

Flavia Torres Presti



**Caracterização da diversidade genética, da
estrutura populacional e do parentesco de
Arara-azul-grande (*Anodorhynchus
hyacinthinus*) por meio da análise de regiões
dos genomas nuclear e mitocondrial**



Orientadora: Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

VERSÃO CORRIGIDA

**São Paulo
2010**

Flavia Torres Presti

Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutora em Ciências, na área Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

VERSÃO CORRIGIDA

(A versão original se encontra disponível no Instituto de Biociências)

**São Paulo
2010**

Presti, Flavia Torres

Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise dos genomas nuclear e mitocondrial.

87 páginas

Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. *Anodorhynchus hyacinthinus* 2. genética populacional 3. análise de parentesco 4. microssatélites 5. mitocondrial. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Neiva M. R. Guedes

Profa. Dra. Yara M. Barros

Profa. Dra. Jaqueline M. Goerck

Profa. Dra. Alexandra Sanches

Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

Ao Patrick pelo amor, companheirismo e dedicação.

**Escalou, tirou sangue, carregou mochila, dirigiu,
sorriu, se divertiu, chorou, aguentou minhas
depressões, as distâncias, editou textos e figuras,
entre tantas outras coisas importantes para que
esse trabalho pudesse ser realizado.**

**“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando,
A certeza de que é preciso continuar,
A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar.
Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho
novo, da queda um passo de dança, do medo uma
escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”**

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, CNPq e Capes pelo auxílio financeiro e à Universidade de São Paulo (USP) pela acolhida.

À Cris Miyaki pela orientação, confiança e paciência em todos esses anos de convivência.

À professora Anita Wanjtal pela presença doce e discussões nos seminários.

Aos amigos de laboratório Adri, Fábio, Cibele, Pri, Henrique, Gustavo, Tiago, Zé, Rodrigo, Fefê, Fernando Horta, Jana e Danilo pelas risadas, discussões, momentos de “procrastinação” e todo apoio de sempre. Vocês são demais!

Um agradecimento especial ao Gustavo Cabanne e Henrique Batalha pela ajuda nas análises.

À Adri por sofrer para coletar amostras de araras-azuis e estar sempre pronta para me ajudar em tudo. Muito obrigada amiga!

À Ci que, com sua presença forte e seus conselhos reconfortantes, sempre me ajudou muito.

À Gisele Dantas e Fê Almeida pela ajuda nas análises e grande amizade.

À Maria pela ajuda com a arrumação do laboratório, à Lú pelas conversas e “galhos quebrados” na secretaria e Genu e Luzia pelo cafezinho. Sou muito grata por essa convivência.

À profa. Lourdes e prof. João Morgante por abrir seus laboratórios para podermos realizar alguns procedimentos.

Ao amigo e pai científico Renato Caparroz pelo carinho, ensinamentos e muita paciência. Obrigada!

Ao Projeto Arara-azul, especialmente Neiva Guedes por todas as oportunidades, amizade e conhecimentos sobre a espécie e à Grace que é e sempre será uma grande amiga.

Ao Paulo Antas pelas amostras e discussões de trabalho.

Ao Paulo Martuscelli, Carlos Yamashita, Zoológico de Brasília, Zoológico do Rio de Janeiro, Claudia Baider, Gleide Marciano, Zoológico de Boituva pelas amostras enviadas.

Ao querido Manoel Fontoura Rodrigues que, mesmo sem me conhecer, me ajudou muito. Obrigada!

Ao IBAMA pelas autorizações para coleta e transporte das amostras.

Ao Fred Drummond do ICMBio Carajás pelo apoio nas coletas e, principalmente por gostar e apoiar os trabalhos com as araras-azuis.

À Vale por auxiliar o nosso estudo com as araras no Carajás.

Ao Sr. Luis, Grace, Patrick, Jequissânia, Sr. Zé Galdino e todas as pessoas que nos ajudaram nas coletas.

Ao Luciano Candisani pelas belas fotos e sempre emprestá-las para os meus trabalhos.

À minha família que sempre me apoiou e acompanhou. Amo vocês. Em especial à minha irmã Thais (estou eternamente devendo esse agradecimento).

Aos meus grandes amigos que nunca me deixaram.

Aos meus novos amigos aqui no Maranhão que me ajudaram tanto na fase final da tese.

À vida que me deu a oportunidade de trabalhar nessa tese, viver muitos momentos maravilhosos e conhecer muitas pessoas especiais.

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract	02
CAPÍTULO 1. Introdução Geral.....	03
1.1. A genética e a conservação da biodiversidade.....	03
1.2 Os marcadores moleculares.....	04
1.2.1 Microssatélites.....	04
1.2.2 DNA Mitocondrial (DNAMt).....	05
1.3 Os psitacídeos.....	06
1.3.1. Arara-azul-grande (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>).....	07
Justificativa.....	10
Objetivos.....	11
CAPÍTULO 2. Caracterização da diversidade genética e da estrutura populacional da arara-azul-grande (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial.....	12
2.1 Introdução.....	12
2.2. Materiais e métodos.....	14
2.2.1 Amostragem.....	14
2.2.2 Análise de Microssatélites.....	16
2.2.3 Sequenciamento de DNA mitocondrial.....	18
2.2.4 Análise dos dados.....	20
2.3 Resultados.....	24
2.3.1 Microssatélites.....	24
2.3.2 Sequência de genes mitocondriais.....	24
2.3.3 Diferenciação genética populacional.....	27
2.3.4 Inferências demográficas.....	35
2.3.5 Origem dos filhotes apreendidos.....	39
2.4 Discussão.....	40
2.4.1 Diversidade genética.....	40
2.4.2 Estrutura genética populacional.....	41
2.4.3 Apreensões.....	45
2.4.4 Inferências demográficas.....	47
CAPÍTULO 3. Análise da similaridade genética de pares de filhotes de arara-azul-grande (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>): investigando monogamia e fidelidade ao ninho.....	51
3.1 Introdução.....	51
3.2 Materiais e Métodos.....	51
3.3 Resultados.....	54
3.4 Discussão.....	58
Apêndice I.....	62
Apêndice II.....	68
CAPÍTULO 4. Teste de sexagem com amostras de penas em <i>Anodorhynchus hyacinthius</i>.....	69
4.1 Introdução.....	69
4.2 Materiais e Métodos.....	69
4.3 Resultados e Discussão.....	70
Conclusões Gerais.....	72
Referências bibliográficas.....	74
Notas sobre alguns aspectos da biologia da arara-azul (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>) (Psittaciformes: Psittacidae) na região de Carajás, Pará.....	88

RESUMO

O Brasil é o país mais rico do mundo em espécies de psitacídeos (77), sendo 16 delas possivelmente ameaçadas de extinção e uma extinta na natureza. Entre elas está a arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) que é considerada “em perigo de extinção” em consequência do intenso tráfico ilegal e perda do seu habitat. No presente estudo estimamos os níveis de variabilidade e caracterizamos a estrutura genética de populações naturais de *A. hyacinthinus*. Analisamos 10 locos de microssatélites de 98 indivíduos e seqüências concatenadas de genes mitocondriais (ND5, citocromo-b e ND2; 2123 pb total) de 80 indivíduos. O índice de diversidade genética foi considerado baixo em relação a outras espécies de psitacídeos. Além disso, os índices R_{ST} e a análise bayesiana dos dados de microssatélites indicaram moderada estruturação genética entre indivíduos de quatro regiões geográficas (Pantanal norte, Pantanal sul, norte e nordeste), mas os índices de F_{ST} indicaram diferenciação somente entre três regiões (norte e nordeste sem diferenciação). A estruturação entre essas três regiões foi congruente com a forte estruturação genética apontada pelos índices de F_{ST} e pela rede de haplótipos das seqüências mitocondriais. Baseado nos dados mitocondriais o tempo de divergência entre os grupos genéticos de *A. hyacinthinus* foi estimado em 16 a 42 mil anos atrás, o que corresponde ao final do Pleistoceno. Ainda, os resultados apontaram para uma população demograficamente estável ao longo do tempo, o que pode indicar que a baixa variabilidade pode ser uma característica da espécie. Entretanto, a rede de haplótipos apresenta forma em estrela com alguns haplótipos de baixa freqüência, o que pode indicar expansão recente, principalmente para região nordeste. Baseado nos dados de estruturação genética populacional, foi possível indicar a possível origem de indivíduos apreendidos e sem procedência conhecida, o que é importante para realizar ações preventivas de repressão e fiscalização. Adicionalmente, foram analisados sete locos de microssatélites de filhotes amostrados no mesmo ninho (mesma estação reprodutiva, estações reprodutivas consecutivas e estações alternadas) em duas regiões do Pantanal. Os resultados sugerem que a espécie é predominantemente monogâmica estrita, mas há pelo menos 12,5% de paternidade extra-par e 6,5% de parasitismo de ninho. Além disso, foram confirmados dados obtidos em campo de que muitos casais utilizam o mesmo ninho em anos consecutivos e alternados. Finalmente, padronizamos a sexagem molecular de amostras de penas de muda. Concluindo, os resultados genéticos obtidos nesse trabalho trazem informações sobre os processos envolvidos na história evolutiva dessa espécie, além de contribuir com informações sobre o comportamento reprodutivo das araras-azuis proporcionando mais subsídios para elaboração de programas de conservação.

ABSTRACT

Brazil harbours the highest number of parrot species in the world (77). Sixteen of those species are threatened with extinction, and one extinct in the wild. The hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) is endangered mainly due to the intense illegal traffic and loss of habitat. In this study we estimated levels of variability and characterized the genetic structure of natural populations of hyacinth macaws based on 10 microsatellite loci from 98 individuals, as well as concatenated sequences of mitochondrial genes (ND5, cytochrome b and ND2, 2,123 bp total) from 80 individuals. The genetic diversity index was low compared to those from other species of parrots. In addition, R_{ST} indices and Bayesian analysis of microsatellite data showed moderate genetic structure among individuals of four regions in Brazil (North Pantanal, South Pantanal, North Brazil and Northeast Brazil), although F_{ST} indices indicated differentiation among only three regions (i.e. north and northeast as one cluster). This is in accordance with the strong genetic structure indicated by F_{ST} indices and haplotype networks based on mitochondrial sequences. Mitochondrial data indicates that those groups diverged from 16 to 42 thousand years ago, during the late Pleistocene. This same dataset suggests that the populations have been demographically stable over time, which may indicate low variability may be characteristic of this species. However, star-shaped haplotype networks is suggestive of recent expansion, specially in the Northeast Brazil. In addition to the identification historical processes, it was also possible to identify the most probable region of origin of apprehended individuals based on the genetic structure, what may be useful to plan preventive and repressive control actions. In another study, we analyzed seven microsatellite loci of chicks sampled in the same nest (same breeding season, alternate breeding seasons and consecutive seasons) in two regions of the Pantanal, in order to evaluate the frequency of extra-pair fertilizations in this species. The results suggest that the species is predominantly monogamous, but there is at least 12.5% of extra-pair paternity and 6.5% of brood parasitism. Additionally, the genetic data is congruent with field observations that indicate nest fidelity in consecutive and alternative breeding seasons. Finally, we applied a modified molecular sexing protocol in order to determine sex based on molt feathers. In conclusion, the genetic results obtained in this study provide information about the processes involved in the evolutionary history and the reproductive behavior of hyacinth macaws that may help plan conservation actions.

Capítulo 1. Introdução geral

1.1 A genética e a conservação da biodiversidade

Do ano de 1600 até a atualidade estima-se que muitos organismos foram extintos na natureza. Esta perda acelerada de espécies supera a taxa natural de extinção. Várias são as causas desta perda, mas um dos fatores mais importantes é a destruição dos habitats causada principalmente pela ação humana (Primack e Rodrigues, 2002). Em alguns casos é necessária intervenção humana para assegurar a sobrevivência de espécies e de suas populações. Diante desse cenário, existe atualmente uma grande preocupação com a preservação da biodiversidade a fim de evitar que mais espécies sejam extintas.

A definição de biodiversidade engloba não só a variabilidade ecológica (número de espécies de uma comunidade e suas interações), mas também a variabilidade genética que é fundamental para a seleção natural e, portanto, para a evolução das espécies. Assim, a genética da conservação surgiu há cerca de 20 anos e vem sendo utilizada em programas de conservação (Primack e Rodrigues, 2002). Essa área de estudo utiliza a teoria e as técnicas da genética visando reduzir os riscos de extinção, especialmente em espécies ameaçadas (Frankham *et al.*, 2002).

Dados genéticos podem ser úteis em muitos aspectos, como na identificação do sexo de indivíduos que não apresentam dimorfismo sexual externo ou para estimar o grau de parentesco entre indivíduos, o que pode auxiliar, por exemplo, em programas de reprodução em cativeiro. As ferramentas de genética molecular possibilitam estimar a diversidade genética e a identificação de diferenças (quando existentes) entre populações. Técnicas moleculares também podem permitir a identificação da origem geográfica de um indivíduo. Tal informação pode ser importante para auxiliar no controle do tráfico ilegal de animais e plantas (Miyaki, 2001; Sole-Cava, 2001). Combinado com estudos ecológicos, comportamentais e demográficos, dados genéticos podem melhorar o conhecimento sobre a biologia de espécies ameaçadas, e devem ser vistos como complemento das outras áreas de conhecimento (Sherwin *et al.*, 2000). Essa visão multidisciplinar é essencial para o planejamento de estratégias de conservação.

Em meados do século 80 surgiu o conceito de Unidade Evolutivamente Significativa – ESU (*Evolutionary Significant Unit*; Ryder, 1986) que é definido como grupo de indivíduos isolados por um período de tempo suficiente para apresentarem diferenças genéticas. Por ser um conceito bastante amplo, Moritz (1994) propôs o conceito de Unidade de Manejo - UM (*Management Unit*) baseado nas diferenças das frequências alélicas e/ou haplotípicas entre as populações. Ambos os conceitos são utilizados em propostas de conservação. Independentemente da utilização do conceito de ESU ou UM, a decisão de conservar uma espécie deve ser tomada cuidadosamente levando em consideração as características peculiares de cada população ou espécie e seu status de ameaça.

1.2 Os marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como qualquer loco gênico, ou seu produto, que apresenta variabilidade adequada para estudar um problema biológico (Avise, 1994). No caso dos polimorfismos de DNA utilizam-se, em geral, marcadores moleculares neutros, como os microssatélites ou o DNA mitocondrial. Os dados gerados são bastante utilizados em estudos de populações naturais para a identificação de processos histórico-demográficos e de estrutura genética populacional. A utilização conjunta de marcadores com distintos padrões de herança e taxas de mutação permite um melhor entendimento dos processos envolvidos na distribuição da variação genética. Apesar de os marcadores mitocondriais e nucleares estarem sujeitos às mesmas forças evolutivas, diferenças quanto às taxas de mutação e modo de herança podem levar à identificação de padrões distintos de variabilidade e de subdivisão populacional (Avise, 1994; Avise, 2000).

1.2.1 Microssatélites

Os microssatélites são compostos por unidades de seqüências de 1 a 6 pb repetidas lado a lado (Tautz, 1989). O número das unidades de repetição é altamente variável entre microssatélites localizados no mesmo loco e em locos distintos. Isso confere elevado nível de polimorfismo, a ponto de a probabilidade de dois indivíduos compartilharem os mesmos microssatélites ser praticamente nula. Um microssatélite possui tipicamente cerca de 100 pb no total (Bruford *et al.*, 1996) e, por isso, é facilmente amplificado por PCR, não necessitando de grande quantidade inicial de DNA molde. Além disso, os microssatélites apresentam herança codominante, o que permite diferenciar indivíduos heterozigotos de indivíduos homozigotos e apresentam alta taxa de mutação, cerca de 10^{-4} a 10^{-6} , quando comparada à taxa estimada de mutação pontual de cerca de 10^{-10} no genoma nuclear (Dallas, 1992; Hancock, 1999).

O modelo de mutação mais aceito para explicar a variabilidade dos microssatélites é o de passo-a-passo (*Stepwise Mutation Model*, SMM; Ohta e Kimura, 1973), que assume que a mudança ocorre por perda ou ganho de uma unidade de repetição. Entretanto, há outros modelos: modelo dos alelos infinitos (*Infinite Alleles Model*, IAM; Kimura e Crow, 1964) e o modelo de mutação de duas fases (*Two-phase Mutation Model*, TPM; Di Rienzo *et al.*, 1994). O modelo dos alelos infinitos considera uma situação extrema na qual o número possível de estados alélicos em um determinado loco pode ser extremamente grande, no qual cada novo alelo mutante é um alelo que não existia anteriormente na população. O modelo de mutação de duas fases incorpora no modelo passo-a-passo a possibilidade de mutações ocorrerem com adição ou exclusão de mais de uma unidade de repetição.

Uma das limitações para o uso de microssatélites é a quantidade de tempo e de recursos financeiros necessários para o desenvolvimento dos *primers* utilizados na amplificação. Entretanto,

o uso de *primers* heterólogos, isto é, desenvolvidos para uma espécie filogeneticamente próxima da espécie de interesse, pode reduzir o custo e o tempo das pesquisas (Parker *et al.*, 1998).

Em aves, os primeiros *primers* para amplificar microssatélites foram desenvolvidos para uma espécie de andorinha (*Hirundo rustica*, Ellegren, 1991). No caso de psitacídeos Hughes *et al.* (1998) descreveram oito pares de *primers* que reconhecem locos polimórficos de microssatélites em *Forpus passerinus*. Os mesmos *primers* foram testados em outras cinco espécies neotropicais pertencentes a três gêneros diferentes (*Brotogeris jugularis*, *Aratinga pertinax*, *A. canicularis*, *Amazona auropalliata* e *A. albifrons*) e foram encontrados somente locos monomórficos. Russello *et al.* (2001) desenvolveram *primers* para nove locos de microssatélites altamente variáveis no papagaio *Amazona guildingii*. Esses *primers* também apresentaram produto de amplificação em outras oito espécies dos gêneros *Amazona*, *Ara*, *Aratinga* e *Pionus*, mas o nível de polimorfismo não foi avaliado. Dos nove locos, cinco produziram bandas em *Ara ararauna* e, segundo os autores, seria esperado obter sucesso de amplificação para as outras espécies de araras (Russello *et al.*, 2001). Mais recentemente Caparroz *et al.* (2003) desenvolveram *primers* para sete locos de microssatélites de arara-canindé (*Ara ararauna*). Dos sete, cinco se mostraram polimórficos para *Anodorhynchus hyacinthinus* (Presti, 2006). Atualmente muitos *primers* para psitacídeos têm sido desenvolvidos e testados em espécies proximamente relacionadas, como para o papagaio-do-congo (*Psittacus erithacus*; Taylor e Parkin, 2007a), para a caturrita (*Myiopsitta monachus*; Russello *et al.*, 2007), para a cacatua-das-molucas da Indonésia e para o papagaio-de-Cuba (*Cacatua moluccensis* e *Amazona leucocephala*; Taylor e Parkin, 2007b), para uma espécie de periquito das Ilhas Maurício (*Psittacula eques*; Raisin *et al.*, 2009) e para o papagaio-de-bico-grosso sul-africano (*Poicephalus robustus*; Pillay *et al.*, 2010).

1.2.2 DNA Mitocondrial (DNAMt)

O DNAMt animal é relativamente pequeno, circular e possui entre 15 a 20 Kb (Griffiths, 2002), com média de 16 Kb (Hartl e Clark, 1997), é herdado matematicamente e geralmente não apresenta recombinação. O tamanho efetivo da população, calculado baseando-se no DNAMt é quatro vezes menor quando comparado ao calculado para o genoma nuclear (Avisé, 1994) e a variabilidade encontrada no DNAMt é menor do que a encontrada nos microssatélites. Entretanto, o grau de polimorfismo encontrado mostrou-se adequado para estudos populacionais (Avisé, 1994).

