludicola*, based on 17 microsatellite loci.

Analyzed locus	SL14 alleles
Fpa11	395/443
Fpa13	393/393
Fpa14	588/588
Fpa15	216/262
Fpa17	456/460/464
Fpa18	368/372/376
Fpa23	231/243/249
Fpa24	444/459
Fpa25	268/268
MyEx19	298/307/313
MyEx41	247/255/259
MyEx46	298/322/330
Mex034	259/267/271
Mex120	227/443
Mex140	204/220/232
Mex162	236/252
Mex176	226/234

It is known that three alleles in microsatellite loci may be a signal of (1) methodological artifacts, such as PCR or genotyping errors, or DNA contamination; or (2) chromosomal abnormalities (e.g., triploidy or trisomy) (FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010). Then, DNA was re-extracted and PCR reactions were repeated three times. Also, individual SL14 genotype was compared to others individuals genotypes. The revealed reproducibility of the results eliminated contamination or amplification problems possibilities. As the identification of triallelic microsatellite genotypes has been commonly observed in several triploid animals, including amphibians (CHRISTIANSEN, 2005), fishes (BAI et al., 2011; HERNÁNDEZ-URCERA et al., 2012), and also birds species (ARLT et al., 2004; FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010; KÜPPER et al., 2012), it is reasonable to assume a triploidy case report in *F. paludicola*. Moreover, since no significant linkage disequilibrium was detected for any of the analyzed microsatellites (Camargo et al., in prep-a), we can suppose that these markers should be located even in different chromosomes.

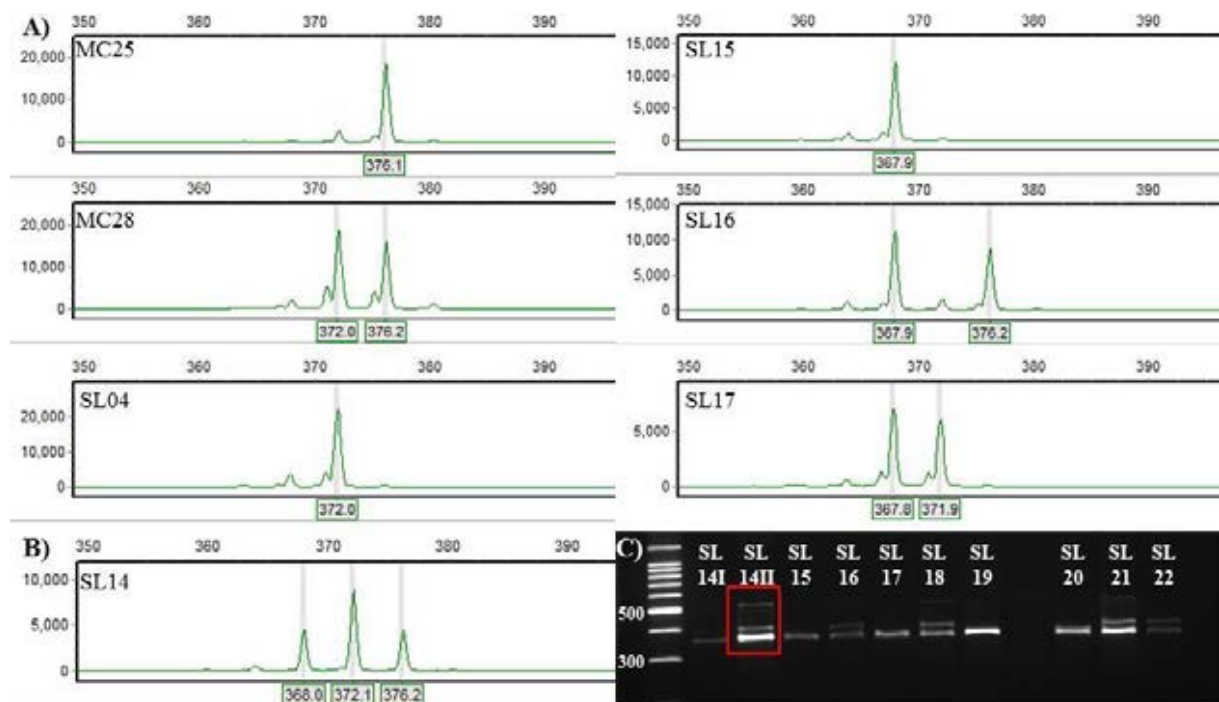


Figure 4.1 – Microsatellite genotypes of *Formicivora paludicola* at locus Fpa18. (A) Genotypes of six diploid individuals; (B) Genotype of a putative triploid sample (SL14); (C) 1% agarose gel showing *CHD* gene bands patterns, and highlighting the female-like-pattern (red square) of SL14 sample. SL14I and SL14II represent, respectively, the first and the second DNA sample extracted from blood. 500 and 300 represent the band size of the ladder used, and they are in base pairs. Source: Camargo, C. (2014).

Other intriguing traits could also be observed in SL14 bird, such as its morphological and molecular DNA sexing characteristics. Females of *F. paludicola* present a white plumage with black stripes, while adult males have a black chest plumage (Figure 4.2A

e B) (SILVEIRA, 2009; BUZZETTI et al., 2013). The studied individual showed characters of a young male, since it presented a female-like plumage in part of its chest, and a black color pattern in the flanks, present in adult males (Figure 4.2C). The obtained molecular sexing data revealed three different sized DNA fragments in agarose gel, which correspond to a Z and W pattern (Figure 4.1C, and Figure 4.2C). Triploid chickens with a ZWW genotype are not viable, whereas triploid ZZZ animals develop a male phenotype but produce abnormal sperm. However, triploid ZZW chickens initially develop female phenotypes and further develop male phenotypes (LIN et al., 1995). Bonaminio e Fechheimer (1993) and Graves (2003) reported that ZZW females of *Gallus gallus* might present intersex characters, and male reproductive characteristics. Therefore, the studied individual of *F. paludicola* could be a ZZW triploid correlated to an intersexual phenotype.



