

Citogenética e análise de diversidade genética em duas populações de *Pitangus sulphuratus* (Tyrannidae) estimada por marcadores microssatélites (resultados preliminares)

LETIANE NASCIMENTO DA PONTE¹; TIAGO MARAFIGA DEGRANDI; RAFAEL KRETSCHMER; FABIANO PIMENTEL TORRES; LÚCIA VINADÉ; RICARDO JOSÉ GUNSKI²; ANALÍA DEL VALLE GARNERO³

^{1,2}Universidade Federal do Pampa – letitdp@hotmail.com

³Universidade Federal do Pampa – analiagarnero@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O Bioma Pampa é uma ecorregião exclusiva da América do Sul e, no Brasil, abrange somente o Rio Grande do Sul (RS). Esse bioma possui regiões ainda pouco estudadas e têm sido intensamente alterado, devido principalmente à cultura agropastoril, onde grandes extensões são convertidas em áreas agrícolas (BENCKE et al. 2003). Com isso, fauna e flora silvestres vêm sendo constantemente ameaçadas de extinção, e as aves podem ser consideradas um dos grupos mais atingidos. Várias podem ser as causas de perda de espécies, mas certamente um dos fatores mais importantes é a destruição dos habitats, que leva ao isolamento de populações cada vez menores, aumentando as chances de desaparecimento e reduzindo a diversidade genética (OLMOS, 2005).

A diversidade genética é uma variação biológica hereditária acumulada durante o processo evolutivo, gerada por mutação na sequência nucleotídica durante a replicação do DNA (SANTOS et al. 2009). De um modo geral, os locus microssatélites são os marcadores moleculares mais utilizados para estimar a variabilidade genética intra e inter populacional. Estes locus apresentam moderada taxa de mutação e constituem-se de uma sequência repetida de nucleotídeos em várias cópias que se distribuem aleatoriamente no genoma e podem ser observados como variações de peso molecular. Assim, estes marcadores se mostram uma excelente ferramenta para estudos populacionais, de conservação e manejo de recursos genéticos (MARTINS, 2007).

A Família Tyrannidae é uma das mais diversificadas entre as famílias de aves, tendo sua distribuição restrita às Américas e seus membros ocupando diversos nichos continentais, dentro de florestas e todos os estratos da estrutura vertical (FITZPATRICK, 1980). O bem-te-vi, *Pitangus sulphuratus* é a única espécie onívora da família Tyrannidae, e foi descrito citogeneticamente por GUNSKI et al. em 2000 apresentando $2n=78$ cromossomos.

O objetivo deste trabalho foi analisar o cariótipo e a diversidade genética de *P. sulphuratus* bem como comparar as populações de dois municípios (São Gabriel e Dom Pedrito) localizados no bioma Pampa.

2. METODOLOGIA

Para realização deste trabalho foram amostrados 14 exemplares de *P. sulphuratus*, provenientes dos municípios de São Gabriel (8 exemplares) e Dom Pedrito (6 exemplares) no estado do Rio Grande do Sul/Brasil. Conforme normas de licença do SISBIO nº 33860-1, código 18127894 data 08/06/2012 e da Comissão de ética no uso de animais - CEUA/UNIPAMPA.

Foi realizado o cultivo direto de medula óssea de acordo com GARNERO e GUNSKI (2000) para obtenção de células em metáfase. A determinação do número cromossômico e sexagem dos espécimes foi realizada a partir da observação de 30 metáfases por exemplar e o cariótipo individual foi montado de acordo com GUERRA et al. (2002).

Além disso, foram coletadas amostras de sangue para a extração de DNA genômico, utilizando Mini Kit de Extração de DNA (PureLink Genomic DNA Mini Kit–Invitrogen®) conforme instruções do fabricante.