Em geral as aves apresentam baixa variabilidade no DNAMt (Berlin *et al.*, 2007). Essa baixa variabilidade poderia ser explicada pelo efeito Hill-Robertson no cromossomo W. Em aves, o cromossomo W e o genoma mitocondrial são transmitidos matematicamente, assim, o efeito de seleção sobre o cromossomo W poderia influenciar a variabilidade do DNAMt (Berlin *et al.*, 2007). Hickey (2008) propôs outra explicação para a baixa variabilidade genética no genoma mitocondrial

relacionada ao menor consumo de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias de aves comparadas às dos mamíferos e, portanto, levaria a um menor efeito mutacional no DNA.

Mesmo a variabilidade genética sendo menor em aves do que em outros organismos, muitas regiões do DNAm têm sido utilizadas em análises populacionais. A região controladora foi utilizada para determinar o grau de estruturação genética em mariquita-amarela (*Dendroica petechia*) no Arquipélago de Galápagos (Browne *et al.*, 2008). No abutre-preto, o citocromo b foi utilizado para caracterizar sua estrutura populacional e filogeografia na Europa (Poulakakis *et al.*, 2008). Também são amplamente utilizados em estudos populacionais o ND2 e ATPases 6 e 8 (Friesen *et al.*, 2006; Kearns *et al.*, 2008; Nodari, 2008).

1.3 Os psitacídeos

Os psitacídeos compreendem cerca de 350 espécies de araras, papagaios, periquitos e afins (Collar, 1997; Rowley, 1997). Muitas espécies desse grupo são consideradas vulneráveis ou em perigo (BirdLife International, 2010) sendo a perda de habitat o principal fator para a sua ameaça. No entanto, há outros fatores que contribuem muito com essa redução populacional, como a introdução de espécies predadoras e competidoras, a endogamia e outros processos relacionados ao tamanho populacional reduzido e o corte de árvores utilizadas para ninho (Juniper e Parr, 1998). Além disso, algumas espécies possuem características que as tornam valiosas comercialmente, como sua capacidade de imitar a voz humana, sua inteligência e sua exuberante plumagem colorida (Snyder *et al.*, 2000). O Brasil é o país mais rico do mundo em número de espécies de psitacídeos (77) e é onde vivem os maiores representantes da família, as araras. Dentre as 77 espécies, 16 estão ameaçadas de extinção variando em diferentes graus e uma possivelmente extinta na natureza (BirdLife International, 2010).

Segundo Sick (1997), as araras estão inseridas em dois gêneros: *Ara* e *Anodorhynchus*, sendo que esses gêneros não são tão proximamente relacionados filogeneticamente (Figura 1.1; Tavares *et al.*, 2006). No gênero *Ara*, atualmente são reconhecidas oito espécies (Collar, 1997; Oliveira-Marques, 2006) e no gênero *Anodorhynchus* somente três espécies: *A. glaucus* (extinta), *A. leari* (em perigo) e *A. hyacinthinus* (em perigo).

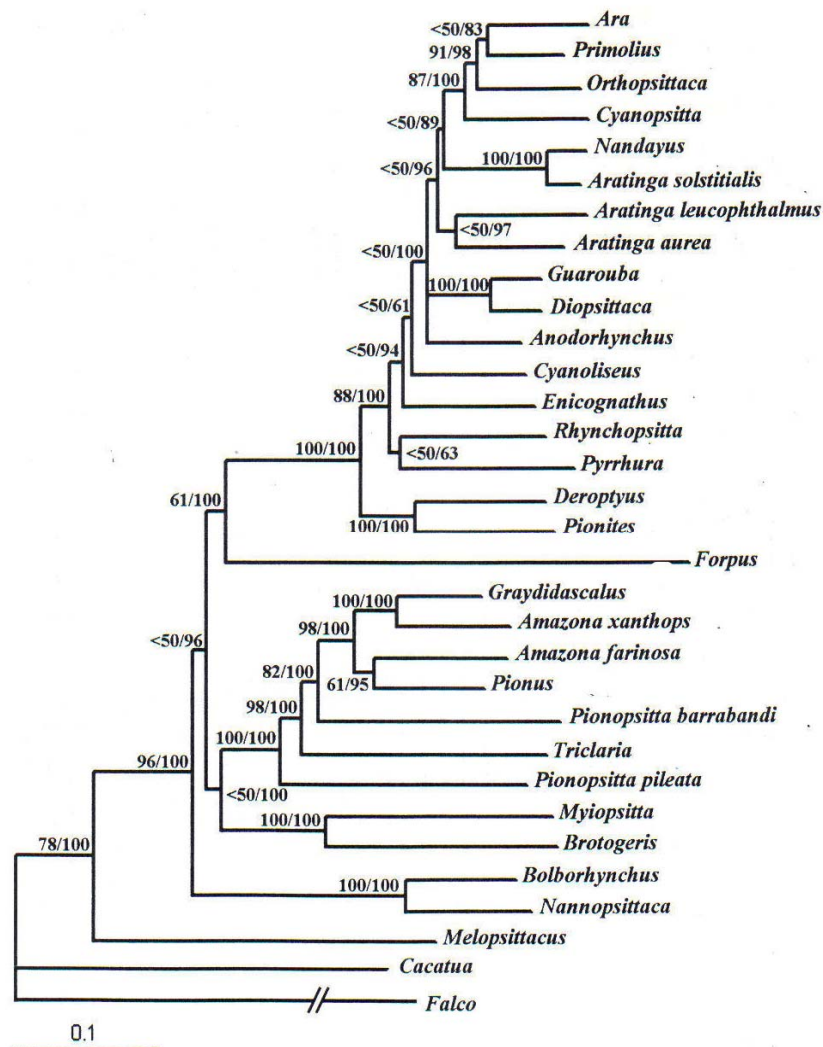


Figura 1.1 Reconstrução filogenética por análise Bayesiana de 6416 pares de base de seqüências de DNAs mitocondrial e nuclear de psitacídeos. Os valores dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* de máxima verossimilhança acima de 50% e aos valores de probabilidade posterior da análise Bayesiana, respectivamente. A barra indica os táxons neotropicais (modificado de Tavares *et al.*, 2006).

1.3.1. Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*)

A. hyacinthinus é o maior psitacídeo existente, chegando a medir um metro da ponta do bico à ponta da cauda (Figura 1.2). Apresenta plumagem azul-cobalto com colorido amarelo na porção mandibular e no anel perioftálmico. Seu bico é desmensurado, maciço e curvo, sendo a maxila móvel e articulada ao crânio, o que aumenta a sua potência (Forshaw, 1989; Guedes, 1993; Sick, 1997). É listada nos Apêndices I e II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES) e é considerada em perigo pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) e pela *Birdlife International* (2010).

O número total de indivíduos em vida livre no Brasil está estimado em 6.500, distribuídos em três regiões: no Pará (leste da região amazônica e oeste de Altamira), no nordeste do país (região entre Tocantins, Piauí, Maranhão e Bahia) e no Pantanal Matogrossense, onde se encontra a maioria dos indivíduos (Collar, 1997; Guedes *et al.*, 2008). Como essas três regiões de ocorrência conhecidas não se sobrepõem, os três grupos devem ser alopátridos. Além disso, essas três regiões são fisionomicamente distintas e, como a espécie possui dieta e preferência do local de nidificação altamente especializadas, há diferenças nesses dois aspectos de acordo com a região. No Pantanal matogrossense sua alimentação é especializada no fruto de duas palmeiras: a bocaiúva (*Acrocomia totai*) e o acuri (*Scheelea phalerata*). Na região de encontro do Piauí, de Tocantins, do Maranhão e da Bahia, *A. hyacinthinus* se alimenta de endocarpo e do mesocarpo da piaçava (*Atalea funifera*) e do catolé (*Syagrus cearensis*). Já na região de Carajás e Altamira a espécie se alimenta de injá (*Maximiliana regia*), de babaçu (*Orbignya phalerata*), de tucum (*Astocarym sp*), de gueroba (*Syagrus oleracea*), de poucos frutos de acuri ou bacuri (*Scheelea phalerata*) e de macaúba ou bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) (Munn *et al.*, 1989; Guedes, 1993; Presti *et al.*, 2009). A maioria dos ninhos no Pantanal é encontrada em apenas uma espécie de árvore, o manduvi *Sterculia apetala* e no Pará, *Sterculia pruenis* (Guedes, 1993; Pinho e Nogueira, 2003; Presti *et al.*, 2009). As araras aumentam pequenas cavidades feitas por pica-paus, ou provocadas pela quebra de galhos, ou mesmo iniciadas pela ação de fungos e cupins para construir seus ninhos. Na região nordeste nidificam preferencialmente em paredões rochosos (Collar, 1997).



Figura 1.2. Casal de arara-azul. Foto: Luciano Candisani

Dentre as três áreas de ocorrência, somente no Pantanal há um programa de monitoramento permanente da espécie a longo prazo (Guedes, 2004). Assim, os dados da sua biologia descritos a seguir foram exclusivamente coletados nessa região. Observações de campo indicam que as

cavidades utilizadas como ninho são reutilizadas praticamente todos os anos como locais de reprodução (Guedes, 1993; Pinho e Nogueira, 2003). Em alguns casos há suspeitas de que o mesmo casal ocupe o mesmo ninho em anos seguidos e, em outros casos, que eles ocupem o ninho em anos alternados (pois investem um ano no cuidado do filhote; Guedes, 1993). Tal observação é corroborada por dados de similaridade genética entre filhotes (Presti, 2006). Ao eclodir do ovo, o filhote é totalmente dependente dos pais (Figura 1.3), permanecendo por um longo período no ninho, em média 107 dias, período no qual ficam expostos à predação e a outros fatores que podem levar à morte. Após a saída do ninho, os jovens ainda são dependentes dos pais para alimentação e a separação deles geralmente ocorre após 12 a 18 meses (Guedes, 1993). O fato de os casais se reproduzirem em anos consecutivos ou em anos alternados parece estar relacionado com a maturidade do casal, ou seja, casais mais experientes poderiam se reproduzir todos os anos, enquanto que os casais mais jovens e inexperientes se reproduziriam apenas em anos alternados (Guedes, comunicação pessoal; Presti, 2006). Fora do período reprodutivo, *A. hyacinthinus* voa em pares ou em grupo e no final da tarde se reúnem em locais chamados “dormitórios” ficando evidente o alto grau de socialização que possuem. Os casais são monogâmicos e dividem a tarefa de cuidar dos filhotes (Guedes e Harper, 1995).



Figura 1.3. Filhote de arara-azul de aproximadamente 15 dias.
Foto: Adriana R. Oliveira-Marques

JUSTIFICATIVA

A IUCN reconhece a necessidade de conservar a diversidade genética como uma das três prioridades globais de conservação (World Conservation Strategy, IUCN-UNEP-WWF, 1980). Portanto, para a diversidade genética de uma espécie seja preservada, é necessário antes conhecê-la. A arara-azul-grande, espécie alvo do presente estudo, é considerada em perigo e acredita-se que qualquer espécie com pequeno tamanho populacional tenha perdido parte de sua variabilidade genética (Frankham *et al.* 2002). Para que seja possível entender melhor os processos evolutivos envolvidos nessa perda, o conhecimento da variabilidade genética desta espécie é importante. Além disso, conhecer a composição genética das populações também é importante para a conservação, uma vez que, caso a variabilidade genética na espécie se apresente estruturada geograficamente, a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade das unidades, pois podem existir adaptações locais que se perderiam no caso de um manejo conjunto das populações (Haig, 1998). Assim, esse conhecimento permite direcionar os esforços de conservação para um uso mais eficiente dos recursos disponíveis, além de auxiliar na compreensão das forças evolutivas envolvidas na história da espécie. Além disso, determinar a origem de indivíduos sem procedência conhecida é importante para realizar ações preventivas de repressão e fiscalização e mesmo para programas de reprodução em cativeiro, evitando o pareamento de casais de localidades com composições genéticas diferentes, levando a população cativa a sofrer eventual efeito de depressão por exocruzamento.

Caracterizar a estrutura genética populacional de uma espécie é só uma parte de um conjunto de estudos que devem ser feitos para a efetiva conservação de uma espécie. Entretanto, o conhecimento dessa estrutura pode auxiliar no entendimento da dinâmica populacional das comunidades e levantar hipóteses das relações daquela espécie com as outras que habitam o mesmo ambiente e como essas relações poderiam estar contribuindo com aquela estrutura populacional encontrada, ajudando assim a conservação do habitat como um todo.

Quanto mais uma espécie é conhecida, é mais provável estabelecer metas para sua conservação e realizar previsões de longo prazo. Por isso, somada às informações de estrutura genética populacional, o conhecimento da biologia reprodutiva da espécie pode ser de grande importância. Os dados genéticos gerados no presente trabalho permitiram testar algumas hipóteses sobre a monogamia e a filopatria (volta ao local de origem para reprodução) de *Anodorhynchus hyacinthinus* levantadas a partir de dados de observação de campo.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente projeto foram:

- 1) Caracterizar a estrutura populacional de *Anodorhynchus hyacinthinus*, para auxiliar o plano de conservação da espécie e verificar a origem de indivíduos sem procedência conhecida;
- 2) Entender a história demográfica da espécie;
- 3) Estimar a similaridade genética entre filhotes encontrados no mesmo ninho, visando auxiliar na melhor compreensão do comportamento reprodutivo desta espécie, o que pode contribuir na elaboração de estratégias de conservação.

Para alcançá-los:

- 1) Testamos mais *primers* para locos de microssatélites desenvolvidos para espécies proximalmente relacionadas (em relação ao nosso trabalho anterior [Presti, 2006]);
- 2) Avaliamos a variabilidade genética de *A. hyacinthinus* de diversas localidades geográficas utilizando marcadores nucleares (microssatélites) e mitocondriais;
- 3) Comparamos os níveis de estruturação genética encontrados pela análise de seqüências de genes do DNA mitocondrial e de locos de microssatélites;
- 4) Testamos e padronizamos a sexagem de penas de muda de *A. hyacinthinus*.

Os resultados aqui obtidos foram organizados por tema em capítulos que se seguem. No final da Tese foi anexada uma cópia de um artigo de divulgação publicado sobre dados biológicos de *A. hyacinthinus* coletados no Pará.

Capítulo 2. Caracterização da diversidade genética e da estrutura populacional da arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial

2.1 Introdução

A biologia da espécie, o meio ambiente e os processos evolutivos (tais como seleção natural, fluxo gênico e deriva genética) são fatores que podem influenciar a estrutura genética das populações naturais (Slatkin, 1987). Deriva genética, seleção natural e mutação podem causar alterações na distribuição da diversidade genética entre as populações de uma espécie. O isolamento geográfico promovido pelo surgimento de barreira ou pela fragmentação do habitat pode reduzir o movimento de indivíduos, o que pode acentuar diferenças genéticas entre as populações. Já o fluxo gênico pode resultar na homogeneização da composição genética e pode reduzir as diferenças entre as populações (Crochet, 1996). Espécies que possuem eficientes mecanismos de dispersão e baixa filopatria geralmente apresentam altas taxas de fluxo gênico, exibindo homogeneidade genética em larga escala geográfica. Por outro lado, espécies com baixa capacidade de dispersão ou alta filopatria natal frequentemente apresentam níveis baixos de fluxo gênico entre populações.

A estrutura genética das populações também é profundamente afetada por processos históricos. Enquanto análises baseadas em estatísticas F são apropriadas para quantificar a subdivisão em populações que se encontram no equilíbrio entre mutação e deriva genética (Slatkin e Barton, 1989), essas abordagens não permitem inferir como os alelos se relacionam entre si nem distinguem processos evolutivos (ex. expansão populacional) envolvidos na distribuição das frequências alélicas observadas (Templeton, 1995). A comparação intra-específica de seqüências de DNA gera informações sobre a genealogia da espécie permitindo a construção de árvores gênicas. O conceito de coalescência (Kingman, 1982) relaciona a história demográfica e a genealogia da população e permite que sejam feitas estimativas que refletem a sua história evolutiva.

Embora a maioria das aves seja caracterizada pelo vôo, muitas espécies apresentam vôo limitado ou não voam. Essas aves podem sofrer mais com a ação antrópica direta (destruição e fragmentação do habitat, por exemplo) ou fragmentação histórica resultando em diferenças na composição genética de grupos. Alguns exemplos são encontrados em espécies sedentárias, como galináceos e ratitas (Leberg, 1991; Bouzat, 2001; Caizergues *et al.*, 2003). Como esperado, espécies com alta mobilidade não parecem sofrer estruturação genética devido à fragmentação antrópica ou histórica (Galbusera *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2005) pois são capazes de transpor barreiras.

As florestas neotropicais tem recebido considerável atenção devido à sua alta diversidade e complexidade ecológica e à fragmentação a que estão sujeitas (Skole e Tucker, 1993; Bates, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da fragmentação na estrutura populacional genética de

aves tropicais com alta mobilidade (Francisco *et al.*, 2007). Como não foi possível encontrar trabalhos que relacionam a fragmentação histórica com composição genética de aves com alta mobilidade, estudos que abordam a fragmentação antrópica serão discutidos, já que esse tipo de fragmentação poderá produzir o mesmo efeito na composição genética das espécies ao longo do tempo. Alguns estudos abordam a persistência de espécies em fragmentos florestais de menos de 150 anos (Karr, 1982; Bierregaard e Lovejoy, 1989, Klein, 1989), que pode não ser tempo suficiente para acumular diferenças genéticas. Em geral, é esperado que a fragmentação deva restringir mais o movimento de animais que não voam do que de aves que possuem maior potencial de dispersão (Caizergues *et al.*, 2003). Assim, seria esperado observar ausência de estruturação genética em algumas espécies de aves, mesmo havendo alopatria (Crochet, 2000; Lee *et al.*, 2001). Foi documentado que, em fragmentos pequenos e isolados, machos de *Dendroica chrysoparia* apresentaram menor probabilidade de encontrar e atrair fêmeas e que ocorre menor sucesso de dispersão de filhotes (Rappole *et al.*, 2003), levando a uma distribuição restrita. Isso poderia reduzir a abundância da espécie devido à depressão por endocruzamento (Villard *et al.*, 1999). Outros estudos têm mostrado que fatores como a fragmentação também podem alterar a composição genética de aves com mobilidade, dependendo de outros fatores como a biologia da espécie ou a distância entre os fragmentos. Neste contexto, Bates (2002) estudou cinco espécies de aves para avaliar o efeito da fragmentação na floresta amazônica ocorrida há 4000 a 10000 anos atrás. Das cinco espécies estudadas, três apresentam sinal de estruturação genética causada pela fragmentação. Tal diferenciação genética também foi encontrada por Kahindo *et al.* (2007) em aves de fragmentos que foram isolados em diferentes tempos (até cinco milhões de anos atrás) de regiões montanhosas na África.

Um comportamento que pode gerar estruturação genética é a filopatria. Esse comportamento, associado à territorialidade, foi utilizada para explicar a estruturação genética encontrada entre machos de diferentes grupos nas aves *Lagopus lagopus* (Piertney *et al.*, 1998) e *Ramphocinclus brachyurus* (Temple *et al.*, 2006). O mesmo comportamento foi observado em outros grupos de organismos, como por exemplo, morcegos (Burland *et al.*, 2001; Rivers *et al.*, 2005).