Figure 4.2 – Individuals of *Formicivora paludicola*, and their respective *CHD* gene band pattern. (A) Animal SL01: a diploid normal male, demonstrating the male plumage color pattern; (B) Animal MC29: a diploid female, demonstrating the female plumage color pattern; (C) Animal SL14: a putative triploid female, demonstrating its color pattern; (D) Animal MC25: a diploid young male, demonstrating the female-like plumage color pattern. Source: Camargo, C. (2014).

Our results corroborate previous findings for chickens' intersex phenotype (BONAMINIO; FECHHEIMER, 1993; GRAVES, 2003). The few available data for triploid non-Galliformes species (e.g. the great reed warbler and the Kentish plover) revealed that ZZW individuals were normal and reproductive females (ARLT et al., 2004; KÜPPER et al., 2012). However, these species do not present apparent sexual dimorphism, which would impede the detection of morphological intersex characteristics. Our main conclusion is that the presence of W chromosome will imply in female characteristics, as ZZ or ZZZ individuals would certainly present male phenotype. The intersex plumage, an observed character in ZZW individuals, may indicate, however, that the W chromosome could not balance the effect of duplicated Z chromosomes, a phenomenon that was previously suggested just for Galliformes. Therefore, this should also occur in other avian groups. Although the mechanism and genes involved in the role of W chromosome in sex determination is unknown, our finding gave support to the Z Dosage model.

5 DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo é um dos primeiros a analisar parâmetros genéticos em passeriformes Neotropicais que ocorrem em ambiente de brejo, além do estudo feito por Cardoni et al. (2013). Além disso, como a espécie *Formicivora paludicola* foi recentemente descrita, ainda não existem dados a respeito de sua variabilidade genética e estruturação populacional, sendo este o primeiro estudo que buscou a caracterização genética das duas maiores populações do bicudinho-do-brejo-paulista.

Com o objetivo de tornar as análises robustas, foi investido um grande tempo no desenvolvimento e validação de marcadores moleculares: tanto marcadores tradicionais – já há tempos utilizados em estudos populacionais de espécies ameaçadas – os microssatélites (HUDSON et al., 2000; PRITCHARD et al., 2000; ZANE et al., 2002; BULGIN et al., 2003; FRANCISCO et al., 2007), quanto marcadores genômicos que, nos últimos anos, vêm sendo cada vez mais utilizados para analisar aspectos evolutivos e populacionais, os SNPs (HOHENLOHE et al., 2010; SEEB et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013).

Os *loci* de microssatélites validados neste trabalho possibilitaram acessar, com alto grau de confiabilidade, os padrões de variabilidade genética de *F. paludicola*, tanto intra quanto interpopulacional, e averiguar os níveis de fluxo gênico entre duas populações desta espécie criticamente ameaçada do estado de São Paulo. Além disso, os marcadores desenvolvidos são os primeiros descritos especificamente para o gênero *Formicivora*, que inclui também outras três espécies brasileiras classificadas em altas categorias de ameaça internacional: a espécie-irmã de *F. paludicola*, o bicudinho-do-brejo (*F. acutirostris*), o formigueiro-do-litoral (*F. littoralis*) e o formigueiro-de-cabeça-negra (*F. erythronotos*) (IUCN, 2013). Após análises de amplificação cruzada, certamente estes marcadores poderão ser utilizados em estudos genéticos nestas espécies com a finalidade de auxiliar no planejamento de ações de conservação.

O isolamento dos *loci* de SNPs foi realizado através de um método – RAD-seq – que, embora venha sendo amplamente utilizado em diversos estudos populacionais (HOHENLOHE et al., 2010; ANDERSON et al., 2012; KELLER et al., 2012; PARCHMAN et al., 2013), ainda é incipiente no Brasil. Foram encontrados milhares de *loci* de SNPs e um número considerável destes (24,1%) mostrou-se diagnóstico (KRÜCK et al., 2013), sendo polimórficos em uma das populações e fixados para um alelo na outra. Esta característica peculiar destes marcadores pode ter sido gerada devido a um viés na definição dos *loci*, uma vez que o número de indivíduos utilizado no presente estudo foi reduzido (< 10) em uma das

populações e isto pode ter subestimado *loci* que possuam alelos raros; ou estes *loci* podem estar localizados próximos a regiões codificadoras, sofrendo pressão de seleção (HOHENLOHE et al., 2011; ALLENDORF et al., 2013; KRÜCK et al., 2013).

Com relação às análises populacionais, mesmo uma das áreas sendo o dobro em tamanho da outra – o que nos levaria a acreditar que a população da menor área estivesse sofrendo efeitos do tamanho populacional, como endocruzamento e deriva genética (LANDE; BARROWCLOUGH, 1987; SHAFFER, 1987; BULGIN et al., 2003), os resultados revelaram que ambas as populações estudadas estão em equilíbrio, indicando não estar ocorrendo endocruzamento nestas. Ademais, as populações possuem níveis comparáveis de variabilidade genética (não houve diferença significativa entre as riquezas alélicas), fato que pode ser relacionado com o gargalo populacional recente detectado nas análises, uma vez que a ocorrência deste fenômeno ocasiona uma perda drástica, e muito rápida, de diversidade alélica, o que pode ter baixado a riqueza alélica de MC (maior população) a níveis similares a de SL (menor população) (CORNUET; LUIKART, 1996).

A explicação mais adequada para a variabilidade genética encontrada em ambas as populações e para a ausência de endocruzamento, é a ocorrência de um equilíbrio migração-deriva, no qual os efeitos da deriva genética em populações pequenas são contrabalanceados pela migração de indivíduos (FRANKHAM et al., 2002; ALLENDORF et al., 2013). De fato, análises de migrantes de primeira geração detectaram dois indivíduos em cada população que não são oriundos delas, indicando a presença de migrantes em ambas. No entanto, os indivíduos encontrados em MC não foram atribuídos a SL e vice-versa, o que indica que os níveis de fluxo gênico entre estas duas populações é baixo ou inexistente. Dessa maneira, o fluxo gênico encontrado pela detecção de migrantes pode estar ocorrendo entre cada população e outras pequenas áreas de brejo ao redor delas, consistindo em uma dinâmica de metapopulações, o que de fato é comumente encontrado em espécies associadas a brejos (GIBBS, 2000).

