

**GENETICA POBLACIONAL DE *Lepidocolaptes fuscus fuscus* VIEILLOT (AVES: DENDROCOLAPTIDAE): UN ENFOQUE PARA LA CONSERVACION DE LA SELVA ATLANTICA**

**POPULATION GENETICS OF *Lepidocolaptes fuscus fuscus* VIEILLOT (AVES: DENDROCOLAPTIDAE) AND THE ATLANTIC FOREST CONSERVATION**

**Gustavo Sebastián Cabanne<sup>1</sup>  
Cristina Yumi Miyaki<sup>2</sup>**

1. Licenciado en Genética. Dpto. de Biología, Inst. de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. cabanne@ib.usp.br
2. Ph. D. Dpto. de Biología, Inst. de Biociências, Universidade de São Paulo. cymiyaki@usp.br

**SUMMARY**

Many tropical birds present patterns of elevated intraspecific genetic differentiation. The study of genetic patterns in Atlantic forest birds could allow to identify geographic regions with high conservation priority. We present preliminary results of a study using cytochrome b sequences to access the genetic diversity and population differentiation of the forest bird *Lepidocolaptes fuscus*. Samples were collected in SE Brazil and Misiones - Argentina-. The results show genetic divergence between localities ( $F_{st}=0,5$ ,  $p<0,01$ ), with at least two groups with likely different evolutionary histories, those from São Paulo versus those from Paraná-Misiones. If these results are confirmed by the analysis of a broader sampling and presented by other species, they may be important for Atlantic forest conservation.

**Key words :** Atlantic forest, *Lepidocolaptes fuscus*, population genetics, mtDNA.

**RESUMEN**

Muchas aves tropicales presentan patrones de elevada diferenciación genética intraespecífica. Conocer estos patrones genéticos en la selva atlántica permitiría identificar regiones geográficas prioritarias para conservar. Presentamos resultados preliminares de un estudio basado en secuencias de citocromo b para acceder a la diversidad genética y diferenciación poblacional del ave *Lepidocolaptes fuscus*. Las muestras se colectaron en el SE de Brasil y Misiones -Argentina-. Los resultados demuestran diferenciación genética significativa entre las localidades ( $F_{st}=0,5$ ,  $p<0,01$ ) y sugieren al menos dos grupos de poblaciones con posibles historias evolutivas distintas, aquellas de São Paulo versus aquellas de Paraná-Misiones. De confirmarse estos resultados con muestras mayores y si son presentados también por otras especies, pueden ser importantes en la conservación de la selva Atlántica.

**Palabras clave:** Selva atlántica, *Lepidocolaptes fuscus*, genética de poblaciones, mtDNA.

## INTRODUCCION

La conservación biológica requiere identificar los distintos linajes de organismos existentes, proteger los ecosistemas que mantienen estos organismos y mantener las condiciones que generan nuevos linajes -evolución-. Globalmente se intenta resguardar los distintos ecosistemas y el proceso evolutivo a través de redes de reservas. Durante el establecimiento con bases científicas de estas reservas puede considerarse la riqueza de especies de distintas regiones, los grados de endemismo de especies y las regiones geográficas que alberguen clados de organismos con profunda diferenciación genética que aporten proporcionalmente a la diversidad regional (DA SILVA & PATTON, 1998).

La selva atlántica es prioridad en el ámbito de la conservación biológica global, debido a su diversidad de organismos y a que sus remanentes son menores al 10 % de su superficie original (MYERS et al, 2000). Las unidades de conservación de la selva atlántica poseen una configuración geográfica definida según criterios históricos, económicos y/o paisajísticos, siendo escasos los ejemplos donde intervinieron principios de biología de conservación en el establecimiento de estas.

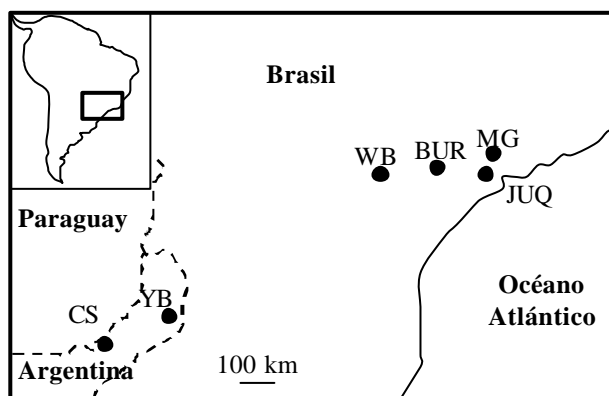
Los estudios genético poblacionales en aves tropicales son escasos, sin embargo, sugieren que estos organismos presentan patrones de diferenciación genética intraespecífica elevada frente a aves de zonas templadas (SEUTIN, 1993, SMITH et al, 2000, BATES, 2002). Distintos autores sugieren que estos niveles de diferenciación genética también podrían hallarse en otros organismos de los trópicos (BARROWCLOUGH & JOHNSON, 1988, DA SILVA & PATTON, 1998). El estudio de los patrones de diferenciación genética de las faunas puede ayudar a identificar y priorizar para su conservación aquellas regiones geográficas que alberguen clados de organismos con profunda diferenciación genética.