Com isso, a espécie alvo do trabalho *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara-azul-grande) apresenta características ecológicas e biológicas que podem influenciar sua composição genética: uma distribuição geográfica descrita como alopátrica em três regiões com fisionomias distintas e possível presença de filopatria. Assim, 98 indivíduos das três principais áreas de ocorrência foram analisados quanto a locos de microssatélites e DNA mitocondrial para avaliar o grau de variabilidade e estrutura genética. Ainda, amostras de filhotes apreendidos foram genotipadas para determinar suas origens. Foram utilizados os dados para responder às seguintes perguntas: 1) podemos detectar diferenças genéticas entre os grupos amostrados em diferentes localidades?

2) se houver diferenciação, podemos identificar a potencial origem geográfica dos indivíduos apreendidos?

2.2. Materiais e métodos

2.2.1 Amostragem

As amostras de *Anodorhynchus hyacinthinus* foram obtidas de várias localidades (Tabela 2.1, Figura 2.1). Algumas das amostras já tinham sido analisadas no mestrado para seis locos de microsatélites (Tabela 2.1; Presti, 2006).



Figura 2.1 Distribuição geográfica de *Anodorhynchus hyacinthinus* (em cinza escuro) e localidades amostradas. ● amostras com origem conhecida; ■ Amostras com origem exata desconhecida.

No caso das coletas de sangue de filhotes em campo, para chegar até a entrada dos potenciais ninhos foi utilizada a técnica de alpinismo (Figura 2.2) com auxílio de estilingue, chumbada, linhas de nylon, corda fina, cordas de alpinismo, fitas de ancoragem, cadeirinhas, colete, mosquetões, oito e ascensores. Inicialmente se atirou um chumbinho com uma linha de nylon e nela se amarrou a corda fina que guiou a corda de alpinismo. Esta corda foi presa em uma fita de ancoragem amarrada na própria árvore ou em árvores ao lado. Para a subida o colete e a cadeirinha foram presos pelos

mosquetões à corda e foram utilizados ascensores. Para descer foi utilizada a técnica de descida pelo oito. Quando foi possível capturar o filhote, aproximadamente 0,1 ml de sangue da veia braquial da asa foi coletado com seringa descartável e preservado em etanol absoluto. Filhotes com tamanho adequado foram anilhados (anilha aberta de inox). Assim que a coleta foi realizada o filhote foi devolvido ao seu ninho. Um artigo que relata as coletas na região de Carajás no Pará e publicado em uma revista de divulgação de assuntos ornitológicos está anexado (Presti *et al.*, 2009). As amostras de sangue estão estocadas no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (em etanol absoluto a -20 °C). Para as análises populacionais somente um indivíduo por ninho foi analisado.

Tabela 2.1 Origem (localidade e estado), número de amostras de *Anodorhynchus hyacinthinus* utilizadas nas análises com microssatélites (Nmic) e número de indivíduos sequenciados para DNA mitocondrial (Nmit), ano de coleta e coletor/coleção

Localidades ¹	Nmic	Nmit	Ano	Coletor/coleção
Miranda, MS (1) ²	17	16	2002	N.M.R. Guedes
Abobral, MS (2) ²	5	5	2000	N.M.R. Guedes
Nhecolândia, MS (3) ²	13	10	2000-2002	N.M.R. Guedes
Rio Negro, MS (4) ²	6	4	2001-2002	N.M.R. Guedes
Barão de Melgaço, MT (5) ²	20	17	2002-2004	P.T.Z. Antas
São Gonçalo de Gurgueia, PI (6) ²	6	5	1999	P. Martuscelli, C. Yamashita
São Gonçalo de Gurgueia, PI (6)	8	7	2007	A. R. O. Marques
Tocantins ³ (7) ²	3	3	2003	Zoológico de Brasília, DF
Maranhão ³ (8) ²	2	2	2004	Zoológico do Rio de Janeiro
Redenção, PA (9)	3	2	1997	C. Baider
Carajás, PA (10)	15	9	2007	F. T. Presti, A.R.O.Marques
TOTAL	98	80		
Apreensões				
AP1 – Corumbá e Jaraguari, MS ²	10	-	2004	N.M.R.Guedes
AP2 – Porto Alegre, RS ²	4	-	2005	G. Marciano
AP3 – Miranda, MS ²	2	-	2005	N.M.R. Guedes
AP4 - Rodovia Castello Branco, SP ²	8	-	2006	Zoológico de Boituva, SP

¹ em parênteses: número da localidade mostrada na figura 2.1; ²amostras analisadas no mestrado para seis locos de microssatélites; ³ localidade exata não conhecida.

O DNA foi isolado seguindo o protocolo de extração utilizando proteinase k e fenol-clorofórmio segundo Bruford *et al.* (1992). Foram misturados 300 µl de TNE (50mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de EDTA, pH 7,5), 30 µl de Tris HCl 1M pH7,5, 8 µl de SDS 25% e 20 µl de proteinase K (20mg/mL) e acrescentado cerca de 2 mm² do material a ser extraído. O material foi incubado a 37°C durante a noite ou a 55°C por 4 horas. Após a incubação, foi acrescentado 1 volume de

fenol:clorofômio:álcool isoamílico (25:24:1), misturado e centrifugado por 10 minutos a 12000rpm. A fase superior foi retirada com micropipeta e transferida para um tubo novo. A esse tubo novo foram adicionados dois volumes de etanol absoluto, o tubo foi invertido para precipitar o DNA e centrifugado por cinco minutos a 12000 rpm. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 300 µl de etanol a 70% e centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm. Após descartado o sobrenadante, o precipitado foi seco em bomba de vácuo por cerca de 30 minutos e ressuspensão em TE (Tris 10mM, EDTA 1mM).



Figura 2.2. Técnica de alpinismo para acessar os ninhos. Foto de: Patrick Y. H. Karassawa.

Para as análises foram consideradas quatro regiões: Pantanal sul, Pantanal norte (Barão de Melgaço/MT), nordeste (São Gonçalo de Gurgueia/PI, Tocantins e Maranhão) e norte (Redenção e Carajás/PA). A amostragem no Pantanal sul abrangeu quatro subregiões reconhecidas por diferenças paisagísticas e faunísticas (Silva e Abdon, 1998): Miranda, Abobral, Nhecolândia e Rio Negro (Tabela 2.1).

2.2.2 Análise de Microssatélites

Foram testados 19 pares de *primers* de microssatélites desenvolvidos para espécies filogeneticamente próximas (Tabela 2.2), sendo que 13 deles já tinham sido testados no mestrado (Tabela 2.2; Presti, 2006). Oito pares foram desenvolvidos para *Ara ararauna* (Caparroz *et al.*, 2003), sendo que um deles foi modificado (Gebhardt e Waits, 2008), cinco para *Amazona guildingii* (Russello *et al.*, 2001), dois para *Anodorhynchus hyacinthinus* (S. Davis, não publicado) e quatro para *Psittacus erithacus* (Taylor e Parkin, 2007a). Cada reação continha 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/ µl, Pharmacia), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTPs (4 mM), 1,2 µl de tampão (10x), 20 a 50 ng de DNA e água para completar 12 µl. As condições da PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 52-58°C por 40 seg e 72°C por 40 seg, e extensão final de 72°C por 7 min. Aproximadamente 2 µl do produto

amplificado foi carregado em gel de agarose 1,5% para avaliar a qualidade e estimar a quantidade do amplificado. Os pares de *primers* que tiveram seus produtos amplificados foram testados em 10 indivíduos para avaliar o grau de polimorfismo.

Tabela 2.2 Sequências dos *primers* de microssatélites, suas referências e temperatura de hibridação.

P – polimórfico; M- monomórfico; - sem amplificação. **Primers* testados no mestrado (Presti, 2006); ***Touch down* (decrecendo 0,5°C)

<i>Primers</i>	Sequências (5' 3')	Referências	T°C	Resultados
UnaCT21*	F: CTTTCCCATACTTAGCCATA R: AGACATTTCAAGACCGTGCC	Caparroz <i>et al.</i> , 2003	58°C	P
UnaCT32*	F: TCTTGCTTATTCTTCCCCAG R: ACCACCACCAGGAAGCACGG	Caparroz <i>et al.</i> , 2003	58°C	P
UnaCT35*	F: TTCTATCCCTTTTTGTCAGC R: TAGCTAGATTTTCTTCTCTG	Caparroz, não publicado	55°C	M
UnaCT43*	F: TCATCCTATCACCAGAAGGG R: CTTGAGGACAGTGCAGAGGG	Caparroz <i>et al.</i> , 2003	53°C	P
UnaCT74*	F: CTGGACTGCTGCTCTTAACA R: AGCCTGAAGTGAAGTGCATG	Caparroz <i>et al.</i> , 2003	56°C	P
UnaCT84*	F: ACAGTGAAGCTTGAATCTTA R: CCAAGTTTAGGAGGAAAAGG	Caparroz, não publicado	-	-
UnaGT55*	F: TCTGCCCTCTGTCTTATGCC R: ACTTTGGTTTGTCCTGC	Caparroz <i>et al.</i> , 2003	56°C	P
UnaCT41 int	F:ACGAACAGCTAACATAAAAAATATTGC R: CAGAAGCACATGATCTTCATCC	Gebhardt e Waits, 2008	60-56°C**	P
AgGT07*	F: CAAACCATTACACCC R: GCTCTTGAGTTTTCCC	Russello <i>et al.</i> , 2001	-	-
AgGT08*	F: GTGGCCTAACCTGAGAGTGG R: ACATGTGCACACCTGATGG	Russello <i>et al.</i> , 2001	60°C	M
AgGT12*	F: ACTCATGCAGGGTTCTCAG R: TTGTGGCTGGTAGAGGTGTG	Russello <i>et al.</i> , 2001	-	-
AgGT19	F: CCTGCCTCCCAAAAAGAACT R: ATGTATATCAACATTGACTCCTGG	Russello <i>et al.</i> , 2005	60-56°C**	P
AgGT81*	F: GGGGAACATCATTCTTCCAG R: AGAAGGAGGAAGCACATGA	Russello <i>et al.</i> , 2001	-	-
MAC 436*	F: GCACCAAACACAACATCTTATTC R: TTGGGACACCAATGTAATTTG	Davis, não publicado	56°C	P
HYA 1172*	F: GATCCTTTGCTTAAGACAGATGTC R: GAGTGAAATACACATTGACTTCTG	Davis, não publicado	56°C	P
Peem06	F: GCTTCAAACGAGGTCTCATCTG R: ACTTCCCTGCTGCACTCCTG	Taylor e Parkin, 2007a	-	-
Peem07	F: AAAGCCCTTAAAGAGGATGTG R: ATACTGGGACATGTGGATGC	Taylor e Parkin, 2007a	-	-
Peem11	F: AGATGCAAGGAATGTAAACAC R: CTCTGCTGCTAGGATAGTTC	Taylor e Parkin, 2007a	60-56°C**	P
Peem16	F: AGGAGAAAGAAAAGAGATGAC R: CGTTTGAAGCCTGTGAGAAG	Taylor e Parkin, 2007a	60-56°C**	P

F – *forward*, R – *reverse*.

Para os locos que apresentaram uma banda única e nítida foram feitas novas PCRs com aproximadamente 10 indivíduos para avaliar o nível de polimorfismo. As condições foram as mesmas das já descritas, exceto pela adição de 0,2 µl de *primer* M13 (10 µM) marcado com fluorescência (TET, HEX ou FAM, Applied Biosystems), pelas quantidades dos *primers* 0,3 µl do *primer Reverse* (10 µM) e 0,1 µl do *primer Forward* com uma cauda 5'M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC, Boutin-Ganache *et al.*, 2001) (10 µM) e pelo volume de água Milli Q que foi aumentado para 7,2 µl. Depois de amplificados, 1,5 µl dos produtos foram carregados em gel de agarose 1,5% para verificação da presença e da quantidade do produto.

Se o produto possuía boa quantidade e qualidade, cerca de 0,5 µl do marcador molecular GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD (Applied Biosystem) (2fmol) e 7,5 µl de Tween 20 0,1 % foram misturados a uma alíquota de 2,0 µl de cada uma das amostras amplificadas. Cerca de 10,0 µl dessa mistura foi analisada em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). O polimorfismo foi testado em 10 indivíduos e os locos que se mostraram polimórficos foram utilizados na genotipagem de mais indivíduos.

2.2.3 Sequenciamento de DNA mitocondrial

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 10 µl, sendo 4,9 µl de água Milli Q, 1 µl de tampão (10X), 1 µl de dNTPs (4 mM), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl, Pharmacia) e 1 µl de DNA (20-50 ng). As seqüências dos *primers* se encontram na tabela 2.3 e as condições de amplificação foram as seguintes: 1) ND5 e citocromo b: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg e 72 °C por 40 seg, seguido de extensão a 72 °C por 7 min; 2) Região controladora: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 30 seg, 59 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min e 30 seg, seguido de extensão a 72 °C por 10 min; 3) ND2: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 40 seg, seguido de extensão a 72 °C por 7 min; 4) ND3 e ATPase 6 e 8: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de um *touchdown* de 10 ciclos a 95 °C por 30 seg, 60 °C decrescido de meio grau por ciclo por 30 seg e 72 °C por 60 seg e 30 ciclos a 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 72 °C por 60 seg , seguido de 72 °C por 9 min; 5) COI: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de um *touchdown* de 14 ciclos a 95 °C por 30 seg, 68 °C decrescido de um grau por ciclo por 30 seg e 72 °C por 40 seg e 29 ciclos a 95 °C por 30 seg, 54 °C por 30 seg e 72 °C por 40 seg , seguido de 72 °C por 7 min.

Tabela 2.3 Sequências dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento de regiões mitocondriais e suas referências

Regiões	Primer	Sequências dos <i>primers</i> (5' - 3')	Referências
ND5 e Citocromo b	ND5L 14754*	GGACCAGAAGGACTTGCCGACCTA	Ribas, 2004
	HThr 16082*	TCTTTTGGTTTACAAGACCAATG	Kornegay <i>et al.</i> , 1993
	CRH15331**	AAACTGCAGCCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Kocher <i>et al.</i> , 1989
	CRL15298**	TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGC	Cheng <i>et al.</i> , 1994
Região controladora	Lglu 16737*	TTGTTCTCAACTACGGGAAC	Eberhard <i>et al.</i> , 2001
	12S r H***	GCGGATACTTGCATGTATATG	Tavares <i>et al.</i> , 2004
	CRH576**	GTGAGGTGGACGATCAATAAAT	Eberhard <i>et al.</i> , 2001
	CRH1028**	AGGTGTAAAACAAAGTGCATCAGGGT	Tavares <i>et al.</i> , 2004
	CRL553**	CCTCTGGTTCCTARGTCAGG	Eberhard <i>et al.</i> , 2001
ND2	LMet*	GGCCCATACCCCGAAAATGA	Ribas <i>et al.</i> , 2007
	ND2H 6313*	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
	ND2H5766**	CGWAAAATCCTAGCCTTCTCATCC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
	ND2L5730**	CCTCACCTCACTAAACCC	Nodari, 2008
ND3	A6PWL*	CCTGAACCTGACCATGAAC	Eberhard e Bermingham, 2004
	H11151*	GATTTGTTGAGCCGAAATCAAC	Chesser, 1999
ATPase 6 e 8	CO2GQL*	GGACAATGCTCAGAAATCTGCGG	Eberhard e Bermingham, 2004
	CO3HMH*	CATGGGCTGGGGTTRACTATGTG	Eberhard e Bermingham, 2004
COI	Ltyr	TGTA AAAAGGWCTACAGCCTAACGC	Hadrath, não publicado
	COI H7557	GGCGGATGTGAAGTATGCTCGGG	Gonçalves, não publicado

* *Primers* utilizados na amplificação e sequenciamento; ** *Primers* utilizados somente para sequenciamento; *** *Primers* utilizados somente para amplificação.

Cerca de 5 µl de cada produto foi purificado segundo o protocolo modificado de Kusukawa *et al.* (1990): foi adicionado um volume de solução de polietilenoglicol (PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M) para cada volume de produto da PCR e misturado, incubado a 37 °C por 15 min; centrifugado a 12000 rpm por 15 min; descartado o sobrenadante; o precipitado foi lavado duas vezes com 125 µl de etanol 80% gelado; centrifugado por 10 min a 12000 rpm; o precipitado foi seco com bomba de vácuo por cerca de 30 min e ressuspensão em água.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e foi adicionada a seguinte mistura: 1,5 µl de solução *Big Dye*, 1,2 µl de *primer* (10 µM) e 5 µl (200ng) do produto. As reações foram colocadas em termociclador na seguinte condição: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 25 ciclos a 96 °C por 10 seg, 50 °C por 30 seg e 60 °C por 4 min, seguido de extensão a 72 °C por 10 min.

Foram adicionados 4 µl de água e 16 µl de etanol 95%. A solução foi misturada em agitador de tubos e mantida por 15 min à temperatura ambiente (~25 °C). A amostra foi centrifugada por 30 min a 12000 rpm e o sobrenadante retirado com auxílio de micropipeta do lado oposto ao precipitado de DNA. O precipitado foi lavado com cerca de 200 µl de etanol 70% e a solução foi misturada em um agitador de tubos e novamente centrifugada por 7 min a 12000 rpm. O

sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta. A amostra foi secada a 90 °C durante 2 min e mantida a -20 °C. Foi utilizado o sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

2.2.4 Análises dos dados

Microsatélites

A identificação do tamanho dos alelos foi feita com auxílio do programa MegaBACE™ Genetic Profiler Software Suite v2.2 (GE Healthcare). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada loco de microsatélite pela comparação das frequências de heterozigotos esperada e observada. A presença de associação alélica entre os locos foi avaliada pela realização de um teste no qual são criadas tabelas de contingências para todos os pares de locos e calculada a probabilidade para cada tabela usando a cadeia de Markov. Os dois testes foram feitos com auxílio do programa Genepop 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). Para avaliar a presença de alelos nulos, erros de genotipagem e *allele dropout* foi utilizado o programa Micro-checker (Brookfield, 1996).

A diversidade genética dos microsatélites foi avaliada segundo o número de alelos por loco e as heterozigosidades observada e esperada. Tais parâmetros foram também estimados com auxílio do programa Genepop 3.3 (Raymond e Rousset, 1995).

DNA mitocondrial

Utilizando o programa CodonCode Aligner v.1.6.3 (CodonCode Corporation) as sequências das duas fitas de DNA de cada amostra foram editadas e alinhadas. A partir da matriz de sequências alinhadas foram obtidos os números de haplótipos (h), as diversidades haplotípicas (k) e nucleotídicas (π) e os índices de neutralidade D_T (Tajima, 1989), F_s (Fu, 1997) e R_2 (Ramos-Onsins e Rozas, 2002) utilizando o programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). A significância dos valores dos testes de neutralidade foi determinada com base em 10.000 simulações de coalescência. Os testes aqui utilizados são brevemente descritos a seguir. Ramos-Onsins e Rozas (2002) apontam o teste de F_s de Fu (Fu, 1997) como um dos mais poderosos nas inferências de crescimento populacional e se baseia na comparação entre um valor de θ ($\theta = xN\mu$, onde x é igual 4 para genomas diplóides, N é o tamanho efetivo populacional e μ é a taxa de mutação por sequência por geração) estimado a partir do número de haplótipos (θ_h) e um a partir da média de diferenças nucleotídicas entre duas sequências (θ_π). Valores de F_s significativos e negativos ($p < 0,01$) são gerados pelo excesso de mutações, o que caracteriza um sinal de expansão populacional. O teste D de Tajima (Tajima, 1989) usa a média de diferenças par-a-par e o número de sítios segregantes. Valores negativos são interpretados como indicativo de populações que experimentaram mudanças de tamanho. Populações que sofreram recente gargalo ou apresentam estrutura genética populacional possuem valor positivo de D_T (Tajima, 1989). O teste R_2 é mais sensível para baixos

tamanhos amostrais, ou seja, ele não é tão adequado quando a amostragem é grande (Ramos-Onsis e Rozas, 2002).