As análises de estruturação populacional corroboram o baixo fluxo gênico entre as populações e indicam uma estruturação genética marcante entre MC e SL, o que sugere que, de fato, as áreas estão isoladas. As duas populações estudadas estão distantes cerca de 30 km entre si e entre elas há uma matriz antropizada, com o desenvolvimento de atividades agrícolas e pastoris, que pode estar limitando a dispersão dos animais. Ademais, existe um reservatório artificial no Rio Tietê de cerca de 2.800 ha (Reservatório de Ponte Nova) separando as populações (observação pessoal). Não foram encontradas populações de *F.*

paludicola nas margens do reservatório (BUZZETTI et al., 2013), o que indica que este pode ser uma importante barreira para o fluxo gênico.

Estes resultados podem também ser consequência de aspectos comportamentais de *F. paludicola*. Um trabalho realizado com sua espécie-irmã (*F. acutirostris*) demonstrou que os indivíduos desta espécie possuem limitada capacidade de dispersão, não conseguindo voar mais do que 25 metros sem pousar, e não atravessando áreas abertas (REINERT et al., 2007). As suas asas são pequenas e arredondadas, sem a presença de rêmiges primárias, típicas de aves que não voam longas distâncias (BATES, 2000), o que também é observado em *F. paludicola*. A partir destes dados, podemos inferir que a limitada capacidade de dispersão é também uma característica desta espécie.

A estruturação populacional encontrada foi similar utilizando os dois tipos de marcadores moleculares, tanto microssatélites quanto SNPs. Os microssatélites apresentaram uma razoável proporção (~25,0%) de alelos privados, sendo que MC abriga cerca de 32,0% de alelos exclusivos e SL 15,0%. Já os SNPs apresentaram 25,0% dos *loci* como SNPs diagnósticos, sendo monomórficos em uma das populações. Estes fatores certamente contribuíram para a detecção de uma diferenciação tão marcante entre as populações, uma vez que frequências alélicas distintas em cada população aumentam a divergência genética entre elas (LANDE; BARROWCLOUGH, 1987; SHAFFER, 1987; BULGIN et al., 2003).

Por outro lado, com relação aos níveis de variabilidade genética, os valores encontrados diferiram e foram maiores para os microssatélites. Os resultados distintos podem ser devido aos diferentes modelos mutacionais sofridos por cada marcador, com os SNPs possuindo menor probabilidade de sofrer mutação do que os microssatélites, o que os tornaria menos variáveis (ELLEGREN, 2000; VIGNAL et al., 2002; ALLENDORF et al., 2013; DEFAVERI et al., 2013; LOZIER, 2014). Outros fatores que poderiam explicar a diferença são (1) um viés na identificação dos *loci* de SNPs, devido ao reduzido número de indivíduos utilizados para o desenvolvimento destes e (2) a existência de *loci* de SNPs submetidos a forte seleção (DEFAVERI et al., 2013; LOZIER, 2014).

Outro fato interessante demonstrado neste trabalho foi a detecção de um provável triplóide entre os indivíduos amostrados. Esta característica foi observada devido a diferenças no padrão dos alelos de alguns *loci* de microssatélites, que possuíam três alelos ao invés de dois, como é esperado para espécies diploides. Este fenômeno, que já foi identificado em outras aves (TIERSCH et al., 1991; BONAMINIO; FECHHEIMER, 1993; GRAVES, 2003; ARLT et al., 2004; NAKAGAWA, 2004; FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010; KÜPPER et al., 2012) geralmente ocorre em uma frequência muito baixa nas populações (1,0-3,0%)

(BONAMINIO; FECHHEIMER, 1993; FORSTMEIER; ELLEGREN, 2010). A inferência a respeito da triploidia do indivíduo foi realizada com base em seu padrão de coloração, nos resultados de sexagem molecular e nos padrões trialélicos de diversos *loci* de microssatélites, corroborando dados anteriores em diferentes espécies de vertebrados de que os padrões de três picos/alelos são adequados para identificação de potências triplóides (CHRISTIANSEN, 2005; BAI et al., 2011). O padrão fenotípico encontrado para este indivíduo triplóide de *F. paludicola* foi condizente com o encontrado em *Gallus domesticus*, uma vez que apresentou padrão fenotípico intersexo (BONAMINIO; FECHHEIMER, 1993; GRAVES, 2003).

De maneira geral, os resultados encontrados permitem sugerir que, pelo fluxo gênico entre MC e SL ser baixo, a realização de translocações artificiais entre as áreas não seria uma estratégia de manejo adequada num primeiro momento, pois não se sabe se isto poderia causar uma depressão exogâmica devido a forte estruturação genética encontrada entre as populações (STORFER, 1999). Sugere-se que a ação prioritária de conservação de *F. paludicola* seja a proteção das duas maiores áreas de ocorrência conhecidas (MC e SL) e das áreas menores ao redor que podem estar fomentando uma dinâmica de metapopulações. A manutenção destas áreas é de extrema importância para a manutenção da viabilidade populacional do bicudinho-do-brejo-paulista em longo prazo.

6 CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo, foi possível caracterizar e validar um número satisfatório de marcadores moleculares, sendo 17 *loci* polimórficos de microssatélites (nove específicos e oito heterólogos) e 1.227 *loci* de SNPs (sendo 25,0% SNPs diagnósticos), que foram utilizados para acessar novas informações a respeito das características genéticas de duas populações (Mogi das Cruzes e Salesópolis) de *F. paludicola*.