Para as análises de diversidade genética, foram selecionados primers para quatro locus microssatélites (Sap104, Sap50, Sap96 e NF2930) descritos por BEHELER et al. (2006) e CORRÊA et al. (2009) que foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR. Os resultados da PCR foram conferidos com eletroforese em gel de agarose 1% e em gel Poliacrilamida 10% com uso da coloração de prata e então fotografados. As fotos dos géis foram analisadas no *software TotalLab* - Nonlinear Dynamics Ltd versão 2008, para quantificar o peso molecular dos alelos para cada locus em relação ao DNAladder 100pb. Estes valores foram agrupados em uma matriz do *software* Excel para análises. Os parâmetros de número de alelos por locus, frequência e diversidade alélica, identificação de alelos privados, heterozigiosidade esperada e observada foram estimados no software Genalex 6.41.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

P. sulphuratus apresenta $2n=78$ cromossomos, seu cariótipo é formado por 11 pares de macrocromossomos e o restante são considerados microcromossomos. O primeiro par cromossômico é identificado como o maior submetacêntrico do complemento, o restante são cromossomos acrocêntricos de diferentes tamanhos, à exceção do par 9 que é metacêntrico, estando de acordo com GUNSKI et al 2000. Os machos (Figura 1a) apresentam um par sexual homogamético (ZZ) submetacêntrico e as fêmeas possuem um par heterogamético (ZW), sendo o cromossomo W acrocêntrico pequeno.

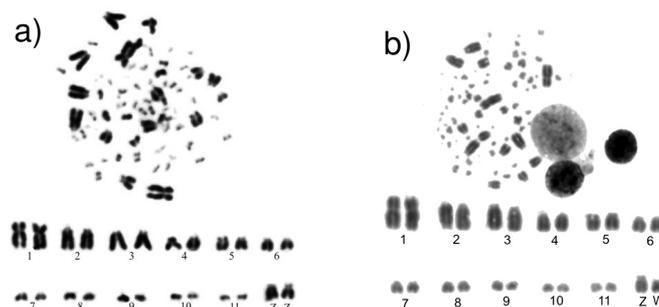


Figura 1: Metáfase e cariótipo parcial de um exemplar macho (a) e uma fêmea (b) de *Pitangus sulphuratus*, com $2n=78$

Para as análises de diversidade genética molecular, foram obtidos resultados dos quatro locus microssatélites (Sap104, Sap50, Sap96 e NF2930) em *Pitangus sulphuratus* em 14 exemplares (Tabela 1).

Todos os locus microssatélites avaliados, apresentaram número de alelos observados (N_a) superiores aos números esperados (N_e), indicando que *P. sulphuratus* exibe alta variabilidade genética, apesar do baixo número amostral. Além disso, Sap104 foi o locus que apresentou o maior número de alelos (6,5) neste trabalho, enquanto que BEHELER et al. (2007) observaram 12 alelos ao estudar 24 exemplares de *Sayornis phoebe*. Em relação a heterozigiosidade

observada, Sap96 foi o locus com maior valor $H_o=0,72$ enquanto que para BEHELER et al. (2007) o valor foi $H_o=0,81$ (Tabela 1).

Tabela 1: Média de Índices de diversidade genética em *P. sulphuratus* baseada em quatro locus microssatélites.

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
Sap 104	6,50	6,50	4,73	0,71	0,78	0,09
Sap50	6,00	5,00	3,48	0,52	0,57	0,18
Sap96	6,00	6,00	4,69	0,72	0,71	-0,01
NF2930	6,50	3,50	2,18	0,22	0,49	0,51
Média	6,25	5,25	3,77	0,54	0,64	0,19

N=número de amostras; Na= Número de alelos, Ne= número de alelos esperados, Ho= Heterozigiosidade observada, He= Heterozigiosidade esperada, F= índice de fixação.

As amostras analisadas foram divididas em duas populações de acordo com o local de origem: São Gabriel (SG), Dom Pedrito (DP) que foram confrontadas separadamente para comparações dos índices de diversidade (Tabela 2).

Tabela 2: Índices de diversidade genética de quatro locus microssatélites em duas populações de *P. sulphuratus*.

Locus	População											
	SG						DP					
N	Na	Ne	Ho	He	F	N	Na	Ne	Ho	He	F	
Sap 104	8	8,00	4,92	0,63	0,80	0,22	5	5,00	4,55	0,80	0,78	-0,03
Sap50	7	7,00	5,44	0,86	0,82	-0,05	5	3,00	1,52	0,20	0,34	0,41
Sap96	7	8,00	7,00	0,86	0,86	0,00	5	4,00	2,38	0,60	0,58	-0,03
NF2930	8	4,00	2,84	0,25	0,65	0,61	5	3,00	1,52	0,20	0,34	0,41
Média	7,50	6,75	5,05	0,65	0,78	0,20	5,00	3,75	2,49	0,45	0,51	0,19

N=número de amostras; Na= Número de alelos, Ne= número de alelos esperados, Ho= Heterozigiosidade observada, He= Heterozigiosidade esperada, F= índice de fixação.