Estrutura genética populacional

O programa STRUCTURE 2.2 (Prichard *et al.*, 2000) foi utilizado para inferir o número de populações (K) que melhor explica os dados por meio de um método de agrupamento Bayesiano baseado nos microssatélites. Os parâmetros utilizados nas análises foram 5.000 passos de *burn-in* e 1.000.000 iterações de MCMC. Cada simulação foi replicada 20 vezes como recomendado (Evanno *et al.*, 2005). Assumindo o número de populações resultante da análise Bayesiana, o grau de diferenciação entre esses grupos de indivíduos foi avaliado pela estimativa dos índices de fixação F_{ST} (para os dados de microssatélites e DNA mitocondrial) e R_{ST} (somente para os dados de microssatélites). Os valores de F_{ST} foram estimados segundo descrito por Weir e Cockerham (1984), por meio da análise da variância das frequências gênicas observadas entre diferentes populações assumindo o modelo de mutação de alelos infinitos (IAM; Kimura e Crow, 1964). Esses valores foram calculados com auxílio do programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). Os valores de R_{ST} foram estimados segundo descrito por Slatkin (1995) assumindo o modelo de mutação passo-a-passo (Ohta e Kimura, 1973) usando o programa RSTcalc (Goodman, 1997). A significância dos índices (*p-value*) foi estimada por testes de permutação (Weir e Cockerham, 1984) e os índices foram ajustados seguindo a correção de Bonerroni (Rice, 1989). O número de migrantes foi calculado utilizando do F_{ST} ($F_{ST} = 1/4 Nm + 1$) e R_{ST} ($MR = ds - 1/4 ds [1 - (R_{ST} - 1)]$), sendo Nm e MR o número de migrantes levando em consideração o F_{ST} e R_{ST} , respectivamente e ds o número total de populações. Os dois cálculos foram feitos com auxílio do programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

A análise de variância molecular (AMOVA, Excofier *et al.*, 1992) foi realizada utilizando o programa Arlequin 2.0 com a variação genética sendo particionada em três níveis: entre regiões (que correspondem aos grupos obtidos pelo Structure e pelo índice de F_{ST}), entre localidades dentro das regiões e dentro de localidades. Foram também feitos testes de atribuição baseados nos microssatélites (Paetkau *et al.*, 1995) assumindo a existência dos grupos pré-estabelecidos pelo Structure e índice F_{ST} . Esse teste calcula a probabilidade de um dado genótipo ocorrer em cada grupo pré-estabelecido. Assim, cada indivíduo é atribuído ao grupo para o qual seu genótipo tem maior probabilidade de pertencer (Waser e Strobeck, 1998). Esse teste foi realizado com auxílio do programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

A rede de haplótipos foi obtida para as sequências do DNA mitocondrial utilizando-se o método de *median-joining* com posterior análise de máxima parcimônia utilizando o programa Network 4.2.0.1 (<http://www.fluxus-technology.com>; Polzin e Daneschmand, 2003). Foi gerada

uma árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining* com modelo de substituição *p-distance* utilizando o programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Análises de *bootstrap* com 1000 réplicas foram realizadas para estimar o apoio de cada clado.

Inferências demográficas

Foi utilizado o método de excesso de heterozigotos (Cornuet e Luikart, 1996) implementado no programa Bottleneck 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999) para testar se há sinal de existência de gargalo populacional utilizando somente os microssatélites. O teste parte do princípio de que, após uma severa redução no tamanho efetivo populacional, o número de alelos é reduzido mais rápido do que a heterozigosidade esperada pelas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos polimórficos. Assim, segundo Luikart *et al.* (1998) populações que passaram por um recente processo de gargalo apresentam excesso de heterozigosidade. Isso faz com que heterozigosidade esperada (H_e) se torne maior que a heterozigosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva pois esta é calculada a partir do número de alelos (Cornuet e Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999). Três testes estatísticos estão disponíveis para avaliar a significância das comparações entre as heterozigosidades: *sign test* que apresenta pouco poder estatístico, pois considera somente o número esperado de locos que desviam significativamente dos valores de heterozigosidades esperadas no equilíbrio; *standardized differences test* que tem mais poder estatístico quando são analisados pelo menos 20 locos polimórficos e considera qual a probabilidade de desvio do equilíbrio mutação-deriva se todos os locos estiverem evoluindo de acordo com modelo de mutação específico e *Wilcoxon sign-rank test* que tem maior poder estatístico quando utilizados menos de 20 locos e número reduzido de amostras (Luikart *et al.*, 1997). O programa também permite assumir diferentes modelos de mutação, como o de alelos infinitos (IAM), de mutação a passo-a-passo (SMM) e de duas fases (TPM) (Estoup *et al.*, 2002). Todos os testes estatísticos foram realizados assumindo os três modelos de mutação.

A distribuição de diferenças nucleotídicas aos pares (*mismatch distribution*; Rogers e Harpending, 1992) foi obtida para a espécie como um todo e para cada grupo indicado pelos resultados da análise de estrutura populacional utilizando o programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). O tempo desde o evento de expansão foi estimado para as sequências mitocondriais concatenadas pela estatística Thau ($t = \tau/2\mu$; Rogers e Harpending, 1992) através do programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) sendo t o número de gerações desde o evento de expansão demográfica e μ a taxa de substituição de nucleotídeos/ geração. O intervalo de confiança de τ (95%) foi estimado por 1000 réplicas de *bootstrap*. Assumiu-se uma taxa de substituição de nucleotídeos para as sequências mitocondriais de 2,1% por milhões de anos (Weir e Schuter, 2008) e tempo de geração de nove anos (como adotado para *Ara ararauna*; Caparroz *et al.*, 2009a).

Para os dados de seqüenciamento, a estimativa da coalescência entre os grupos geneticamente estruturados foi obtida pelo programa Mdiv (Nielsen e Wakeley, 2001). O programa utiliza simulações da cadeia de Markov e Monte Carlo para estimar a máxima verossimilhança do parâmetro de diversidade genética (theta) θ ($2N_e\mu$), taxa de migração M (Nem) e tempo de coalescência T (t/N_e), onde N_e é o tamanho efetivo da população, μ é a taxa de substituição, m é o número de migrantes e t é o tempo de divergência. Foram realizadas quatro análises simultâneas com diferentes *random seeds*, cada uma com 5.000.000 ciclos e com um *burn-in* de 1.250.000, assumindo diferentes valores de $M_{MÁX}$ variando de 2,5 a 5 e $T_{MÁX}$ de 10 a 20 e utilizando o modelo de substituição HKY. Para calcular o tempo de divergência foi assumida a taxa de substituição constante de 1,6 a 2,1% por milhões de anos entre duas linhagens (Shields e Wilson, 1987; Fleischer e Mcintosh, 2001; Weir e Schuter, 2008). Assumindo o tempo de gerações de nove anos e que a sequência de DNA mitocondrial utilizada tem 2123 pb, foram utilizadas as taxas de $\mu = 15,2856 \times 10^{-5}$ e $\mu = 20,062 \times 10^{-5}$ substituições/ loco/ geração.

Foram também realizadas simulações coalescentes para testar as seguintes hipóteses: 1) uma única população se fragmentou em três há 3.000 gerações atrás e permanecem com tamanhos populacionais estáveis até o tempo atual. Esse tempo de divergência entre as populações foi apontado como resultado da análise no programa Mdiv. Além disso, o intervalo de 2.000 a 5.000 gerações coincide com o último máximo glacial (aproximadamente de 18.000 a 48.000 anos atrás; Behling e Lichte, 1997; Behling, 2002), assim, o valor de 3.000 gerações utilizado nesse cenário poderia sugerir uma possível influência da glaciação na história evolutiva das populações; 2) uma única população se fragmentou em três há 10.000 gerações atrás e permaneceram com tamanhos populacionais estáveis até o tempo atual. Essa hipótese foi testada pois a aproximadamente a 10.000 gerações possivelmente tenha ocorrido a época mais fria da Terra durante o Plesitoceno (Harris e Fairbridge, 1967) ; 3) as três populações sofreram um gargalo populacional há 1.000 gerações atrás. A hipótese de gargalo populacional foi levantada baseada em resultados de diversidade genética e *mismatch distribution*. O tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado a partir da aproximação de theta (θ), que é um parâmetro de diversidade genética, para a diversidade nucleotídica (π , sendo $\theta = \pi = 2N_e \mu$; Nei e Kumar, 2000). As simulações foram realizadas no programa SIMCOAL 2.1.2 (Laval e Excoffier, 2004) no qual foram geradas 1.000 genealogias aleatórias. Em todas as simulações foram assumidos os seguintes parâmetros: tamanho amostral utilizado nas análises populacionais (17 para Pantanal norte, 35 Pantanal sul e 28 norte+nordeste), um loco mitocondrial com 2123 pb e taxa de mutação de $0,945 \times 10^{-7}$. A taxa de mutação segue Weir e Schluter (2008) e tempo de geração de nove anos (Caparroz *et al.*, 2009a).

Origem de filhotes apreendidos

Baseado nos índices de F_{ST} e R_{ST} e no teste de atribuição tentou-se determinar a origem de filhotes apreendidos (Tabela 2.1). Os índices de similaridade entre esses filhotes também foram estimados baseados na fórmula $X = 2 N_{AB} / N_A + N_B$, onde X é o índice de similaridade, N_{AB} é o número de alelos compartilhados por A e B e N_A e N_B são o total de números de alelos dos indivíduos A e B, respectivamente.

2.3 Resultados

2.3.1 Microssatélites

Dentre os 19 pares de *primers* de microssatélites testados, treze resultaram em produtos de amplificação, e entre estes, onze apresentaram-se polimórficos (Tabela 2.2). Todos os locos utilizados no presente trabalho foram seqüenciados para confirmar a presença dos microssatélites (Presti, 2006 e presente estudo). Presti (2006) detectou que o loco amplificado com os *primers* MAC436 F/R não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg e ele não foi utilizado nas análises populacionais. Os números de alelos por loco variam de dois a nove entre os 98 indivíduos analisados (Tabela 2.4). A heterozigosidade observada por loco variou de 0,115 (UnaCT43) a 0,664 (UnaGT55), com média de 0,438 entre todos os locos. A heterozigosidade esperada por loco variou de 0,118 (UnaCT43) a 0,638 (Peeμ11) com média de 0,447 (Tabela 2.4). Os valores de diversidade nas diferentes regiões são semelhantes e não diferem estatisticamente (Tabela 2.4). Os dez locos de microssatélites analisados não apresentam evidência de desequilíbrio de ligação ($p > 0.05$), então, os locos podem ser considerados como marcadores independentes.

2.3.2 Sequências de genes mitocondriais

Com o objetivo de encontrar um marcador com variabilidade genética suficiente para estudos populacionais foram testados os seguintes marcadores para 10 indivíduos: 1048 pb da porção 5' do citocromo-b, 117 pb da porção 5' do ND5, 500 pb da porção 5' do COI, 1016 pb da porção 5' do ND2, 418 pb da porção 5' do ND3, 964 pb da porção 5' da ATPase 6 e 8 e 994 pb da porção 5' da região controladora, pois estes marcadores são amplamente utilizados em análises populacionais (Kirchman *et al.*, 2000, Mundy *et al.*, 2003, Pearce *et al.*, 2004, Friesen *et al.*, 2006; Noriko *et al.*, 2008; Nodari, 2008; Bos *et al.*, 2008; Russello *et al.*, 2008). Como não foi encontrado nenhum sítio polimórfico nas seqüências de COI, ND3 e ATPase 6 e 8, não foi possível utilizá-las nas análises populacionais. Como a região controladora se mostrou mais variável, esta foi utilizada no seqüenciamento de um número maior de indivíduos. Então, as seqüências da região controladora em 22 indivíduos apresentaram seis sítios variantes no domínio I, dois sítios variantes no domínio II e quatro sítios no domínio III. Entretanto, nas posições 679, 685 e 696 foram encontrados picos

duplos (Figura 2.3) em vários indivíduos que já haviam sido sequenciados com sucesso para outros genes. Essas seqüências dúbias foram obtidas mesmo a partir de *amplicons* da região controladora de aproximadamente 2 kb e seqüenciados utilizando *primers* internos. Para evitar erros nas análises posteriores, a região controladora foi excluída. Assim, após a seleção de marcadores, foram sequenciadas partes dos genes ND5, citocromo b e ND2, regiões estas, que apresentavam polimorfismo. Em 117 pb da porção 5' do ND5 (80 indivíduos) foi encontrado somente um sítio polimórfico, em 1048 pb da porção 5' do citocromo-b (80 indivíduos) foram encontrados quatro sítios polimórficos e em 958 pb da porção 5' do ND2 (80 indivíduos) foram verificados três sítios variáveis.

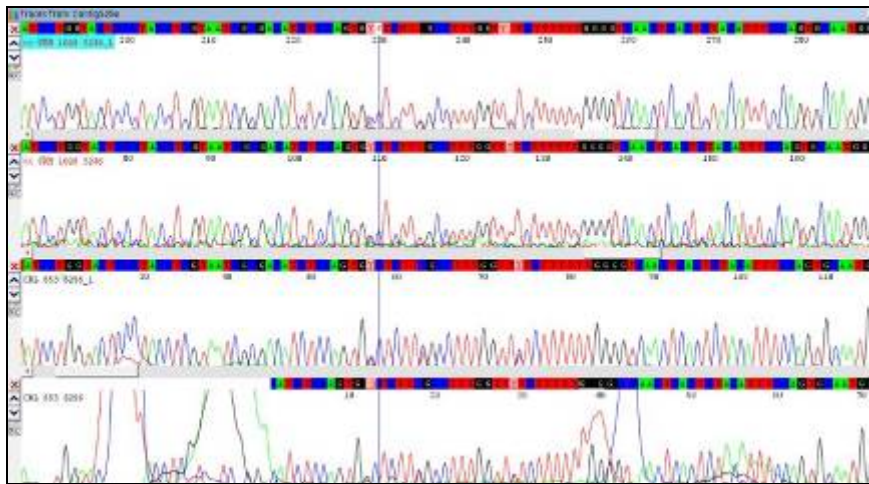


Figura 2.3 Eletroferogramas de seqüências de PCRs independentes da região controladora de um mesmo indivíduo mostrando picos duplos na mesma posição.

As seqüências dos genes ND5, citocromo b e ND2 de 80 indivíduos não apresentaram códons de parada inesperados. A matriz dessas seqüências concatenadas possui 2123 caracteres. A partir dessa matriz foram obtidos os números de sítios polimórficos e de haplótipos (h ; Tabela 2.5), os valores de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica para a espécie como um todo e para cada região geográfica (Tabela 2.6).

Tabela 2.4 Número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) por loco em cada localidade. Entre parênteses estão os números de indivíduos

Região* / Loco	UnaCT21	Una CT32	UnaCT43	UnaCT74	UnaGT55	UnaCT41	AgGT19	HYA1172	Peeμ11	Peeμ16	Média
PN (20)											
A	5	1	4	5	2	5	2	2	6	2	3,4
H_O	0,65	0,000	0,150	0,350	0,450	0,350	0,300	0,250	0,800	0,350	0,365
H_E	0,727	0,000	0,191	0,491	0,511	0,496	0,257	0,296	0,781	0,358	0,411
PS/MI (17)											
A	3	2	1	4	4	4	3	2	2	2	2,7
H_O	0,706	0,412	0,000	0,412	0,706	0,765	0,235	0,294	0,529	0,176	0,423
H_E	0,558	0,401	0,000	0,437	0,649	0,658	0,221	0,451	0,486	0,166	0,402
PS/NH (13)											
A	4	2	1	3	3	4	2	2	4	2	2,7
H_O	0,692	0,385	0,000	0,692	0,769	0,769	0,077	0,385	0,538	0,308	0,461
H_E	0,591	0,520	0,000	0,618	0,578	0,775	0,077	0,471	0,562	0,271	0,446
PS/AB (5)											
A	3	2	1	3	2	3	2	2	4	2	2,4
H_O	0,600	0,400	0,000	0,400	0,600	0,800	0,200	0,400	0,400	0,200	0,400
H_E	0,511	0,533	0,000	0,600	0,556	0,689	0,200	0,533	0,711	0,200	0,453
PS/RN (6)											
A	2	2	1	3	3	4	1	2	5	2	2,5
H_O	0,500	0,334	0,000	0,667	0,833	0,833	0,000	0,500	0,833	0,167	0,467
H_E	0,409	0,485	0,000	0,530	0,682	0,803	0,000	0,530	0,667	0,167	0,427
N (18)											
A	3	2	3	7	2	3	4	2	5	2	3,3
H_O	0,611	0,444	0,500	0,556	0,556	0,389	0,667	0,111	0,389	0,611	0,484
H_E	0,589	0,471	0,484	0,705	0,514	0,451	0,575	0,286	0,621	0,500	0,520
NE (19)											
A	4	2	2	5	4	4	3	2	4	2	3,2
H_O	0,684	0,421	0,158	0,474	0,737	0,474	0,579	0,053	0,579	0,421	0,458
H_E	0,656	0,444	0,149	0,514	0,565	0,626	0,582	0,150	0,637	0,398	0,472
Total de alelos	7	2	6	8	4	5	3	2	9	2	4,8
Média											
A	3,4	1,8	1,8	4,3	2,8	3,8	2,4	2,0	4,3	2,0	2,9
H_O	0,635	0,342	0,115	0,507	0,664	0,626	0,294	0,285	0,590	0,319	0,438
H_E	0,577	0,408	0,118	0,556	0,579	0,642	0,273	0,388	0,638	0,294	0,447

*PN- Pantanal norte; PS/MI - Miranda; PS/NH - Nhecolândia; PS/AB - Abobral; PS/RN - Rio Negro; N - Norte; NE - Nordeste

Tabela 2.5 Sítios variáveis em 2123 pb de DNA mitocondrial e número de indivíduos por região geográfica que possuem os haplótipos encontrados .