O desenvolvimento de microssatélites, por meio do sequenciamento de nova geração, se mostrou bastante eficiente, com 50% dos *loci* testados sendo polimórficos. A amplificação cruzada também foi satisfatoriamente útil, possibilitando validar mais marcadores de microssatélites para a espécie, tornando o conjunto de marcadores a serem utilizados mais robusto. A metodologia de RAD-seq também foi eficiente para o isolamento de *loci* de SNPs e estes marcadores se mostraram uma boa ferramenta para auxiliar na consolidação dos resultados.

Foi possível detectar um gargalo populacional recente em Mogi das Cruzes (a maior área de ocorrência), que pôde indicar o motivo pelo qual os níveis de variabilidade genética das duas populações analisadas de *F. paludicola* não diferiram entre si, mesmo Salesópolis representando a metade da área de Mogi das Cruzes, e possuindo um menor número estimado de indivíduos.

Ambos os marcadores possibilitaram detectar uma forte estruturação populacional entre Mogi das Cruzes e Salesópolis, que indicou baixos níveis de fluxo gênico. Como não houve evidência de endocruzamento nas populações e foram detectados possíveis indivíduos migrantes em cada uma das áreas amostradas, é possível que a manutenção da variabilidade genética esteja sendo realizada por meio de uma dinâmica metapopulacional entre cada população e áreas menores ao redor delas. Os marcadores microssatélites também possibilitaram detectar a ocorrência de um provável animal triplóide na população de Salesópolis.

Enfim, o trabalho realizado gerou resultados muito relevantes para a definição de ações para a conservação de *F. paludicola*. Baseando-se nestes dados, é possível inferir que a translocação artificial de indivíduos entre as maiores áreas de ocorrência conhecidas da espécie não é a melhor opção de manejo num primeiro momento. Portanto, é sugerido que a ação prioritária para a conservação desta espécie seja a proteção das duas áreas (Mogi das Cruzes e Salesópolis) e das áreas menores que estão auxiliando na manutenção da variabilidade genética destas populações. Estudos abrangendo outras populações de

bicudinho-do-brejo-paulista devem ser conduzidos para avaliar o nível de ameaça delas, uma vez que elas se encontram em áreas ainda menores do que as estudadas neste trabalho. Assim, será possível manter a viabilidade das populações em longo prazo e possibilitar a perpetuação desta espécie criticamente ameaçada endêmica do estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGREDA, A.; LIECKFELDT, D.; SCHMIDT, A.; PITRA, C. Characterization of polymorphic microsatellite loci in Castelnau's Antshrike, *Thamnophilus cryptoleucus* (Aves: Thamnophilidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 434–436, 2006.
- ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews. Genetics**, v. 11, n. 10, p. 697–709, 2010.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G.; AITKEN, S. N. **Conservation and the Genetics of Populations**. 2ª Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 602.
- AMOS, B.; HOELZEL, A. R. Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. **Biological Conservation**, v. 61, n. 2, p. 133–144, 1992.
- ANDERSON, J. L.; RODRÍGUEZ-MARÍ, A.; BRAASCH, I.; AMORES, A.; HOHENLOHE, P. A.; BATZEL, P.; POSTLETHWAIT, J. H. Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics. **PloS One**, v. 7, n. 7, 2012.
- ANGELONI, F.; WAGEMAKER, N.; VERGEER, P.; OUBORG, J. Genomic toolboxes for conservation biologists. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 2, p. 130–143, 17 2012.
- ANTONGIOVANNI, M.; METZGER, J. Influence of matrix habitats on the occurrence of insectivorous bird species in Amazonian forest fragments. **Biological Conservation**, v. 122, n. 3, p. 441–451, 2005.
- ARLT, D.; BENSCH, S.; HANSSON, B.; HASSELQUIST, D.; WESTERDAHL, H. Observation of a ZZW female in a natural population: implications for avian sex determination. **Proceedings of The Royal Society**, v. 271, p. 249–251, 2004.
- AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 665–669, 2010.
- BAI, Z.; LIU, F.; LI, J.; YUE, G. H. Identification of triploid individuals and clonal lines in *Carassius auratus* complex using microsatellites. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 3, p. 279–285, 2011.
- BAIRD, N. A.; ETTER, P. D.; ATWOOD, T. S.; CURREY, M. C.; SHIVER, A. L.; LEWIS, Z. A.; SELKER, E. U.; CRESKO, W. A.; JOHNSON, E. A. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. **PloS One**, v. 3, n. 10, 2008.
- BALARESQUE, P. Les microsatellites des génomes eucaryotes. **Médecine/Sciences**, v. 23, p. 729–734, 2007.
- BARNETT, J. R.; WOLTMANN, S.; STENZLER, L.; BOGDANOWICZ, S. M.; LOVETTE, I. J. Isolation and characterization of microsatellite markers from the chestnut-backed antbird, *Myrmeciza exsul*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 6, p. 1070–1072, 2007.

BATES, J. Allozymic genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. **The Condor**, v. 102, n. 4, p. 770–783, 2000.

BAXTER, S. W.; DAVEY, J. W.; JOHNSTON, J. S.; SHELTON, A. M.; HECKEL, D. G.; JIGGINS, C. D.; BLAXTER, M. L. Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. **PloS One**, v. 6, n. 4, 2011.

BELMONTE-LOPES, R. **Investigando o isolamento esplêndido da América do Sul: Filogenia e biogeografia histórica dos Thamnophilide (Aves: Passeriformes: Tyranni)**. 2013. 199 f. Tese (Doutorado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BONAMINIO, G. A.; FECHHEIMER, N. S. The gonadal histology of triploid chicken (*Gallus domesticus*) embryos. **Genetics Selection Evolution**, v. 25, p. 205–210, 1993.

BRAVO, G. A.; REMSEN, J. V.; WHITNEY, B. M.; BRUMFIELD, R. T. DNA sequence data reveal a subfamily-level divergence within Thamnophilidae (Aves: Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 1, p. 287–293, 2012.

BRESSAN, P.; KIERULFF, M.; SUGIEDA, A. **Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2009. 645 p.