Presentamos aquí resultados preliminares de un estudio cuyo objetivo es describir la distribución de la diversidad genética mitocondrial y diferenciación genética poblacional del ave endémica de la selva atlántica *Lepidocolaptes fuscus fuscus* VIEILLOT. Hipotetizamos que las localidades estudiadas presentarían diferenciación genética significativa, en concordancia con otros estudios similares.

## MATERIALES Y METODOS

Las colectas en Brasil fueron en 1) Morro Grande -estado de São Paulo (23° 48'S 46° 49'O)-, 2) Juititaba- estado de São Paulo (23° 57'S 47° 3'O)-, 3) Buri- estado de São Paulo (23° 47'S 48° 34'O), 4) Wenceslau Braz- estado de Paraná (23° 50' S, 49° 47' O); y en la provincia de Misiones de Argentina, 5) Reserva Yabotí (26° 49'S, 54° 2'O) y 6) Campo San Juan (27° 23'S, 55° 40'O). En la **figura 1** se presenta el área de estudio y sitios de colecta. Para los análisis se agruparon las muestras de Campo San Juan y Reserva Yabotí.

**Figura 1: Localidades de colectas de *Lepidocolaptes fuscus*. Sampling localities of *Lepidocolaptes fuscus*. CS: Campo San Juan; YB: Reserva Yabotí; WB: Wenceslau Braz; MG: Morro Grande; JUQ: Juititaba.**



Cada ave capturada en la colecta de sangre se liberó sin perjuicio. El ADN total se extrajo de sangre entera aplicando una digestión con proteinasa K-SDS y purificación con fenol cloroformo (HILLIS et al, 1996). Se amplificó por PCR -Polymerase Chain Reaction- una porción del gen citocromo b con las condiciones y primers CBL15298 / CBH15764 de MIYAKI et al (1998). La secuenciación se realizó con terminadores marcados -Big Dye Terminator Kit ver 2.0 - Applied Biosystems Inc.- y un secuenciador ABI Prism 377.

Se estudió la diversidad génica  $H$  y nucleotídica  $p$  de cada localidad (PAGE & HOLMES, 1998). La genealogía de los haplotipos se estimó según el método de TEMPLETON et al (1992). Las localidades se agruparon por Neighbor-Joining-NJ- (SAITOU & NEI, 1987) de acuerdo a las distancias genéticas de REYNOLDS (1983). Se aplicó el método AMOVA -Analysis of Molecular Variance- de EXCOFFIER et al (1992) para estudiar la diferenciación genética entre las localidades con el programa Arlequin ver. 2.000 (SCHNEIDER et al, 2000). El método AMOVA permite estudiar como la variación genética observada en un conjunto de poblaciones es explicada según la base de diferencias genéticas dentro de poblaciones, entre poblaciones o entre grupos de poblaciones o regiones. Luego, esto permite estimar índices de fijación ( $F_{st}$ ,  $F_{ct}$  y  $F_{sc}$ ) para estudiar el grado de diferenciación genética entre poblaciones o localidades (EXCOFFIER et al, 1992).

## RESULTADOS

Se secuenciaron 392 pb del gen citocromo b de 33 individuos de *L. fuscus*. En la **tabla 1** se describen los parámetros de diversidad genética mitocondrial de cada muestra..

Se detectaron ocho posiciones variables y siete haplotipos con un máximo de 1,02% de variación entre las secuencias. Las localidades con mayor variación genética fueron las del estado de São Paulo en Brasil, y la muestra con menor diversidad fue la de Misiones en Argentina, con un solo haplotipo. Las muestras de São Paulo no compartieron haplotipos con las otras.