Haplótipo	Sequência	População					TOTAL
		PN	PS				
			MI	NH	AB	RN	
	2 2 2 3 9 1 1 2 0 1 5 6 7 9 0 6 8 0 1 2 1 3 5 7 4						
H_1	G G G G C G T G						01 02 03
H_2 A .	03	01				09 06 18
H_3 A A						04 04
H_4 A A .		11	06	05	02	24
H_5 T . . .		04	04		01	09
H_6	A A .	14					14
H_7	. . A . . . A .						02 02
H_8	A A A .	01					01
H_9 T A A .					01	01
H_10	. A A .						03 03
H_11	. . . A . . A .					01	01

PN- Pantanal norte; PS – Pantanal sul; MI - Miranda; NH - Nhecolândia; AB - Abobral; RN - Rio Negro; N - Norte; NE - Nordeste

Tabela 2.6 Análise de sequências mitocondriais concatenadas (2123 pb) de 80 indivíduos. Número de sítios polimórficos (P), número de haplótipos (h) e valores de diversidades haplotípica (k) e nucleotídica (π). Em parênteses estão os números de indivíduos analisados. Espécie: todos os indivíduos de *A. hyacinthinus* analisados; PN: Pantanal norte; PS/MI: Miranda; PS/NH: Nhecolândia; PS/AB: Abobral; PS/RN: Rio Negro; N: norte; NE: nordeste

Grupo	P	H	K	π
Espécie (80)	8	11	0,820	0,00071
PN (17)	2	3	0,324	0,00016
PS/MI (16)	3	3	0,492	0,00060
PS/NH (10)	4	3	0,600	0,00085
PS/AB (5)	0	1	0	0
PS/RN (4)	3	3	0,833	0,00079
N (11)	1	2	0,182	0,00009
NE (17)	4	5	0,831	0,00058

2.3.3 Diferenciação genética populacional

Alguns dos alelos dos microssatélites estudados são exclusivos de determinadas regiões. Por exemplo, dois alelos de cada um dos locos UnaCT21 e UnaCT43 são exclusivos do Pantanal norte e um alelo de cada um dos locos (UnaCT21, UnaCT43 e UnaCT74) somente ocorre nas regiões norte e nordeste. O loco UnaCT32 é monomórfico no Pantanal norte e polimórfico nas outras regiões e o loco UnaCT43 é monomórfico no Pantanal sul (Tabela 2.4).

O maior valor de verossimilhança para a estimativa do número de populações pela análise Bayesiana através dos microssatélites foi para quatro grupos (Figuras 2.4 e 2.5), que coincidem com Pantanal norte, Pantanal sul, norte e nordeste. Entretanto, pode-se observar uma tendência de mistura entre os indivíduos do norte e nordeste (Figura 2.5). Este teste também foi aplicado somente considerando as araras do Pantanal sul para verificar se existe alguma estruturação dentro dessa região e o maior valor de verossimilhança foi observado para uma única população.

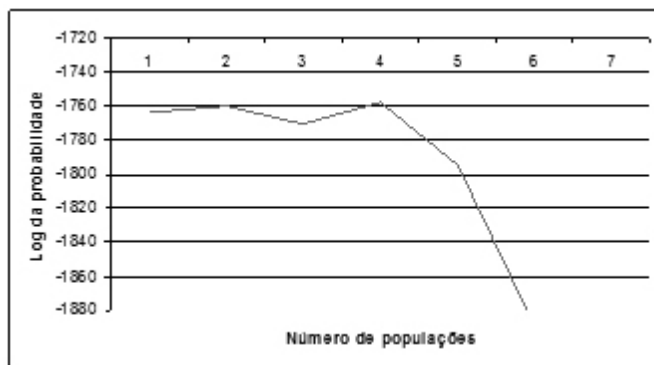


Figura 2.4 Gráfico do número de populações mais prováveis pelo log da probabilidade obtido da análise dos microssatélites.

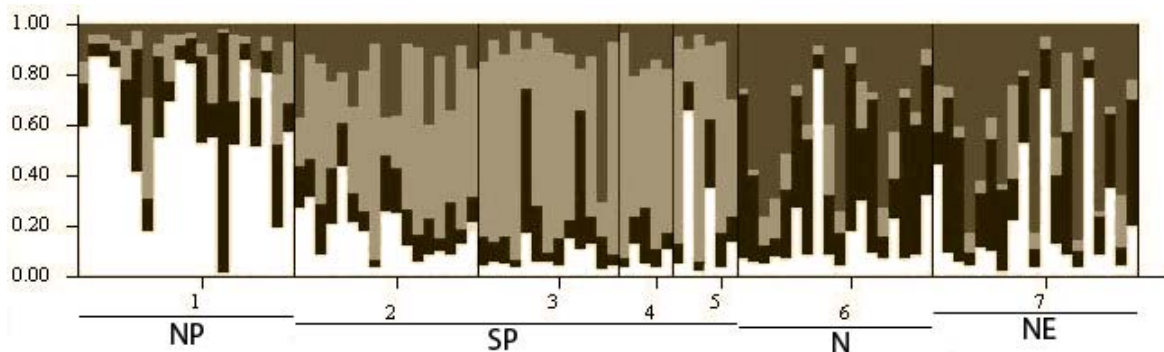


Figura 2.5 Resultado da análise no programa STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma barra que contém diferentes proporções de quatro cores que representam as quatro populações. PN- Pantanal norte (1); PS- Pantanal sul (2, 3, 4 e 5); N – norte (6) e NE – nordeste (7).

Os índices de fixação obtidos baseados nos locos de microssatélites (Tabela 2.7) entre as subregiões do Pantanal sul (Miranda, Nhecolândia, Abobral e Rio Negro) foram negativos e não significativamente diferente de zero ($p > 0,05$), exceto entre Miranda e Nhecolândia (R_{ST} significativamente diferente de zero, $p < 0,05$). Assim, esses resultados indicam que dentro do Pantanal sul não existe diferença detectável na sua composição genética, sugerindo que exista somente uma população. Os demais índices evidenciam moderado grau de diferenciação genética entre a maioria dos demais pares de localidades estudadas com exceção do F_{ST} entre as regiões norte e nordeste. Os índices de F_{ST} para as sequências de DNA mitocondrial foram calculados

utilizando a matriz de sequências concatenadas (ND5/citb/ND2) e mostraram forte estruturação entre Pantanal norte, Pantanal sul e norte/nordeste (Tabela 2.8). Como esperado, as subpopulações do Pantanal sul não apresentaram diferenciação e, por isso, em algumas análises posteriores as sub-regiões do Pantanal sul serão reunidas em um único grupo. O número de migrantes por geração estimado a partir do índice de F_{ST} está na tabela 2.9.

Tabela 2.7 Valores de F_{ST} (abaixo da diagonal) e R_{ST} (acima da diagonal) entre indivíduos de *A. hyacinthinus* de várias localidades obtidos a partir da análise de microssatélites. Valores estatisticamente significantes estão em negrito ($p < 0,01$) ou sublinhados ($p < 0,05$).

Localidade	PN (20)	PS/MI (17)	PS/NH (13)	PS/AB (5)	PS/RN (6)	N (18)	NE (19)
PN (20)	-	0,0444	0,0782	<u>0,0746</u>	<u>0,0716</u>	0,0941	0,0723
PS/MI (17)	0,07108	-	<u>0,0268</u>	-0,0115	0,0104	0,0829	0,0469
PS/NH (13)	0,12415	0,03310	-	-0,0311	-0,0102	0,0667	0,0896
PS/AB (5)	0,15031	0,00968	-0,01030	-	-0,0284	<u>0,0599</u>	<u>0,0685</u>
PS/RN (6)	0,09408	0,00270	-0,02468	-0,00976	-	0,0981	0,1005
N (18)	0,08172	0,08954	0,09599	0,09809	0,09542	-	0,0250
NE (19)	0,06893	0,05713	0,10019	0,10476	0,09374	0,01402	-

PN- Pantanal norte; PS/MI - Miranda; PS/NH - Nhecolândia; PS/AB - Abobral; PS/RN - Rio Negro; N - norte; NE – nordeste. Valores ajustados pela correção Bonferroni ($p < 0,05$).

Tabela 2.8 Valores de F_{ST} entre *Anodorhynchus hyacinthinus* de origem conhecida estimados a partir de 2158 pb do DNA mitocondrial (ND5, citb e ND2). Valores estatisticamente significantes estão em negrito ($p < 0,01$). Em parênteses estão os números amostrais

Localidade	PN (17)	PS/MI (16)	PS/NH (10)	PS/AB (5)	PS/RN (4)	N (11)
PN (17)	-					
PS/MI (16)	0,61496	-				
PS/NH (10)	0,62636	-0,04523	-			
PS/AB (5)	0,85758	0,08499	0,22078	-		
PS/RN (4)	0,73034	-0,11880	-0,16412	0,23077	-	
N (11)	0,73454	0,39589	0,41550	0,88397	0,60217	-
NE (17)	0,52679	0,31351	0,29303	0,50723	0,35768	0,08704

Pantanal norte - PN, Pantanal sul dividido em quatro sub-regiões: Miranda – PS/MI, Nhecolândia – PS/NH, Abobral – PS- AB e Rio Negro – PS/RN, norte - N e nordeste – NE. Valores ajustados pela correção Bonferroni ($p < 0,05$).

Tabela 2.9 Número de migrantes (Nm) calculado a partir do F_{ST} baseado nos dados de microssatélites (abaixo da diagonal) e do DNA mitocondrial (acima da diagonal).

População	PN	PS	N+NE
PN	*	0,36024	0,41593
PS	2,32075	*	0,86382
N+NE	3,407235	2,69004	*

A AMOVA foi inicialmente calculada considerando sete localidades (Pantanal norte, Miranda, Nhecolândia, Abobral, Rio Negro, norte e nordeste) dentro de quatro grupos (Pantanal norte, Pantanal sul, norte e nordeste); nesse caso, as sub-regiões do Pantanal sul foram consideradas como pertencentes a um único grupo, pois os índices de F_{ST} para os dois tipos de marcadores e R_{ST} para os microssatélites não indicaram diferenciação entre elas (Tabela 2.10). Além disso, a AMOVA também foi realizada considerando as mesmas sete localidades dentro de três grupos (Pantanal norte, Pantanal sul e norte+nordeste); nesse caso, norte e nordeste foram considerados como um único grupo já que os valores de F_{ST} para os dois tipos de marcadores não indicaram diferenciação entre eles (Tabela 2.10). Entre os dois marcadores, os microssatélites apresentaram maior nível de variação dentro das localidades (IL, Tabela 2.10), o que não é surpresa por ser um marcador hipervariável (Bech *et al.*, 2009). Os dois testes de AMOVA mostraram que a variação entre os grupos é mais ou menos sete vezes a variação dentro dos grupos para os microssatélites e entre 15 e 18 vezes para as sequências do DNA mitocondrial. Assim, os resultados da AMOVA também indicam ausência de estruturação entre as sub-regiões do Pantanal sul e entre norte e nordeste, pois há um aumento no valor da divergência entre os grupos.

Tabela 2.10 Resultados da AMOVA para dois modelos de estrutura populacional para os dados de microssatélites e mitocondriais. IL: porcentagem da variação atribuída a divergências intra-localidades; IG: porcentagem da variação atribuída a divergências intra-grupos; EG: porcentagem da variação atribuída a divergências entre grupos. Os cálculos de variação Φ_{ST} , Φ_{SC} e Φ_{CT} são referentes às divergências intra-localidades, intra-grupos e entre grupos, respectivamente. * $p < 0,01$; $p < 0,05$; sem asterisco $p > 0,05$.

<i>Modelo</i>	<i>Marcador</i>	<i>IL</i>	<i>IG</i>	<i>EG</i>	Φ_{ST}	Φ_{SC}	Φ_{CT}
N e NE	Microssatélite	91,78%	0,53%	7,69%	0,08224*	0,00577	0,07692**
N e NE	DNA mitocondrial	52,11%	2,46%	45,43%	0,4789*	0,0451	0,4543*
N+NE	Microssatélite	91,12%	0,98%	7,9%	0,08878*	0,01067	0,07895**
N+NE	DNA mitocondrial	50,13%	3%	46,87%	0,4987*	0,0564	0,4687*

N e NE – regiões norte e nordeste analisadas separadamente; N+NE – norte e nordeste analisadas como uma única população.

O teste de atribuição realizado tem como uma das premissas que as populações se apresentem diferenciadas e por esta razão, as amostras das sub-regiões do Pantanal sul foram agrupadas para a realização dessa análise com os dados de microssatélites. O resultado mostrou que 86,7% dos indivíduos analisados foram corretamente atribuídos ao seu grupo de origem (Tabela 2.11). Como alguns testes não demonstram a separação genética entre as regiões norte e nordeste, também foi realizado o teste de atribuição considerando a região norte e nordeste como um único

grupo e a porcentagem de indivíduos corretamente atribuídos à sua região de origem aumentou para 89, 8% (Tabela 2.12).

Tabela 2.11 Número de indivíduos que foram atribuídos a cada região geográfica e porcentagens de indivíduos que foram corretamente atribuídos à sua região de origem (%). Entre parênteses estão os números de indivíduos analisados

Região ou grupo de origem	Região atribuída				%
	PN	PS	N	NE	
PN (20)	19	1	0	0	95
PS (41)	2	38	1	0	95
N (18)	1	0	14	3	77.8
NE (19)	2	1	2	14	73.7
AP1 (10)	1	0	5	4	n.a.
AP2 (4)	0	0	4	0	n.a.
AP3 (2)	0	2	0	0	n.a.
AP4 (8)	1	0	5	2	n.a.

PN- Pantanal norte; PS – Pantanal sul; N - norte; NE- nordeste; n.a. – não se aplica.

Tabela 2.12 Número de indivíduos que foram atribuídos a cada região geográfica e porcentagens de indivíduos que foram corretamente atribuídos à sua região de origem (%). Entre parênteses estão os números de indivíduos analisados

Região ou grupo de origem	Região atribuída			%
	PN	PS	N+NE	
PN (20)	19	1	0	95
PS (41)	2	37	2	90,2
N+NE (37)	3	2	32	86
AP1 (10)	1	0	9	n.a.
AP2 (4)	0	1	3	n.a.
AP3 (2)	0	2	0	n.a.
AP4 (8)	3	0	5	n.a.

PN- Pantanal norte; PS – Pantanal sul; N - norte; NE- nordeste; n.a. – não se aplica.

Na rede de haplótipos obtida (Figura 2.6) foi possível observar a presença de haplótipos exclusivos no Pantanal Sul, Pantanal Norte, região norte e nordeste. Entretanto, há um haplótipo com alta frequência que ocorre em todas as regiões, exceto nas subregiões de Nhecolândia, Abobral e Rio Negro. A estrutura da rede de haplótipos contendo haplótipos com baixa frequência na população, especialmente na região nordeste, indicando possível expansão populacional recente. Além disso, a rede evidencia dois agrupamentos de haplótipos do Pantanal Sul independentes (não próximos entre si). A localização dos pontos de coleta de cada uma das amostras (Figura 2.7) indicou que a localização não tem correlação com os dois grupos de haplótipos. Isso foi confirmado em um teste de atribuição desses indivíduos baseados nos microssatélites (*assignment test*) no qual todos os indivíduos foram agrupados em uma única população, exceto o indivíduo com haplótipo 2

que foi atribuído ao PN e um indivíduo (dos 24) com haplótipo 4 foi atribuído ao N. Ainda, o F_{ST} baseado nos microssatélites entre os indivíduos que contém esses dois haplótipos é baixo e não significativo ($F_{ST} = -0,01012$; $p = 0,80$).

Os agrupamentos observados na árvore filogenética (Figura 2.8) possuem valores de *bootstrap* baixos, o que não permite realizar muitas inferências. Entretanto, é possível verificar um grupo contendo 15 dos 17 indivíduos do Pantanal norte e dois grupos (sem relação próxima) com 34 dos 35 indivíduos do Pantanal sul (Figura 2.8).

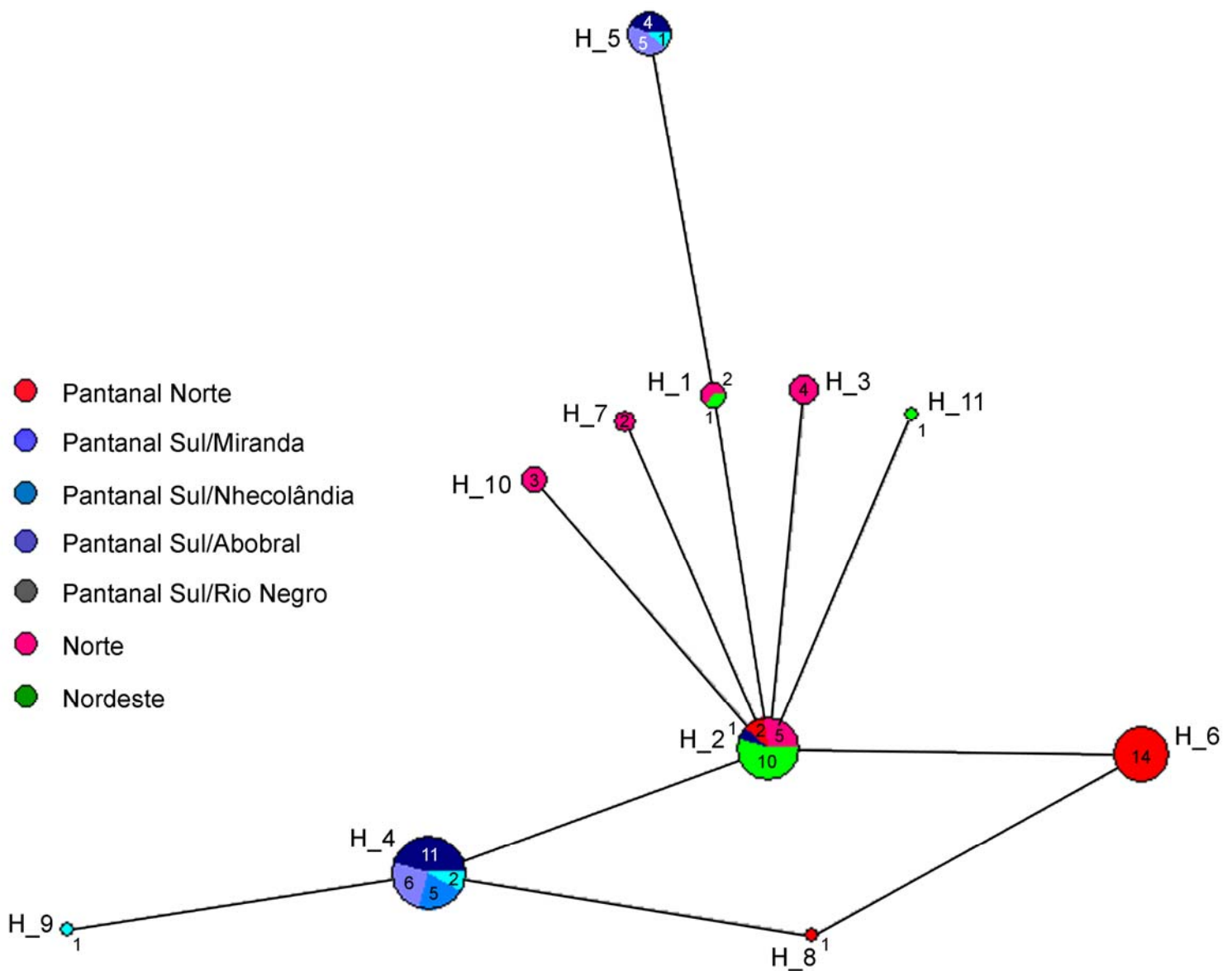


Figura 2.6 Rede de haplótipos baseada no conjunto de dados mitocondriais concatenados (2158 pb) de 80 indivíduos. O número de indivíduos de cada localidade com um determinado haplótipo está indicado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo.