BRUMFIELD, R. T.; TELLO, J. G.; CHEVIRON, Z. A.; CARLING, M. D.; CROCHET, N.; ROSENBERG, K. V. Phylogenetic conservatism and antiquity of a tropical specialization: army-ant-following in the typical antbirds (Thamnophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, n. 1, p. 1–13, 2007.

BRYANT, E.; REED, D. Fitness decline under relaxed selection in captive populations. **Conservation Biology**, v. 13, n. 3, p. 665–669, 1999.

BULGIN, N. L.; GIBBS, H. L.; VICKERY, P.; BAKER, A. J. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). **Molecular Ecology**, v. 12, n. 4, p. 831–844, 2003.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v. 28, n. 10, p. 1040–1050, 2006.

BUZZETTI, D. R. C.; BELMONTE-LOPES, R.; REINERT, B. L.; SILVEIRA, L. F.; BORNSCHEIN, M. R. A new species of *Formicivora* Swainson, 1824 (Thamnophilidae) from the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 21, n. 4, p. 269–291, 2013.

CAMARGO, C.; COSTA, M. C.; DEL RIO, G. C.; GIBBS, H. L.; GLENN, T. C.; BAGAL, U.; SILVEIRA, L. F.; WASKO, A. P.; FRANCISCO, M. R. (in preparation-a) **Novel and cross-amplified microsatellite loci for the critically endangered São Paulo Marsh Antwren, *Formicivora paludicola* (Aves: Thamnophilidae)**. *International Journal of Molecular Sciences*.

CAMARGO, C.; COSTA, M. C.; DEL RIO, G. C.; GIBBS, H. L.; SILVEIRA, L. F.; WASKO, A. P.; FRANCISCO, M. R. (in preparation-b) **High genetic structure between populations of the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (*Formicivora paludicola*)**. *Molecular Ecology*.

CARDONI, D. A.; GREENBERG, R.; MALDONADO, J. E.; ISACCH, J. P. Morphological adaptation to coastal marshes in spite of limited genetic structure in the Neotropical passerine *Spartonoica maluroides* (Aves: Furnariidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 109, n. 1, p. 78–91, 2013.

CASTOE, T. A.; POOLE, A. W.; KONING, A. P. J.; JONES, K. L.; TOMBACK, D. F.; OYLER-MCCANCE, S. J.; FIKE, J. A.; LANCE, S. L.; STREICHER, J. W.; SMITH, E. N.; POLLOCK, D. D. Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. **PloS One**, v. 7, n. 2, 2012.

CEPAGRI. **Clima dos Municípios Paulistas**. 2014. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>> Acesso em: 3 abr. 2014.

CHAVES-CAMPOS, J.; DEWOODY, J. A. The spatial distribution of avian relatives: do obligate army-ant-following birds roost and feed near family members? **Molecular Ecology**, v. 17, n. 12, p. 2963–2974, 2008.

CHRISTIANSEN, D. A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 190–193, 2005.

CLINTON, M. Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 457–465, 1998.

CLINTON, M.; HAINES, L. C. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 876–886, 1999.

COMINCINI, S.; LEONE, P.; REDAELLI, L.; GIULI, L.; ZHANG, Y.; FERRETTI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 112, n. 1-6, p. 415–420, 1995.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001–14, 1996.

DAVEY, J.; BLAXTER, M. RADSeq: next-generation population genetics. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, n. 5, p. 416–423, 2010.

DAVEY, J. W.; HOHENLOHE, P. A.; ETTER, P. D.; BOONE, J. Q.; CATCHEN, J. M.; BLAXTER, M. L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews. Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499–510, 2011.

DAWSON, D. A.; HORSBURGH, G. J.; KÜPPER, C.; STEWART, I. R. K.; BALL, A. D.; DURRANT, K. L.; HANSSON, B.; BACON, I.; BIRD, S.; KLEIN, A.; KRUPA, A. P.; LEE, J. W.; MARTÍN-GÁLVEZ, D.; SIMEONI, M.; SMITH, G.; SPURGIN, L. G.; BURKE, T. New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 475–494, 2010.

DEFAVERI, J.; VIITANIEMI, H.; LEDER, E.; MERILÄ, J. Characterizing genic and nongenic molecular markers: comparison of microsatellites and SNPs. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 3, p. 377–392, 2013.

DO, C.; WAPLES, R. S.; PEEL, D.; MACBETH, G. M.; TILLET, B. J.; OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 1, p. 209–214, 2014.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 832–839, 1996.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 12, p. 551–558, 2000.

ELLEGREN, H. Dosage compensation: do birds do it as well? **Trends in Genetics**, v. 18, n. 1, p. 25–28, 2002.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews. Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.

ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews. Genetics**, v. 12, n. 3, p. 157–166, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

FELDHEIM, K. A.; WOLTMANN, S.; KREISER, B. R. Characterization of 20 additional microsatellite loci for *Myrmeciza exsul* (Aves: Thamnophilidae: chestnut-backed antbird). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 404–408, 2010.

FIRME, D. H.; RAPOSO, M. A. Taxonomy and geographic variation of *Formicivora serrana* (Hellmayr, 1929) and *Formicivora littoralis* Gonzaga and Pacheco, 1990 (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae). **Zootaxa**, n. 2742, p. 1–33, 2011.

FORSTMEIER, W.; ELLEGREN, H. Trisomy and triploidy are sources of embryo mortality in the zebra finch. **Proceedings of The Royal Society**, v. 277, p. 2655–2660, 2010.