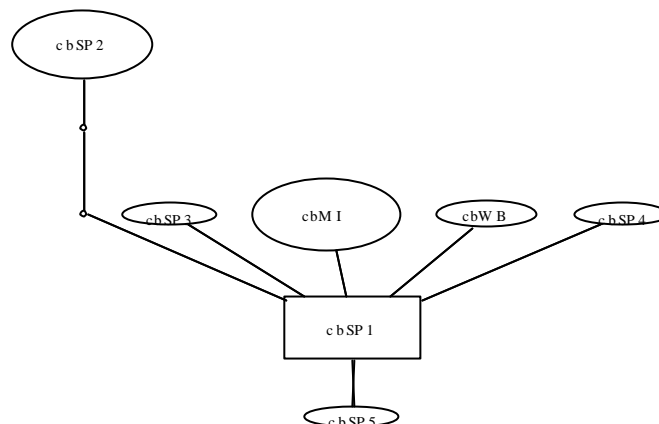
**Tabla 1: Diversidad genética y haplotipos de citocromo b en muestras de *Lepidocolaptes fuscus* del SE de Brasil y Misiones, Argentina. Genetic diversity and cytochrome b haplotypes in samples from SE Brazil and Misiones, Argentina.**

Localidad (Abreviación)	N	H	p	Haplotipos (n)
Morro Grande-(MG)	14	0.5824	0.004401	cbSP1(5), cbSP2(8), cbSP3(1)
Juquitiba-(JUQ)	4	0.8333	0.005102	cbSP1(2), cbSP2(1), cbSP5(1)
Buri-São Paulo, Brasil	2	1	0.002551	cbSP1(1), cbSP4(1)
Wenceslau Brás-(WB)	7	0,5714	0.002915	cbMI (4), cbWB(3)
Misiones-(MI) *	6	0	0	cbMI (6)

\* MI: conformada por muestras de Campo San Juan y Reserva Yabotí (ver Materiales y Métodos). N: tamaño de la muestra; H: diversidad génica; p: diversidad nucleotídica; n: número de haplotipos en cada muestra

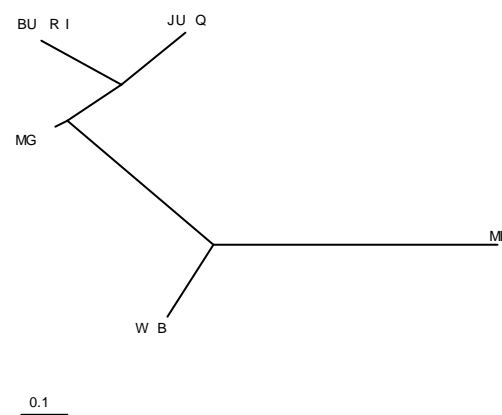
La relación genealógica entre los haplotipos se describe en la **figura 2**. La red de haplotipos no evidenció ninguna estructuración geográfica de la diversidad genética y el haplotipo cbSP1 de São Paulo tuvo mayor probabilidad de ser ancestral.

**Figura 2: Genealogía de los haplotipos. Haplotypes genealogy.** El tamaño de cada rectángulo ú ovalo representa la frecuencia relativa del haplotipo en la muestra total. Entre todos los haplotipos existió una sustitución de diferencia, excepto entre cbSP1 y cbSP2 donde existieron tres sustituciones.



La similitud genética entre las localidades según la base de distancias genéticas de Reynolds se presenta en la **figura 3**. Las muestras del estado de São Paulo formaron un clado levemente diferenciado de las otras muestras.

**Figura 3. Agrupamiento Neighbor-Joining no enraizado de las localidades utilizando distancias genéticas de Reynolds. Unrooted Neighbor-Joining tree of studied samples with Reynold's genetic distance.** MI: Misiones, WB: Wenceslau Braz, MG: Morro Grande, JUQ: Juquitiba.



Los resultados del estudio AMOVA indican que gran proporción de la diversidad genética observada se explica según la base de variaciones genéticas significativas entre localidades ( $F_{st}=0,5$ ,  $p<0,01$ ), sin que exista partición significativa de la diversidad genética entre las regiones sugeridas por la distribución de haplotipos (ver **tabla 1**), y el agrupamiento NJ (Paraná-Misiones versus São Paulo ( $F_{ct}=0,39$ ,  $p=0,089$ )). Por otro lado, la variación entre localidades dentro de cada región también fue significativa ( $F_{sc}=0,18$ ,  $p<0,01$ ). Sin embargo no descartamos la hipótesis de diferenciación entre ambas regiones, debido al reducido tamaño de cada muestra y a que la hipótesis nula de falta de diferenciación se aceptó con poca confianza ( $p=0,089$ ).