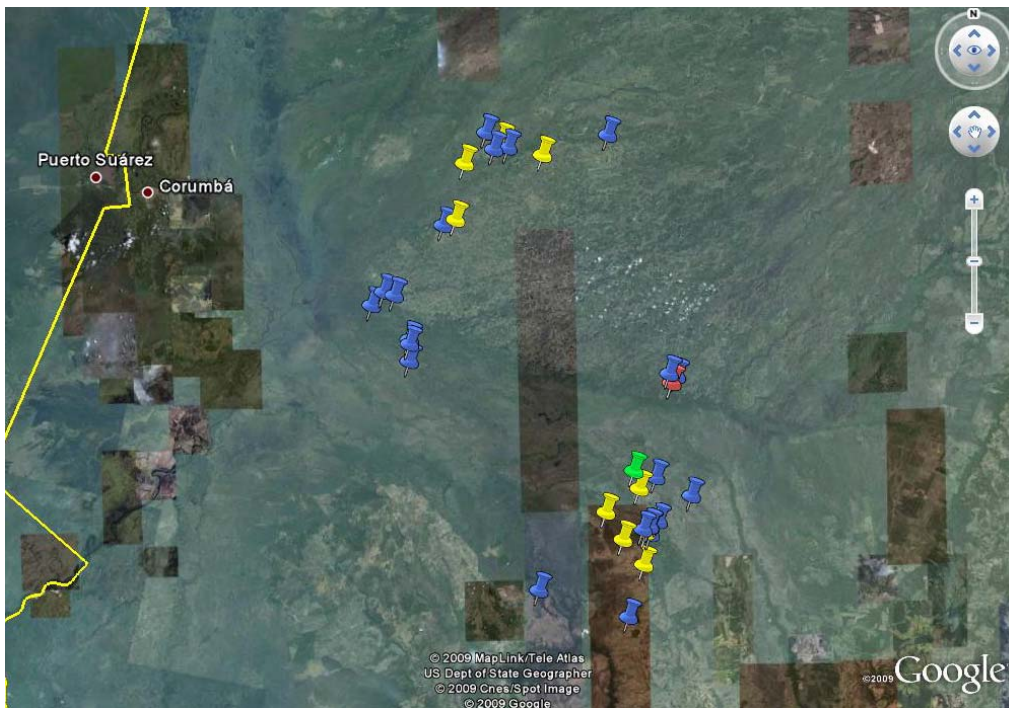


Figura 2.7 Distribuição dos indivíduos do Pantanal sul. Em azul: haplótipo 5 (H_5, Figura 2.6); amarelo: haplótipo 4 (H_4); verde: haplótipo 2 (H_2); vermelho: haplótipo 9 (H_9). Fonte: Google Earth.

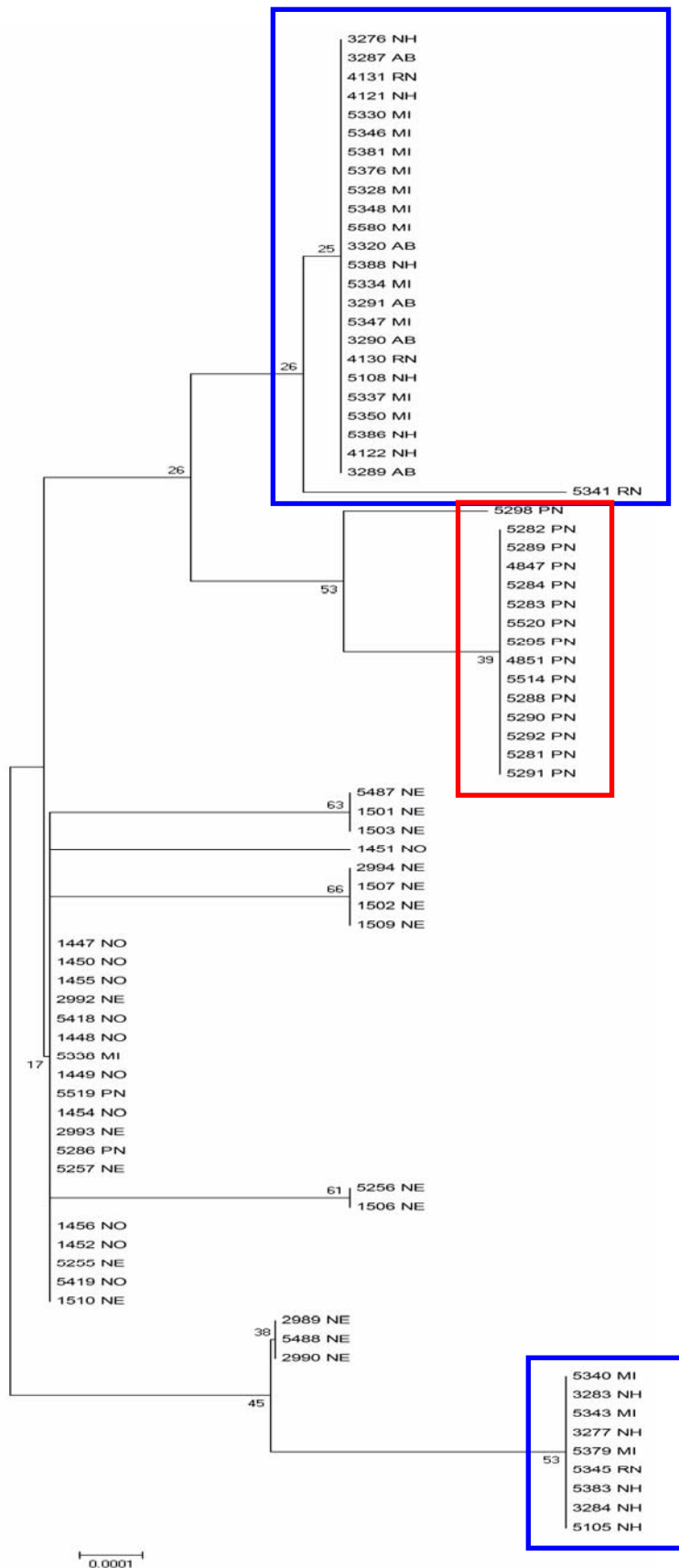


Figura 2.8 Árvore filogenética obtida pelo método de distância baseada em 2158 pb de genes mitocondriais. Valores de *bootstrap* de cada clado estão indicados. Vermelho: Pantanal norte; Azul: Pantanal sul.

2.3.4 Inferências demográficas

Não foi detectado significativo excesso de heterozigotos para os locos de microssatélites estudados sugerindo que a população estudada está em equilíbrio mutação-deriva e, portanto, não há sinal de gargalo. Os testes de neutralidade D_T , F_S e R_2 das sequências mitocondriais concatenadas para todos os indivíduos não foram significativos (Tabela 2.13). Os testes também não foram significativos para os grupos do Pantanal norte, Pantanal sul, norte e nordeste separadamente (Tabela 2.13). Ou seja, não há sinal de expansão populacional. Como foram identificados grupos geneticamente estruturados, cada um foi analisado quanto a diferenças nucleotídicas aos pares (*mismatch distribution*; Figura 2.9). As curvas para N e NE são unimodais, indicando expansão populacional; enquanto para as populações do Pantanal Norte e do Pantanal Sul são bimodais indicando um padrão de população estável (Rogers e Harpending, 1992) (Figura 2.9).

Tabela 2.13 Índices de neutralidade D_T (Tajima, 1989), F_S (Fu, 1997) e R_2 (Ramos-Onsins e Rozas, 2002) para a espécie como um todo e para as populações geneticamente estruturadas e os níveis de significância dos índices (p). PN: Pantanal norte, PS: Pantanal sul, N: norte, NE: nordeste.

Grupo	D_T	$p(D_T)$	F_S	$p(F_S)$	R_2	$p(R_2)$
Espécie (80)	-0,2161	0,49	-3,3232	0,07715	0,0918	0,458
PN (17)	-1,06916	0,176	-1,038	0,09161	0,1299	0,1864
PS (35)	0,81132	0,813	0,226	0,57665	0,1597	0,8105
N (11)	-1,12850	0,137	-0,41	0,33661	0,2875	1
NE (17)	-0,09739	0,593	-0,8344	0,26186	0,1526	0,4336
N+NE (28)	-0,91898	0,209	-2,207	0,0623	0,0871	0,092

Para o PN a data desde o evento de expansão demográfica baseado no τ médio foi de 8.842 anos [IC 95% τ min (0 anos) e τ max (23.332 anos)]. Para o PS, τ médio foi de 92.767,5 anos [IC 95% τ min (0 anos) e τ max (1.210.028 anos)]. Para NO+NE, τ médio foi de 24.390 anos [IC 95% τ min (11.250 anos) e τ max (44.730 anos)]. Esses resultados mostram que as regiões do Pantanal podem não ter sofrido uma expansão, já que o valor de τ mínimo é de zero. Observa-se que a diferença de valores de τ min e τ max para a população do PS é grande, sugerindo que o teste não detectou nenhum sinal de expansão.

A estimativa da coalescência gerou probabilidades posteriores dos parâmetros θ , M e T entre PN vs. PS, PN vs. N+NE e PS vs. N+NE (Figura 2.10). Os valores com as maiores probabilidades estão na tabela 2.14. Os baixos valores de M concordam com N_m por geração estimados a partir do F_{ST} baseado nas sequências de DNA mitocondrial (Tabela 2.9). O tempo de divergência (t) estimado assumindo-se μ mínimo de $15,286 \times 10^{-5}$ e máximo de $19,107 \times 10^{-5}$ foi de aproximadamente 2700 a 3400 anos entre PN e PS, de 3600 a 4600 entre PN e N+NE e 1900 a 2300 anos entre PS e N+NE (Tabela 2.14).

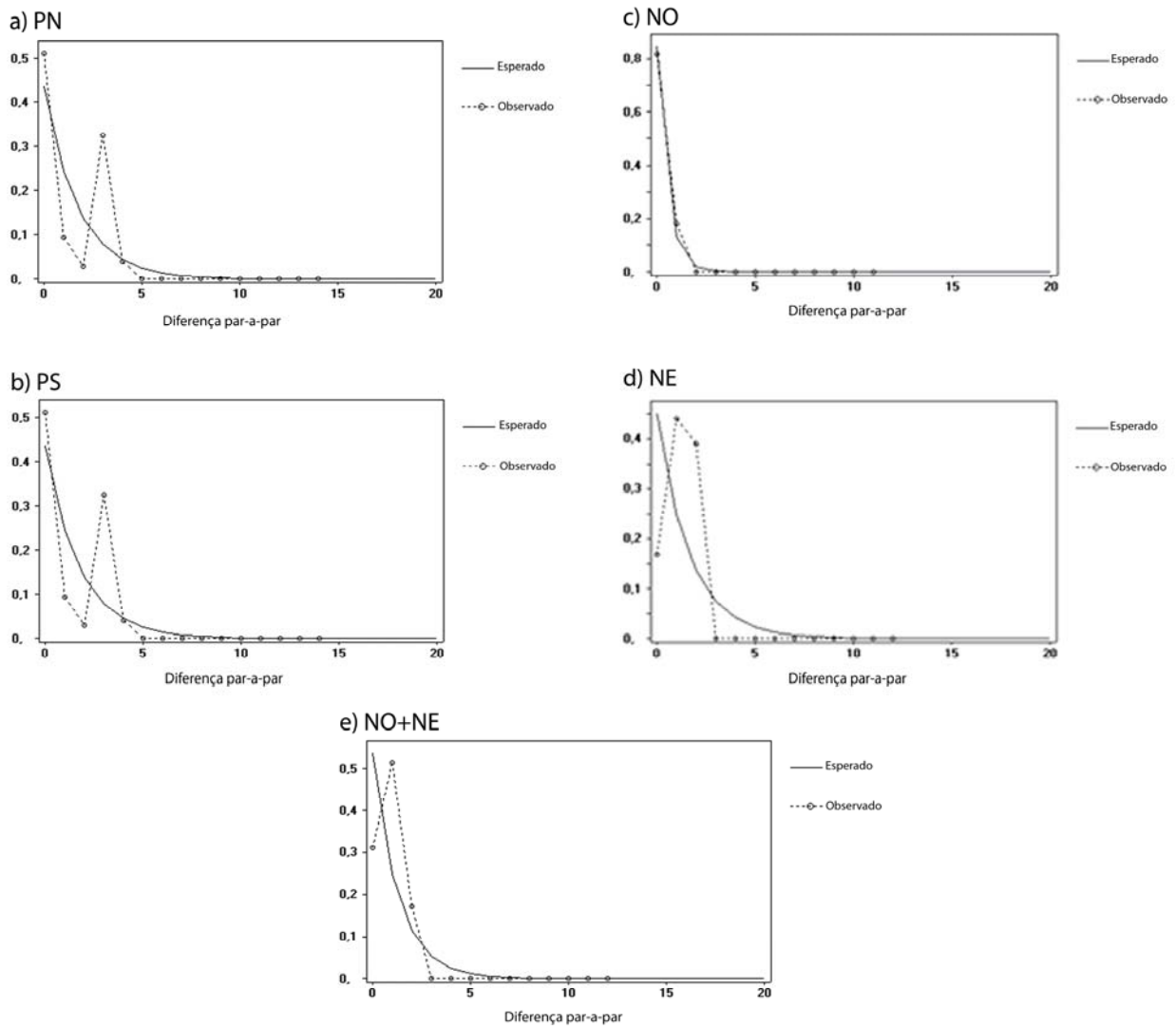
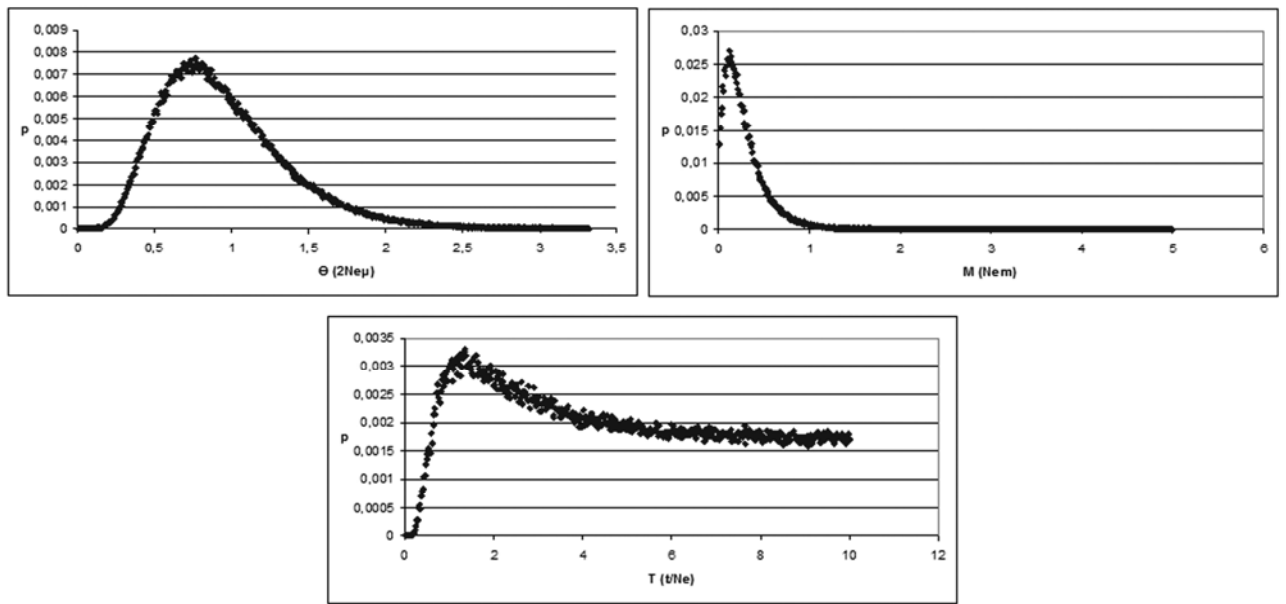


Figura 2.9 Distribuições de diferenças nucleotídicas aos pares (*mismatch distribution*) baseado no conjunto de dados mitocondriais concatenados.

Tabela 2.14 Parâmetros de coalescência estimados com auxílio do programa MDiv. Taxa de substituição baseada na divergência de 1,6% e 2,1% por milhões de anos. Theta θ ($2N_e\mu$), taxa de migração M (Nem) e tempo de coalescência T (t/Ne), onde Ne é o tamanho efetivo da população, μ é a taxa de substituição, m é o número de migrantes e t é o tempo de divergência.

Par de populações	Taxa de substituição	θ	M	T	Ne	t (anos)
PNXPS	$15,286 \times 10^{-5}$	0,763475	0,12	1,36	2497	30.567,77
	$20,062 \times 10^{-5}$				1902	23290,13
PNXN+NE	$15,286 \times 10^{-5}$	0,970104	0,15	1,44	3173	41.125,46
	$20,062 \times 10^{-5}$				2417	31334,23
PSXN+NE	$15,286 \times 10^{-5}$	0,873442	0,215	0,82	2857	21.085,21
	$20,062 \times 10^{-5}$				2176	16.065,20

a) Pantanal norte x Pantanal sul



b) Pantanal norte x norte/nordeste

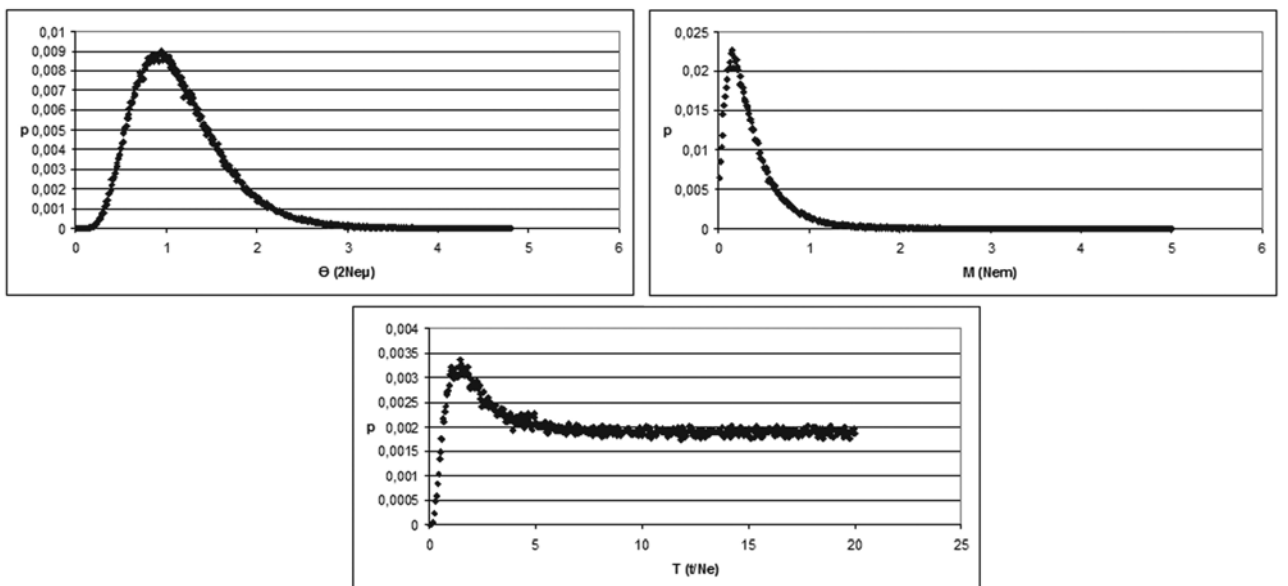
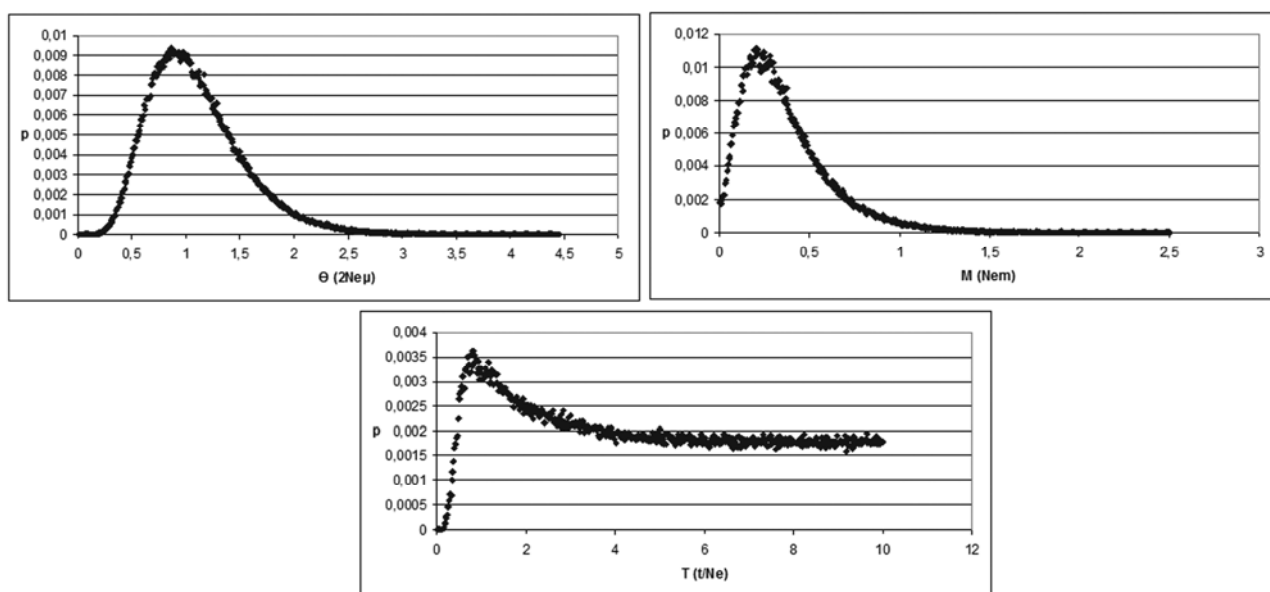


Figura 2.10 Probabilidades posteriores dos parâmetros de coalescência.

c) Pantanal sul x norte/nordeste



(continuação) **Figura 2.10** Probabilidades posteriores dos parâmetros de coalescência.