- FRANCISCO, M. R.; GIBBS, H. L.; GALETTI, M.; LUNARDI, V. O.; GALETTI-JUNIOR, P. M. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 23, p. 4908–4918, 2007.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, n. 2, p. 131–140, 2005.
- FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, 2010a.
- FRANKHAM, R. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 661–663, 2010b.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. New York: Cambridge University Press, 2002. p. 617.
- FU, Y. M.; LI, S. P.; WU, Y. F. Research technology and advances in avian conservation genetics. **Hebei Shifan Daxue Xuebao Ziran Kexue Ban**, v. 32, n. 3, p. 397–403, 2008.
- GALETTI, M.; GUEVARA, R.; CÔRTEZ, M. C.; FADINI, R.; VON MATTER, S.; LEITE, A. B.; LABECCA, F.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, C. S.; COLLEVATTI, R. G.; PIRES, M. M.; GUIMARÃES JR, P. R.; BRANCALION, P. H.; RIBEIRO, M. C.; JORDANO, P. Functional Extinction of Birds Drives Rapid Evolutionary Changes in Seed Size. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1086–1090, 2013.
- GALVÃO, A.; GONZAGA, L. P. Morphological support for placement of the Wing-banded Antbird *Myrmornis torquata* in the Thamnophilidae (Passeriformes: Furnariides). **Zootaxa**, n. 3122, p. 37-67, 2011.
- GIBBS, J. P. Wetland Loss and Biodiversity Conservation. **Conservation Biology**, v. 14, n. 1, p. 314–317, 2000.
- GONZAGA, L. A. P. **Análise Filogenética do gênero *Formicivora* Swainson, 1824 (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae) baseada em caracteres morfológicos e vocais**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- GONZAGA, L. A. P.; CARVALHÃES, A. M. P.; BUZZETTI, D. R. C. A new species of *Formicivora* Antwren from the Chapada Diamantina, eastern Brazil (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae). **Zootaxa**, v. 1473, p. 25–44, 2007.
- GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485–486, 1995.
- GRAVES, J. A. M. Sex and death in birds: A model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 101, p. 278–282, 2003.
- GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M. C.; ORR, K.; DAWSON, R. J. G. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1071–1075, 1998.

HACKETT, S. J.; ROSENBERG, K. V. Comparison of phenotypic and genetic differentiation in South-American Antwrens (Formicariidae). **The Auk**, v. 107, n. 3, p. 473-489, 1990.

HAN, J.; KIM, J. H.; KIM, S.; PARK, S. R.; NA, K. J. A simple and improved DNA test for avian sex determination. **The Auk**, v. 126, n. 4, p. 779-783, 2009.

HERNÁNDEZ-URCERA, J.; VERA, M.; MAGADÁN, S.; PINO-QUERIDO, A.; CAL, R. M.; MARTÍNEZ, P. Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v. 330-333, p. 179-184, 2012.

HODGES, E.; XUAN, Z.; BALIJA, V.; KRAMER, M.; MOLLA, M. N.; SMITH, S. W.; MIDDLE, C. M.; RODESCH, M. J.; ALBERT, T. J.; HANNON, G. J.; MCCOMBIE, W. R. Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. **Nature Reviews. Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1522-1527, 2007.

HOHENLOHE, P. A.; BASSHAM, S.; ETTER, P. D.; STIFFLER, N.; JOHNSON, E. A.; CRESKO, W. A. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 2, 2010.

HOHENLOHE, P. A.; AMISH, S. J.; CATCHEN, J. M.; ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Next-generation RAD sequencing identifies thousands of SNPs for assessing hybridization between rainbow and westslope cutthroat trout. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, Suppl. 1, p. 117-122, 2011.

HOHENLOHE, P. A.; DAY, M. D.; AMISH, S. J.; MILLER, M. R.; KAMPS-HUGHES, N.; BOYER, M. C.; MUHLFELD, C. C.; ALLENDORF, F. W.; JOHNSON, E. A.; LUIKART, G. Genomic patterns of introgression in rainbow and westslope cutthroat trout illuminated by overlapping paired-end RAD sequencing. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 3002-3013, 2013.

HUDSON, Q. J.; WILKINS, R. J.; WAAS, J. R.; HOGG, I. D. Low genetic variability in small populations of New Zealand kokako *Callaeas cinerea wilsoni*. **Biological Conservation**, v. 96, n. 1, p. 105-112, 2000.

IRESTEDT, M.; FJELDSÅ, J.; NYLANDER, J. A. A.; ERICSON, P. G. P. Phylogenetic relationships of typical antbirds (Thamnophilidae) and test of incongruence based on Bayes factors. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, p. 23, 2004.

ISLER, M. L.; ISLER, P. R.; WHITNEY, B. M. Use of vocalizations to establish species limits in antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae). **The Auk**, v. 115, n. 3, p. 577-590, 1998.

ISLER, M. L.; ISLER, P. R.; WHITNEY, B. M. Species Limits in Antbirds (Thamnophilidae): the Warbling Antbird (*Hypocnemis cantator*) Complex. **The Auk**, v. 124, n. 1, p. 11-28, 2007.

ISLER, M. L.; WHITNEY, B. M. Species Limits in Antbirds (Thamnophilidae): The Scale-Backed Antbird (*Willisornis poecilinotus*) Complex. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 123, n. 1, p. 1-14, 2011.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2.** 2013. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acesso em: 3 mar. 2014.

JONES, K. L.; GLENN, T. C.; LACY, R. C.; PIERCE, J. R.; UNRUH, N.; MIRANDE, C. M.; CHAVEZ-RAMIREZ, F. Refining the Whooping Crane Studbook by Incorporating Microsatellite DNA and Leg-Banding Analyses. **Conservation Biology**, v. 16, n. 3, p. 789–799, 2002.

KELLER, I.; WAGNER, C. E.; GREUTER, L.; MWAIKO, S.; SELZ, O. M.; SIVASUNDAR, A.; WITTEWER, S.; SEEHAUSEN, O. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 2848–2863, 2012.

KRÜCK, N. C.; INNES, D. I.; OVENDEN, J. R. New SNPs for population genetic analysis reveal possible cryptic speciation of eastern Australian sea mullet (*Mugil cephalus*). **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 715–725, 2013.

KÜPPER, C.; AUGUSTIN, J.; EDWARDS, S.; SZÉKELY, T.; KOSZTOLÁNYI, A.; BURKE, T.; JANES, D. E. Triploid plover female provides support for a role of the W chromosome in avian sex determination. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 787–789, 2012.