## CONCLUSION

La genealogía de los haplotipos no evidenció estructuración geográfica de la diversidad genética. Los valores de H y p son compatibles con los descriptos para otros passeriformes y no passeriformes (SEUTIN et al, 1993, FRY & ZINK, 1998), aunque una comparación estadística solo podría realizarse con mas muestras. En el agrupamientos NJ las muestras del estado de São Paulo formaron un clado levemente diferenciado. Esto puede sugerir diferenciación genética entre este clado y las otras localidades, o una relación consecuencia de la proximidad geográfica entre las localidades. El resultado del estudio AMOVA denota diferenciación genética significativa entre las muestras, a nivel global y a nivel regional, pero no confirman diferenciación significativa entre las dos regiones sugeridas (Paraná-Misiones versus São Paulo). Esta diferenciación genética intraespecífica significativa se describe también para aves tropicales, pero este es uno de los primeros trabajos que demuestra el fenómeno en una especie de la selva paranaense. Los resultados sugieren la existencia de al menos dos grupos de poblaciones con historias evolutivas distintas en *L. fuscus*, aquellas de São Paulo versus aquellas de Paraná-Misiones. Esto podrá corroborarse analizando muestras mayores.

La diferenciación genética intraespecífica significativa en aves tropicales como *L. fuscus* puede tener implicancias en conservación. En algunos casos esta diferenciación genética entre poblaciones es compatible con la observada entre géneros de regiones templadas (BERMINGHAM et al, 1992). Así, desde el punto de vista de la pérdida de variabilidad genética, la extinción de una especie en los trópicos podría ser equivalente a la extinción de mas de una especie de las regiones templadas. Para la conservación del acervo genético de especies como *L. fuscus*, con amplia distribución en la selva atlántica, no bastaría únicamente mantener una o pocas poblaciones viables a nivel local. Los resultados de este trabajo requieren confirmación con muestras mayores, pero sugieren que en el área estudiada, tanto las reservas en São Paulo como en Misiones, serían vitales para la conservación del ave, debido a que cada región presentaría conjuntos de poblaciones con identidad genética propia.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP- y al programa Education for Nature de World Wildlife Fund USA. A Alexandre Martensen y Renato Gaban Lima por ceder gentilmente las muestras del estado de São Paulo. Finalmente a Ernesto Rubén Krauckzuk, por la colaboración en las colectas en Argentina.

## BIBLIOGRAFIA

- BARROWCLOUGH, G. F., Johnson, N. K. 1988. Genetic structure of north american birds. Proceedings of the International Ornithology Congress 19: 1630-1645.
- BATES, M. J. 2002. The genetic effects of forest fragmentation on five species of Amazonian birds. Journal of Avian Biology 33: 276-294.
- BERMINGHAM, R. O., Rowher, S., Freeman, S., Wood, C. 1992. Vicariance biogeography in the pleistocene and speciation in north american wood warblers: a test of Mengel's model. Proceedings of the National Acadimcs of Science of USA 89: 6624-6628.
- DA SILVA, M. N. F., Patton, J. L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of amazonian mammals. Molecular Ecology 7: 475-486.

- EXCOFFIER, L. P., Smouse, S., Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FRY, A. J., Zink, R. M. 1998. Geographic analysis of nucleotide diversity and song sparrow (Aves: Emberizidae) population history. *Molecular Ecology* 7:1303-1313.
- HILLIS, D. M., Mable, B. K., Larson, A., Davis, S. K., Zimmer, E. Nucleic Acid IV: sequencing and cloning. *In* HILLIS, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds.). 1996. *Molecular Systematics*. pp. 321-381. Sinauer. Sunderland, M A.
- MIYAKI, C. Y., Mاتيoli, S. R., Burke, T., Wajntal, A. 1998. Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence. *Molecular Biology and Evolution* 15: 544-551.
- MYERS, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspot for conservation priorities. *Nature* 430: 853-858.
- PAGE, R. D. M., Holmes, E. 1998. *Molecular Evolution: a Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford .
- REYNOLDS, J., Weir, B. S., Cockerham, C.C. 1983. Estimation of coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
- SAITOU, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SCHNEIDER, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data Analysis. Dept. of Anthropology and Ecology, Univ. of Geneva. Switzerland.
- SEUTIN, G., Brawn, J., Ricklefs, R., Bermingham, E. 1993. Genetic divergence among populations of a tropical passerine, the streaked saltator (*Saltator albicollis*). *The Auk* 110: 117-126.
- SMITH, T. B., Holder, K., Girman, D., O'Keefe, K., Larison, B., Chan, Y. 2000. Comparative avian phylogeography of Cameroon and Equatorial Guinea mountains: Implications for conservation. *Molecular Ecology* 9:1505-1516.
- TEMPLETON, A. R., Crandall, K. A., Sing, C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonucleases mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.