Os valores médios e os desvios-padrão das assinaturas demográficas de três cenários simulados foram calculados (ver cenários na legenda e valores na tabela 2.15). Os valores observados nos testes de neutralidade são próximos daqueles simulados para os cenários 1 e 2, que assumem modelos de população com tamanho estável após a fragmentação.

Tabela 2.15 Valores médios e desvios-padrão dos testes de neutralidades das simulações. Os cenários testados foram: 1) uma única população se fragmentou em três há 3.000 gerações atrás e estas permaneceram com tamanhos populacionais estáveis até o tempo atual; 2) uma única população se fragmentou em três há 10.000 gerações atrás e estas permaneceram com tamanhos populacionais estáveis até o tempo atual; 3) as três populações sofreram um gargalo populacional há 1.000 gerações atrás.

<i>Teste</i>	<i>População</i>	<i>Cenário 1</i>	<i>Cenário 2</i>	<i>Cenário 3</i>	<i>Valor observado</i>
Fs Fu	PN	- 3,4028	- 3,4028	0,3507 ± 0,0028	- 3,3232
	PS	- 3,4028	- 3,4028	2,07 ± 0,006714	- 1,038
	N+NE	-2,0398 ± 0,1469	-2,0411 ± 0,1480	3,54 ± 0,00671	- 2,207
D Tajima	PN	1,6256± 00936	2,884 ± 0,0957	8,2022± 0,0258	- 1,0692
	PS	1,4308 ± 0,1550	1,4309 ± 0,1591	6,7772 ± 0,0688	0,8113
	N+NE	1,3001 ± 0,4001	1,2968 ± 0,4085	5,3997 ± 0,1544	- 0,9189

PN – Pantanal Norte; PS – Pantanal Sul; N+NE – norte + nordeste.

2.3.5 Origem de filhotes apreendidos

Como o F_{ST} e o R_{ST} não foram significativos na comparação entre as sub-regiões do Pantanal sul (Tabelas 2.7 e 2.8) e o F_{ST} e teste de atribuição não foram significativos na comparação para as regiões norte e nordeste (Tabelas 2.7, 2.8, 2.11 e 2.12), foram inicialmente considerados sete grupos nas análises de origem de aves apreendidas: Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), norte + nordeste (N+NE) e quatro grupos de filhotes apreendidos (AP1 a AP4) (Tabela 2.16). Para a apreensão 1 (AP1), os valores de F_{ST} só não mostraram diferenciação genética com AP4 e os dados de R_{ST} indicam ausência de diferenciação com N+NE e com AP4 (Tabela 2.16). Para AP2, os valores de F_{ST} indicaram ausência de diferenciação com PS, N+NE, AP3 e AP4; e os valores de R_{ST} mostraram ausência de diferenciação somente com AP4. Os valores de F_{ST} obtidos para AP3 indicaram diferenciação com AP1, enquanto todos os valores de R_{ST} sugerem diferenciação em relação a todos os demais grupos. Para AP4, os valores de F_{ST} mostraram diferenciação com PN e PS; e R_{ST} mostrou diferenciação com N+NE, AP1 e AP3.

Tabela 2.16 Valores estimados de F_{ST} (abaixo da diagonal) e de R_{ST} (acima da diagonal) entre *A. hyacinthinus* de origem conhecida (Pantanal norte - PN, Pantanal sul - PS, norte - N e nordeste - NE) e quatro grupos de apreensão (AP1 a AP4). Valores estatisticamente significantes em negrito ($p < 0,01$) e sublinhados ($p < 0,05$). Em parênteses estão os números amostrais.

Grupo	PN	PS	N+NE	AP1	AP2	AP3	AP4
PN (20)	-	0,0641	0,0815	0,0974	0,0292	0,0963	0,0180
PS (41)	0,07335	-	0,0740	0,0717	0,0304	0,0318	0,0271
N+NE (13)	0,05224	0,09473	-	0,0291	0,0223	0,0774	0,0632
AP1 (10)	0,08531	0,17375	0,03471	-	0,0171	0,0293	0,0524
AP2 (4)	0,11657	-0,0059	0,07797	<u>0,20242</u>	-	0,0428	-0,0101
AP3 (2)	0,07302	0,04288	0,04296	0,16525	0,00699	-	0,0853
AP4 (8)	0,08493	0,11726	0,03547	0,05051	<u>0,19138</u>	<u>0,12742</u>	-

PN- Pantanal norte; PS – Pantanal sul; N - norte; NE- nordeste.

O teste de atribuição foi inicialmente calculado considerando oito potenciais grupos aos quais cada indivíduo poderia ser atribuído: PN, PS, N, NE e os quatro grupos de apreensão. O resultado mostrou que entre os 24 indivíduos apreendidos, a maioria deles foi atribuída ao seu próprio grupo e somente dois (8%) apresentam maior probabilidade de ser de uma das quatro regiões estudadas. Em uma análise subsequente os indivíduos das apreensões foram atribuídos somente às quatro regiões geográficas para identificar para qual delas a probabilidade de origem era maior. Da AP1, 50% dos indivíduos apresentam maior probabilidade de pertencerem ao grupo do N e 40% ao NE. A AP2 apresenta 100% dos indivíduos atribuídos ao NE. Os filhotes da AP3 possuem maior probabilidade de pertencerem ao PS. Dos indivíduos da AP4, 62,5% possuem maior probabilidade de terem N como origem e 25%, NE (Tabela 2.11). Quando as regiões N e NE são

reunidas em um único grupo, 90% da AP1 são atribuídos ao N+NE, 75% da AP2 atribuídos N+NE e 25% ao PN, todos os indivíduos da AP3 atribuídos ao PS e 62,5% dos indivíduos da AP4 são atribuídos ao N+NE e 37,5% ao PN (Tabela 2.12).

Os índices de similaridade simples observados entre os filhotes da AP1 variaram de 0,45 a 0,85 com média de $0,67 \pm 0,095$. Os índices da AP2 variaram de 0,40 a 0,78 com média de $0,518 \pm 0,135$. O índice entre os dois filhotes da AP3 foi de 0,81, e entre os indivíduos da AP4 variou de 0,375 a 0,85 com média de $0,646 \pm 0,110$. Esses índices também foram estimados entre possíveis indivíduos não relacionados (filhotes encontrados em diferentes ninhos no Pantanal norte) e variaram de 0,2 a 1,0 com média de $0,61 \pm 0,15$ (843 pares de comparações). As médias observadas dentro dos grupos de apreensão são significativamente maiores ($p < 0,05$) que as observadas entre filhotes não-relacionados.

2.4 Discussão

2.4.1 Diversidade genética

Os microssatélites analisados de 98 indivíduos de *Anodorhynchus hyacinthinus* apresentaram de dois a nove alelos e a média da heterozigosidade observada foi de 0,438 (Tabela 2.4). As análises das sequências mitocondriais de 80 indivíduos revelaram variabilidade muito baixa, apresentando apenas oito sítios polimórficos em 2123 pb e 11 haplótipos com diversidade nucleotídica de 0,00071 (Tabela 2.6). Comparativamente, em 49 *Ara ararauna* (espécie para a qual foram desenvolvidos seis dos dez *primers* de microssatélites utilizados no presente trabalho), seis microssatélites apresentaram de três a 11 alelos e a média de heterozigosidade observada foi de 0,604 e em 1290 pb da região controladora foram encontrados 28 haplótipos e 39 sítios variáveis e nucleotídica de 0,0074 (Caparroz, 2003; Caparroz *et al.*, 2009a). Portanto, o grau de diversidade genética encontrada em *A. ararauna* é maior que a observada em *A. hyacinthinus* para os dois marcadores. A diferença no nível de variabilidade dessas duas espécies também foi observada em análises de minissatélites de loco único, microssatélites e 472 pb da região controladora do DNA mitocondrial (Faria e Miyaki, 2006; Faria *et al.*, 2007). Este resultado também é congruente com os dados obtidos pelo método de *DNA fingerprinting* que mostrou 65,60% de variabilidade genética em *A. hyacinthinus* (C. Y. Miyaki, dados não publicados) e 68,50% para *A. ararauna* (Caparroz *et al.*, 2001a).

O menor grau de variabilidade nos microssatélites de *A. hyacinthinus* poderia ser resultado da utilização de *primers* heterólogos ou ser uma característica da espécie. Os gêneros *Ara* e *Psittacus* (para os quais os *primers* foram originalmente desenvolvidos) não são grupos irmãos do gênero *Anodorhynchus* e não são proximamente relacionados entre si (Tavares *et al.*, 2006; Tokita *et al.*, 2007). Em geral o polimorfismo diminui quanto mais distante filogeneticamente é a espécie

alvo da espécie original dos microssatélites, mas outros estudos têm encontrado alta variabilidade genética nos microssatélites mesmo utilizando *primers* heterólogos (Primmer *et al.*, 2005). Como os resultados obtidos com as sequências mitocondriais também mostram baixa variabilidade, parece que o nível baixo de variabilidade genética deve ser uma característica da espécie estudada. *A. hyacinthinus* e *A. ararauna* são consideradas ameaçada e não ameaçada de extinção, respectivamente (BirdLife International, 2000). Essas categorias de ameaça estão relacionadas com tamanhos populacionais. É estimado que a população de *A. hyacinthinus* apresente de 2.500 a 10.000 indivíduos (BirdLife International, 2010) e o tamanho populacional de *A. ararauna* é desconhecido, mas certamente maior que 10.000 indivíduos. Então, a menor variabilidade genética em *A. hyacinthinus* seria esperada. Entretanto, nem sempre o fato de a espécie ser ameaçada está associado à baixa variabilidade genética. Por exemplo, um estudo de uma espécie de ave marinha criticamente ameaçada de extinção (*Pterodroma magentae*) mostrou uma alta variabilidade nos genomas mitocondrial e nuclear em relação a outras espécies de aves proximoamente relacionadas e com graus de ameaças diversos (Lawrence *et al.*, 2008). De fato, é difícil comparar a diversidade genética em organismos com diferentes histórias evolutivas. Todos os fatores citados acima poderiam estar colaborando com a baixa variabilidade em *A. hyacinthinus*.

2.4.2 Estrutura genética populacional

A análise Bayesiana (Figuras 2.4 e 2.5) e os índices de R_{ST} (Tabela 2.7) baseados nos microssatélites evidenciaram a existência de moderada diferenciação genética entre quatro principais grupos: Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), norte (N) e nordeste (NE). Entretanto, valores de F_{ST} confirmam a moderada (microssatélites, Tabela 2.7) e a alta (DNA mitocondrial, Tabela 2.8) diferenciação entre os mesmos pares das principais regiões, exceto entre N e NE. Os testes de atribuição (Tabelas 2.11 e 2.12) e a AMOVA também indicam três grupos geneticamente diferenciados. A diferenciação entre Pantanal e as regiões norte e nordeste não é surpresa dado as distâncias que separam estas regiões (média de 700 km). Esses resultados estão de acordo com Faria *et al.* (2007) que encontraram significativa diferenciação entre as populações de *A. hyacinthinus* do Piauí e do Pantanal sul ($F_{ST} = 0,33$; $p < 0,001$ e $F_{ST} = 0,25$; $p < 0,001$; Abobral e Miranda, respectivamente).

As regiões N e NE apresentaram baixa diferenciação genética evidenciada pelos valores de R_{ST} (Tabela 2.7) e análise bayesiana, mas não apresentaram diferenciação segundo o F_{ST} baseado nos microssatélites (Tabela 2.7), testes de atribuição (Tabelas 2.11 e 2.12) e em todas as análises com genes mitocondriais (Tabela 2.8). Analisando um mapa com a distribuição de registros da espécie proposto por Antas *et al.* (no prelo, Figura 2.11), a distribuição da espécie parece mais

contínua entre essas regiões. Assim, existem duas hipóteses que poderiam explicar a baixa diferenciação entre N e NE:

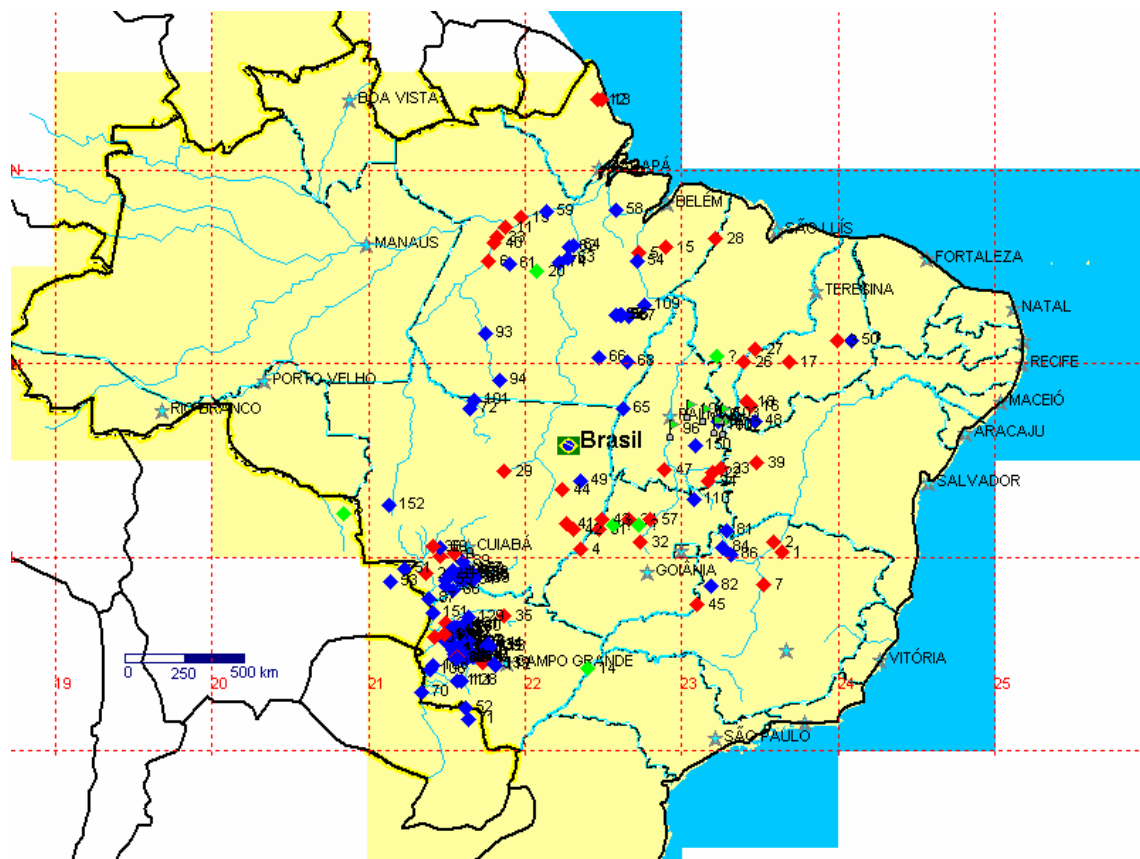


Figura 2.11 Mapa de ocorrência de *Anodorhynchus hyacinthinus*. Os pontos em vermelho indicam locais com registro da espécie com data anterior a 1950, em azul são registros posteriores a 1950. Todos esses pontos possuem coordenadas conhecidas e verificadas na origem do registro (museu ou observação). É importante enfatizar que a maioria dos registros pós 1950 são de observações. Os pontos grandes em verde são registros sem precisão de localidade e indicados na posição mais próxima da descrição. Pequenas bandeiras verdes correspondem a pontos descritos em documento do Governo do Tocantins em 2003 (Antas *et al.*, no prelo).

1) a ausência de diferenciação entre esses grupos evidenciada por alguns testes pode ser devido à existência de algum fluxo gênico (tão baixo que não é sempre detectável) entre eles. Pois, apesar de a maior probabilidade obtida na análise bayesiana foi de existir quatro grupos, houve uma tendência à mistura entre N e NE (Figura 2.5) e o R_{ST} pode ter sido superestimado, pois é mais sensível à variância no número amostral (Baloux e Lugon-Moulin, 2002).

2) o isolamento de araras nessas duas regiões ocorreu recentemente e não houve tempo suficiente para essas populações se diferenciarem e por isso, testes supostamente mais sensíveis, como a análise Bayesiana, seriam capazes de detectar estruturação, enquanto outros, como o F_{ST} , por exemplo, não teriam essa capacidade. Ainda, a taxa de mutação dos microssatélites é maior do que

do DNA mitocondrial e, por isso, somente as análises realizadas com esse marcador foram capazes de detectar estruturação genética entre as regiões N e NE. Um dado que apóia essa hipótese é a estruturação entre o Pantanal norte e sul que poderia estar indicando que uma distância de 500 km de ausência de araras pode ser barreira para essa espécie. Portanto, com a destruição do habitat e o aumento da distância entre N e NE, pode ser possível que elas já estejam isoladas, mas o tempo ainda foi insuficiente para que alguns dos testes pudessem detectar a diferenciação.

Existem outros fatores que podem estar afetando esses resultados: baixo número amostral e origem dos indivíduos. Os números de indivíduos analisados do N e NE são baixos em relação aos das duas regiões no Pantanal e isso pode estar impedindo a detecção das diferenças. Além disso, cinco das 19 amostras do NE foram obtidos de apreensão cuja origem exata é desconhecida.