LANDE, R.; BARROWCLOUGH, G. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: SOULÉ, M. (Ed.). **Viable Populations for Conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

LAURANCE, S. G. W.; GOMEZ, M. S. Clearing Width and Movements of Understory Rainforest Birds. **Biotropica**, v. 37, n. 1, p. 149–152, 2005.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 203–221, 1987.

LIN, M.; THORNE, M. H.; MARTIN, I. C. A.; SHELDON, B. L.; JONES, R. C. Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 5, p. 1185–1197, 1995.

LOZIER, J. D. Revisiting comparisons of genetic diversity in stable and declining species: assessing genome-wide polymorphism in North American bumble bees using RAD sequencing. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 4, p. 788–801, 2014.

LUIKART, G.; ENGLAND, P. R.; TALLMON, D.; JORDAN, S.; TABERLET, P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. **Nature Reviews. Genetics**, v. 4, n. 12, p. 981–994, 2003.

MÉNDEZ, M.; TELLA, J. L.; GODOY, J. A. Restricted gene flow and genetic drift in recently fragmented populations of an endangered steppe bird. **Biological Conservation**, v. 144, n. 11, p. 2615–2622, 2011.

- MILLER, M. R.; DUNHAM, J. P.; AMORES, A.; CRESKO, W. A.; JOHNSON, E. A. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. **Genome Research**, v. 17, n. 2, p. 240–248, 2007.
- MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 4, p. 208–216, 2004.
- MOYLE, R.; CHESSER, R.; BRUMFIELD, R. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). **Cladistics**, v. 25, p. 386–405, 2009.
- NAKAGAWA, S. Is avian sex determination unique? Clues from a warbler and from chickens. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 10, p. 479–480, 2004.
- NEFF, B. D.; GROSS, M. R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. **Evolution**, v. 55, n. 9, p. 1717–1733, 2001.
- OOSTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- OUBORG, N. J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R. K.; HEDRICK, P. W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 4, p. 177–187, 2010.
- PARCHMAN, T. L.; GOMPERT, Z.; BRAUN, M. J.; BRUMFIELD, R. T.; MCDONALD, D. B.; UY, J. A. C.; ZHANG, G.; JARVIS, E. D.; SCHLINGER, B. A.; BUERKLE, C. A. The genomic consequences of adaptive divergence and reproductive isolation between species of manakins. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 12, p. 3304–3317, 2013.
- PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J. M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **Journal of Heredity**, v. 95, n. 6, p. 536–539, 2004.
- PRIMMER, C. R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B. P.; MØLLER, A. P.; ELLEGREN, H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**, v. 7, p. 471–482, 1997.
- PRIMMER, C. R.; PAINTER, J. N.; KOSKINEN, M. T.; PALO, J. U.; MERILÄ, J. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**, v. 36, p. 348–360, 2005.
- PRIMMER, C. R. From conservation genetics to conservation genomics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1162, p. 357–368, 2009.
- PRIMMER, C. R.; MØLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 365–378, 1996.
- PRIMMER, C. R.; ELLEGREN, H. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 8, p. 997–1008, 1998.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**, Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing, , 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 9–10, 1995.

REINERT, B. **Ecologia e Ccomportamento do Bicudinho-do-brejo (*Stymphalornis acutirostris* Bornschein, Reinert & Teixeira, 1995 – Aves, Thamnophilidae)**. 2008. 198 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

REINERT, B.; BELMONTE-LOPES, R.; BORNSCHEIN, M. R.; SOBOTKA, D. D.; CORRÊA, L.; PIE, M. R.; PIZO, M. A. Nest and Eggs of the Marsh Antwren (*Stymphalornis acutirostris*): The Only Marsh-Dwelling Thamnophilid. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 124, n. 2, p. 286–291, 2012.

REINERT, B.; BORNSCHEIN, M.; FIRKOWSKI, C. Distribuição, tamanho populacional, hábitat e conservação do bicudinho-do-brejo *Stymphalornis acutirostris* Bornschein, Reinert e Teixeira, 1995 (Thamnophilidae). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 15, n. 4, p. 493–519, 2007.

RICE, W. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223–225, 1989.

RIDGELY, R.; TUDOR, G. **The Birds of South America - Volume II: The Suboscine Passerines**. Austin: University of Texas Press, 1994. 814 p.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the World Wide Web for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Eds.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365–386.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2^a. ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? **Nature Reviews. Genetics**, v. 5, n. 1, p. 63–69, 2004.

SEEB, J. E.; CARVALHO, G.; HAUSER, L.; NAISH, K.; ROBERTS, S.; SEEB, L. W. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, Suppl. 1, p. 1–8, 2011.

SEGELBACHER, G.; CUSHMAN, S. A.; EPPERSON, B. K.; FORTIN, M. J.; FRANCOIS, O.; HARDY, O. J.; HOLDEREGGER, R.; TABERLET, P.; WAITS, L. P.; MANEL, S. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 375–385, 2010.

SEMLITSCH, R. D.; BODIE, J. R. Are Small, Isolated Wetlands Expendable? **Conservation Biology**, v. 12, n. 5, p. 1129–1133, 1998.

SHAFFER, M. Minimum viable populations: coping with uncertainty. In: SOULÉ, M. (Ed.). **Viable Populations for Conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVEIRA, L. F. Bicudinho-do-brejo-paulista: *Formicivora* aff. *acutirostris* (Passeriformes, Thamnophilidae). In: BRESSAN, P.; KIERULFF, M.; SUGIEDA, A. (Eds.). **Fauna Ameaçada de Extinção do Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2009. p. 209.

SILVEIRA, L.; STRAUBE, F. Aves Ameaçadas de Extinção no Brasil. In: MACHADO, A.; DRUMMOND, G.; PAGLIA, A. (Eds.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. p. 378–679.

SMITH, C. A.; ROESZLER, K. N.; OHNESORG, T.; CUMMINS, D. M.; FARLIE, P. G.; DORAN, T. J.; SINCLAIR, A. H. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. **Nature**, v. 461, p. 267–271, 2009.