O número médio de alelos para os exemplares de SG $Na=7,5$ foi superior ao observado para DP $Na=5$, indicando que SG apresenta maior diversidade genética. Este resultado pode ser influenciado pelo número amostral, no entanto com o aumento do número de exemplares estas diferenças podem diminuir.

Com a análise de distribuição e distância genética dos exemplares em coordenadas principais, dividiu-se os grupos genéticos em dois, no entanto foi observado que um dos exemplares de origem DP foi agrupado com os de SG, indicando a existência de migração (Figura 2).

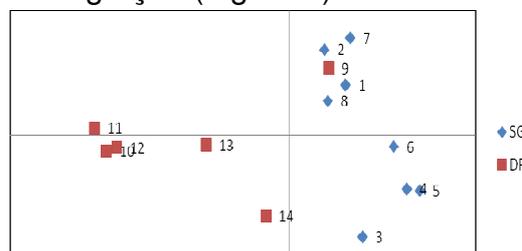


Figura 2: Distância genética entre espécimes de *P. sulphuratus* de duas populações, baseada em dados de quatro locus microssatélites.

4. CONCLUSÕES

Apesar do pequeno número de exemplares analisados foi possível observar que o locus Sap104 apresentou maior número de alelos e o locus NF2930 o menor. Quando confrontados os dados das populações, SG apresentou os maiores índices de diversidade em relação à DP.

Devido à restrição do número de exemplares amostrados permitidos no licenciamento, bem como das dificuldades de captura dos mesmos, o tamanho amostral ainda é baixo e com isso os resultados devem ser abordados com cautela. Espera-se que para o próximo ano seja possível incluir novas amostras e populações nestas análises.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEHELER, A. S.; FIKE, J. A.; RHODES JR, O. E. Eight new polymorphic microsatellite loci from the eastern phoebe (*Sayornis phoebe*). **Conserv Genet.** v.8, n.5, p.1259-126, 2007.

BENCKE, G. A., C. S. FONTANA., R. A. DIAS., G. N. MAURÍCIO.; J. K. F. MÄHLER, J. Aves. In: **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EDIPUCRS. Aves, p. 189-479, 2003.

CORRÊA, C.L.; COLLEVATTI, R. G.; CAPARROZ, R. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci for *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes) with Widely Cross Amplification in Neotropical Passerines. **Journal of Heredity.** v.101, n.3, p.385-389, 2009.

FITZPATRICK, J. W. Foraging behavior of neotropical *Tyrant flycatchers*. **Condor.** v.82, p.43-57, 1980.

GARNERO, A. V.; GUNSKI, R. J. Comparative analysis of the Karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **The nucleus.** v. 43, p. 64-70. 2000.

GUERRA, M.; Souza M. J. **Como observar cromossomos: Uma guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC-Editora, 2002.

GUNSKI, R. J.; CABANNE, G. S.; LEDESMA, M. A.; GARNERO, A. V. Análisis cariotípico de siete especies de tiránidos (*Tyrannidae*). **El Hornero. Revista de Ornitología Neotropical.** Buenos Aires, v.2, p. 103-109. 2000

MARTINS, J. M. **Prospecção de locos microssatélite e análise de variabilidade genética em uma população do Mato Grosso do Sul, visando a conservação da Arara Vermelha, *Ara chloroptera* (Psittacidae, Aves)**. 2007. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos.

OLMOS, F. Aves ameaçadas, prioridades e políticas de conservação no Brasil. **Natureza e Conservação**, Curitiba, v.3, n.1, p.21-42, 2005.

SANTOS, F. R.; LACERDA, D. R.; REDONDO, R. F.; NASCIMENTO, A. A.; SOUZA, E. C.; BORBA, E. L.; RIBEIRO, R. A. & LOVATO, M. B. Diversidade Genética. In: DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; GRECO, M. B.; VIEIRA, F. **Biota Minas: Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009. Cap. 4, p. 388-411.