SMITH, G. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, p. 528–535, 1976.

STORFER, A. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. **Biological Conservation**, v. 87, p. 173–180, 1999.

STRACHAN, T.; READ, A. **Human Molecular Genetics**. 4^a ed. New York: Garland Science, 2011. 781 p.

TEMPLETON, A. R.; ROBERTSON, R. J.; BRISSON, J.; STRASBURG, J. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5426–5432, 2001.

TERANISHI, M.; SHIMADA, Y.; HORI, T.; NAKABAYASHI, O.; KIKUCHI, T.; MACLEOD, T.; PYM, R.; SHELDON, B.; SOLOVEI, I.; MACGREGOR, H.; MIZUNO, S. Transcripts of the *MHM* region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the *DMRT1* locus. **Chromosome Research**, v. 9, n. 2, p. 147–165, 2001.

TIERSCH, T.; BECK, M.; DOUGLASS, M. ZZW autotriploidy in a blue-and-yellow macaw. **Genetica**, v. 84, p. 209–212, 1991.

UEZU, A.; METZGER, J. P.; VIELLIARD, J. M. E. Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. **Biological Conservation**, v. 123, n. 4, p. 507–519, 2005.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, 2002.

VUCETICH, J. A.; WAITE, T. A. Is one migrant per generation sufficient for the genetic management of fluctuating populations? **Animal Conservation**, v. 3, n. 3, p. 261–266, 2000.

WANG, J. Application of the One-Migrant-per-Generation Rule to Conservation and Management. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 332–343, 2004.

WEIR, B.; COCKERHAM, C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian Populations. **Genetics**, v. 16, p. 97–259, 1931.

YOUNG, D.; ALLARD, M. W.; MORENO, J. A.; MYIAMOTO, M. M.; RUIZ, C. R.; PÉREZ-VIEIRA, R. A. DNA fingerprint variation and reproductive fitness in the plain pigeon. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 225–227, 1998.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1–16, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Gel de poliacrilamida 7% apresentando o polimorfismo dos 10 *loci* de microssatélites desenvolvidos para *Formicivora paludicola*.

Locus Fpa11



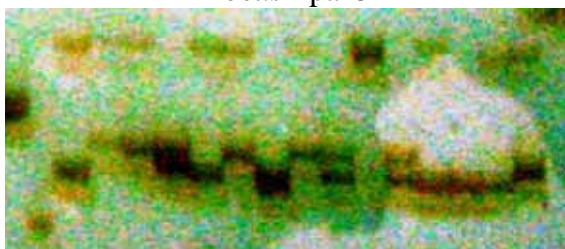
Locus Fpa13



Locus Fpa14



Locus Fpa15

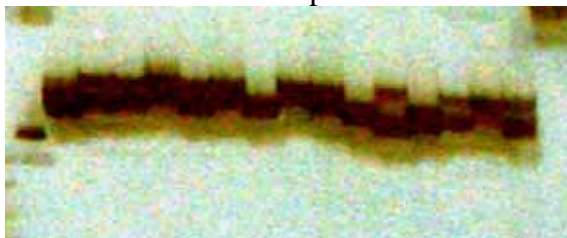


Locus Fpa17

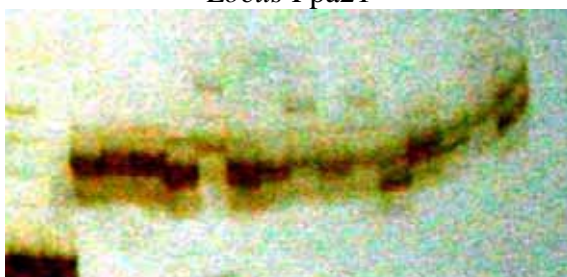


APÊNDICE A (continuação) – Gel de poliacrilamida 7% apresentando o polimorfismo dos 10 *loci* de microssatélites desenvolvidos para *Formicivora paludicola*.

Locus Fpa18



Locus Fpa21



Locus Fpa23



Locus Fpa24



Locus Fpa25



APÊNDICE B – Gel de poliacrilamida 7% apresentando o polimorfismo dos 10 *loci* de microssatélites heterólogos, desenvolvidos para *Myrmeciza exsul* e testados em *Formicivora paludicola*.

Locus MyEx19



Locus MyEx41



Locus MyEx46

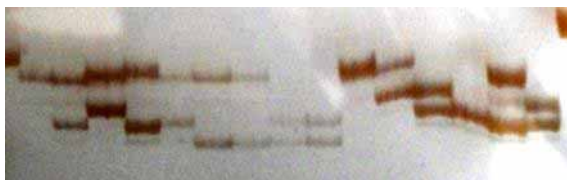


Locus Mex024

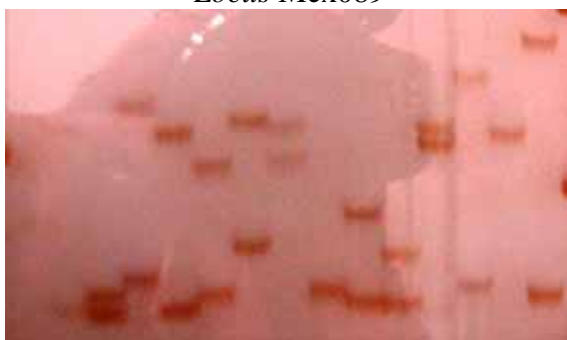


APÊNDICE B (continuação) – Gel de poliacrilamida 7% apresentando o polimorfismo dos 10 *loci* de microssatélites heterólogos, desenvolvidos para *Myrmeciza exsul* e testados em *Formicivora paludicola*.

Locus Mex034



Locus Mex089



Locus Mex120



Locus Mex140



Locus Mex162



APÊNDICE B (continuação) – Gel de poliacrilamida 7% apresentando o polimorfismo dos 10 *loci* de microssatélites heterólogos, desenvolvidos para *Myrmeciza exsul* e testados em *Formicivora paludicola*.

Locus Mex176