Os resultados de F_{ST} , R_{ST} (Tabelas 2.7 e 2.8), testes de atribuição (Tabelas 2.11 e 2.12), rede de haplótipos (Figura 2.6) e árvore filogenética (Figura 2.8) sugerem alguma diferenciação genética entre norte e sul do Pantanal. As amostras coletadas nessas localidades distam de menos de 500 km e não há nenhuma barreira física conhecida entre essas áreas. Além disso, *A. hyacinthinus* tem alta capacidade de vôo (Forshaw, 1989). Assim, a diferenciação genética observada não era esperada. Entretanto, não há nenhum dado em literatura ou registro em museu da existência de *A. hyacinthinus* entre essas duas regiões (Antas *et al.*, no prelo). Assim, uma hipótese plausível para explicar essa diferenciação seria que a fidelidade ao sítio de nidificação sugerido por observações de campo (Guedes e Harper, 1995) somada a uma possível área de ausência de ocorrência de *A. hyacinthinus* entre as regiões amostradas poderia restringir o fluxo gênico entre os dois grupos. De alguma maneira, a área entre essas duas regiões pode funcionar como uma barreira. Entretanto, se grupos de *A. hyacinthinus* ocorrerem em áreas entre essas regiões, é importante obter essas amostras e incorporá-las em futuras análises.

Como esperado, devido às pequenas distâncias (120 a 200 km) entre as sub-regiões do Pantanal sul (Miranda, Nhecolândia, Abobral, e Rio Negro) não foi detectada diferenciação genética entre elas (Tabelas 2.7 e 2.8). Este resultado sugere que os indivíduos podem dispersar pequenas distâncias, se tornando residentes e se reproduzir em novos lugares e as diferenças paisagísticas e a separação de áreas no Pantanal por rios propostas por Silva e Abdon (1998) não são barreiras para a movimentação de *A. hyacinthinus*. Essas hipóteses são congruentes com dados de *radio tracking* (N.M.R. Guedes, comunicação pessoal) e de análises genéticas (Faria *et al.*, 2007) que não mostraram evidências de diferenciação genética entre Miranda e Abobral ($F_{ST} = 0,05$; $p = 0,12$). Essa associação entre curtas distâncias de ocorrência e ausência de diferenciação genética foi encontrada em duas outras espécies de psitacídeos: *Amazona auropalliata* (Wright *et al.*, 2005) e *Ara ararauna* (Caparroz *et al.*, 2009a).

Os resultados dos testes de atribuição (Tabelas 2.11 e 2.12) mostraram que foi possível atribuir corretamente 89,8% dos 98 indivíduos de *A. hyacinthinus* à região geográfica de origem das amostras. As porcentagens observadas de atribuições corretas em cada uma das quatro principais regiões (86 a 95%) foram maiores do que as observadas para o mamífero *Gulo gulo* que apresenta moderada estruturação genética (47 a 74%; Kyle e Strobeck, 2001). Esses autores também verificaram que quanto mais forte é a estrutura populacional, maior é a taxa de atribuições corretas. Resultados similares também foram observados por Paetkau *et al.* (1995). Esses autores usaram oito locos de microssatélites e obtiveram 56 a 66% dos indivíduos de três populações de urso moderadamente estruturadas atribuídos corretamente e sugerem que seria necessário aumentar o número de locos polimórficos para aumentar a porcentagem de atribuições corretas.

Comparando os resultados de diferenciação obtidos utilizando seis locos de microssatélites (Presti, 2006) com os obtidos no presente estudo (aumento do número de locos para 10 e da amostragem das regiões norte e nordeste), verifica-se um aumento nos valores de F_{ST} e R_{ST} para a maioria das combinações e de atribuições corretas à sua região de origem (76,8% em Presti, 2006). Entretanto, no geral não houve mudanças significativas. Uma observação interessante em relação aos resultados obtidos é a diferença entre os resultados de F_{ST} obtidos a partir das análises dos microssatélites (Tabela 2.7) e os obtidos com dados de sequenciamento do DNA mitocondrial (DNAMt, Tabela 2.8). Essa diferença poderia ser explicada pela existência de diferença de distância de dispersão dependente do sexo. Como o DNAMt apresenta um padrão de herança predominantemente materno, se as fêmeas são mais filopátricas do que os machos, seria esperado que isto contribuísse para um aumento significativo na estruturação genética do DNAMt quando comparado aos marcadores com herança biparental, como os microssatélites. Os resultados obtidos no presente estudo, de estruturação populacional maior para o DNAMt do que para marcadores nucleares, estão de acordo com o padrão geral descrito para aves de dispersão diferencial (Greenwood, 1980; Clarke *et al.*, 1997). Em *Ara ararauna* foram verificados dois grupos genéticos quando analisada a região controladora do DNAMt e ausência de estrutura genética nos resultados de microssatélites e os autores concluem que a melhor explicação para essa diferença seria uma possível filopatria de fêmeas e maior movimentação dos machos, homogeneizando a composição genética do marcador nuclear (Caparroz *et al.*, 2009a). Dados semelhantes foram obtidos para a ave *Mergus merganser* analisada para dois marcadores nucleares e um mitocondrial (Hefti-Gautschi *et al.*, 2009). Outra explicação possível para essa diferença é que o DNAMt possui herança matrilinear e haplóide, então o tamanho populacional efetivo é aproximadamente um quarto do DNA nuclear, resultando no aumento da taxa de deriva genética e rápida aproximação do equilíbrio entre deriva e migração em populações que não tem alta taxa de desvio sexual ou poligamia nos machos (Birky *et al.*, 1983). Com isso, a menor estruturação encontrada no DNA nuclear pode ser decorrente do

pouco tempo de isolamento das populações (Keeney *et al.*, 2005), apesar de os microssatélites apresentarem taxa de mutação maior que a do DNAm (Brown *et al.*, 1982; Dallas, 1992). Além disso, os microssatélites podem conter homoplasias e estas podem subestimar os valores de diferenciação populacional (Hefti-Gautschi *et al.*, 2009).

2.4.3 Apreensões

Baseado em valores de F_{ST} e/ou R_{ST} estimados a partir de dados dos microssatélites, cada um dos quatro grupos de apreensão (AP1 a AP4) apresentou ausência de diferenciação com pelo menos uma das regiões estudadas (PN, PS, N e NE; Tabela 2.16). Foram observadas diferenças nos valores obtidos a partir do F_{ST} e R_{ST} . Essa diferença pode ter ocorrido devido às diferentes sensibilidades dos parâmetros quanto à variância no número amostral entre os grupos analisados, sendo o R_{ST} mais sensível à variância do que o F_{ST} (Baloux e Lugon-Moulin, 2002). Como a amostragem dos grupos de apreensão tem alta variância (de 2 a 10 indivíduos) em relação às populações analisadas (13 a 41 indivíduos), a interpretação dos dados de F_{ST} pode ser mais realista do que a de R_{ST} em alguns casos. Entretanto, os resultados dos dois índices devem ser considerados de forma complementar.

No primeiro teste de atribuição realizado (cada grupo de apreensão também foi considerado como um potencial grupo de origem), 92% dos indivíduos apreendidos (22 dos 24 filhotes) não foram atribuídos a nenhuma das quatro regiões geográficas, mas a seu grupo de apreensão correspondente. Esse resultado poderia indicar que essas aves pertenciam a quatro populações geneticamente diferenciadas das amostras de procedência conhecida que não foram amostradas no presente trabalho. Uma hipótese alternativa é que alguns filhotes poderiam ser irmãos, pois apresentam alta similaridade genética entre si, e isso favoreceria atribuições com altas probabilidades a seu grupo de apreensão correspondente. Quando um dos indivíduos de pares que apresentam alta similaridade genética foi retirado da análise, todos os indivíduos da AP2 (quatro indivíduos) e da AP3 (duas aves) e 20% dos indivíduos da AP4 (dois dos oito filhotes) foram atribuídos a alguma das quatro regiões. Isto sugere que a segunda hipótese pode explicar os resultados. No entanto, para AP1 essa hipótese não parece plausível, pois mesmo com a retirada da análise de um indivíduo de pares com alta similaridade não houve aumento na porcentagem de atribuição a algum dos quatro grupos com procedência conhecida.

Quando o teste foi realizado considerando somente as quatro regiões geográficas como possível origem, os indivíduos de AP1 e AP2 mostraram alta probabilidade de pertencer às regiões N e NE (Tabelas 2.11 e 2.12). Esse resultado é parcialmente corroborado pelos índices de F_{ST} que não são significantes ($p > 0.05$) entre AP2 e N+NE, e entre AP2 e PS; mas é incongruente com a ausência de diferenciação de AP1 com qualquer região. Os índices de R_{ST} sugerem ausência de

diferenciação entre todos os pares de grupos. Esses resultados contraditórios podem ser devido à amostragem limitada e o teste aplicado não conseguir distinguir as populações. Entretanto, esses resultados sugerem que os filhotes da AP1 e AP2 não seriam do Pantanal, mas possuem maior probabilidade de terem sido capturados nas regiões N ou NE. Esse resultado não estaria de acordo com as informações dadas pelo traficante de que as aves haviam sido capturadas no Pantanal. Entretanto, o estágio de desenvolvimento dos filhotes da AP1 e AP2 não era similar ao de filhotes monitorados naquele momento pelo Projeto Arara azul na região do Pantanal (N.M.R. Guedes, com. pess.). Assim, é possível que esses filhotes tenham sido realmente capturados fora do Pantanal e o traficante estava passando por lá para atravessar a fronteira em direção à Bolívia. Essa saída ilegal de aves silvestres brasileiras via Bolívia já havia sido registrada (M. Herrera, com. pess.) para a arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*) que é endêmica da Bahia e ameaçada. Assim, a análise genética realizada pode contribuir com o melhor conhecimento das rotas de tráfico ilegal de animais silvestres, o que pode gerar planos de ação mais eficientes contra esse tipo de crime.

Os dois filhotes da AP3 foram apreendidos em Miranda (uma das quatro sub-regiões do Pantanal sul). Havia forte suspeita que esses dois indivíduos tivessem sido capturados nessa região, já que foram apreendidos com uma índia. Os resultados do teste de atribuição corroboraram essa hipótese (Tabelas 2.11 e 2.12), já que ambos os indivíduos foram atribuídos à essa região. Os dados de F_{ST} corroboraram parcialmente esse resultado, com valores não significantes ($p > 0,05$) entre AP3 e N e NE, e entre AP3 e PS (Tabela 2.16), enquanto foram significantes entre AP3 e NE ($p < 0,05$). Os índices de R_{ST} também foram significantes ($p < 0,05$) entre todos os pares de grupos. Esses resultados não congruentes podem ser devido à baixa amostragem de indivíduos da apreensão (duas aves), pois o teste depende das frequências das populações definidas *a priori*. Como a apreensão é analisada como uma população, as frequências alélicas foram calculadas somente com dois indivíduos. Após a apreensão, a índia admitiu ter capturado esses indivíduos no Pantanal, então, o teste de atribuição está de acordo com a confissão.

Os dados de F_{ST} da AP4 mostraram ausência de diferenciação em relação ao N e NE (Tabela 2.16). Entretanto, os índices de R_{ST} não foram significantes somente na comparação entre AP4 e PN, AP4 e SP e AP4 e AP2. Finalmente, o teste de atribuição mostrou que 62,5% dos indivíduos foram atribuídos ao N e NE e 37,5% ao PN. Esta apreensão ocorreu em uma rodovia (Castello Branco) que é uma das principais rotas para o Pantanal. Então, é possível que esses filhotes tenham sido capturados em alguma das regiões do Pantanal. Como não existe informação e nem amostras da região entre o norte e sul do Pantanal, existe uma possibilidade de que esses indivíduos tenham sido capturados em uma terceira área no Pantanal. Essa hipótese pode ajudar a explicar os valores não significantes de F_{ST} e R_{ST} .

Os valores de F_{ST} , R_{ST} e testes de atribuição da amostra utilizada para a análise dos grupos de apreensão sofreram uma significativa alteração quando são comparadas as análises obtidas utilizando seis locos de microssatélites (Presti, 2006) com as análises desta tese. Isso deve estar associado à variação da frequência alélica das populações e indica que o aumento no número de locos pode resultar em análises mais confiáveis.

2.4.4 Inferências demográficas

O gênero *Anodorhynchus* compreende somente três espécies (*Anodorhynchus hyacinthinus*, *A. leari* e *A. glaucus*) sendo uma delas provavelmente extinta (*A. glaucus*). O número total de indivíduos de *A. hyacinthinus* é de até 10.000 indivíduos (BirdLife International, 2010). A população estimada de *A. leari* é de 1.200 aves (Oliveira e Barbosa, 2010) e sempre foi considerada rara. No começo do século XIX *A. glaucus* era considerada comum ao longo do rio Paraná. Existem registros em Corrientes na Argentina, no Uruguai e no Rio Grande do Sul, no Paraná e em Santa Catarina no Brasil (Sick, 1997). Essas informações sugerem que as espécies desse gênero sejam muito sensíveis às variações ambientais.

Segundo Tavares *et al.* (2004, 2006), a linhagem do gênero *Anodorhynchus* surgiu entre 15 e 23 milhões de anos atrás. Nesse período ocorreram incursões marinhas na América do Sul, provocando diversas mudanças que afetaram todos os biomas (Lovejoy *et al.*, 1998), o que pode ter levado muitas linhagens a se diferenciar. Outro evento que pode ter influenciado estas divergências foi o final do soerguimento dos Andes e a mudança do curso do rio Amazonas, o que também coincide com um evento de resfriamento global (Hoorn *et al.*, 1995). Esses eventos fizeram com que os ventos úmidos não pudessem chegar ao interior do continente gerando uma baixa umidade do ar e levando à formação de habitats abertos (Pennington *et al.*, 2005) o que poderia resultar na diversificação de plantas e animais desses ambientes, como é o caso de espécies do gênero *Anodorhynchus*.

As datações de Tavares *et al.* (2004, 2006) indicam que *A. hyacinthinus* e *A. leari* se separaram há aproximadamente 3,8 milhões de anos, no Plioceno. Durante o início do Plioceno (± 5 Ma) ocorreram eras glaciais que causaram esfriamento global, o que pode ter contribuído para a expansão de campos e, conseqüentemente, de espécies de áreas abertas (Haffer, 1997).

A data que estimamos para a divergência entre os grupos geneticamente diferenciados de *A. hyacinthinus* é de 16 mil a 42 mil anos atrás, o que corresponde ao final do Pleistoceno. Essa datação corresponde ao último período glacial que alguns autores calculam ser entre 18 mil e 48 mil anos atrás (Behling e Lichte, 1997; Behling, 2002). Durante essa fase glacial, as geleiras continentais avançaram (Sant'Anna Neto e Nery, 2005) e acredita-se que regiões de vegetação aberta ampliaram sua distribuição enquanto as florestas reduziram sua área (Haffer, 1967). Assim, é

possível que esse evento tenha provocado fragmentação na distribuição geográfica de *A. hyacinthinus*. Crick (2004) discute que as mudanças climáticas desse período modificaram as áreas de ocorrência das espécies de aves, principalmente devido a alterações no ciclo anual e abundância de recursos alimentares entre outros. Assim, a perda ou ganho de habitat poderiam levar à expansão ou contração da distribuição de espécies em resposta a mudanças climáticas dependendo do grau de dependência que elas têm daquele ambiente. *A. hyacinthinus* é dependente de árvores ou ocos de paredões para nidificação então, quando as florestas recuaram, grupos de indivíduos poderiam ter ficado isolados, promovendo a separação dos grupos existentes atualmente e provocando a diferenciação genética observada no presente trabalho. Além disso, a espécie apresenta alta filopatria favorecendo a sua fragmentação e diminuição do fluxo genético entre grupos. Por outro lado, durante o último período de glaciação do Pleistoceno três outras espécies de aves de áreas alagadas do Pantanal se beneficiariam com o ambiente de vegetação aberta (colhereiro *Platalea ajaja*, tuiuiú *Jabiru mycteria* e cabeça-seca *Mycteria americana*) e parecem ter sofrido expansão populacional, o que foi sugerido pelos padrões unimodais da *mismatch distribution*, pelos testes de neutralidade e pelos tempos médios de expansão populacional (entre 30.843 e 14.233 anos atrás; Lopes *et al.*, 2007). Apesar de o Pantanal ser uma área de ocorrência de *A. hyacinthinus*, não encontramos sinais de expansão nesse período e essa diferença pode ser resultante da diferença na biologia das espécies. As espécies estudadas por Lopes *et al.* (2007) são dependentes de zonas úmidas, enquanto que *A. hyacinthinus* não é, portanto, diferentes recursos ambientais estariam influenciando o padrão de distribuição dessas espécies. Podemos observar ainda outros eventos ocorrendo com espécies que apresentam a biologia distinta das espécies citadas acima como a harpia (*Harpia harpyja*) da América do Sul que é predominantemente florestal. As populações dessa espécie parecem ter sofrido expansão populacional durante o período anterior ao último período glacial que foi datada em aproximadamente 60 mil anos com posterior redução populacional quando as florestas recuaram (Lerner *et al.*, 2009).

A baixa variabilidade encontrada em *A. hyacinthinus* poderia ser resultante de uma redução populacional que pode ter sido seguida ou não de expansão, não tendo havido tempo suficiente para recuperar a variabilidade perdida no gargalo. Assim, analisamos se os dados aqui obtidos possuem algum sinal de instabilidade demográfica por meio de testes de neutralidade. Esses testes, além de avaliar a neutralidade dos dados, permitem avaliar a presença de sinal de expansão populacional, pois analisam se os dados obedecem ao modelo de populações em equilíbrio neutro (Nielsen, 2001). Portanto, índices de neutralidade com valores significativos podem estar associados a efeitos seletivos e/ou demográficos como expansão ou gargalo. Como os índices de neutralidade obtidos no presente trabalho não foram significativos, nenhuma discussão mais profunda pode ser feita, entretanto, eles podem estar indicando ausência de modificações no tamanho populacional. Além

disso, não foi observado sinal de gargalo através da análise não significativa da comparação entre a heterozigosidade esperada e a esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva dos microssatélites (programa Bottleneck). Entretanto, a rede de haplótipos sugere a existência de expansão populacional recente devido ao seu formato em estrela com três haplótipos de maior frequência e oito haplótipos de baixa frequência. Destes oito, cinco são da região norte/nordeste. Da mesma maneira, o padrão unimodal da *mismatch distribution* indica sinal de expansão para os dados mitocondriais das populações do N e NE. Esses resultados podem ser contraditórios, mas é interessante citar que o mesmo padrão foi encontrado para o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) que também é uma espécie que prefere áreas abertas na região neotropical. Ou seja, nenhum sinal de gargalo foi observado utilizando o programa Bottleneck (Leite *et al.*, 2008), mas há sinal de expansão recente na distribuição de diferenças nucleotídicas par-a-par e na rede de haplótipos. Entretanto, para essa espécie de papagaio foi observada maior diversidade genética (16 sítios polimórficos em um fragmento de 506 pb do COI de 59 indivíduos; Caparroz *et al.*, 2009b), sugerindo um possível evento de expansão mais antigo do que para a espécie em estudo aqui.

Como os resultados de simulação dos cenários de expansão e estabilidade populacional baseado no DNA mitocondrial (programa Simcoal) de *A. hacinthinus* apontam para uma população estável ao longo do tempo, é possível que a *mismatch distribution* e a rede de haplótipos não tenham recuperado com sucesso a história ocorrida com essa espécie. Ramos-Onsins e Rozas (2002) compararam vários testes que detectam crescimento populacional e verificaram que a *mismatch distribution* é muito conservativa e possui pouco poder de detecção de modificação populacional, não sendo muito adequado para esse tipo de inferência. É importante lembrar que o tempo de geração das araras-azuis é muito longo. O adulto só se torna reprodutivamente maduro depois dos sete anos e, em geral, nas suas estações reprodutivas iniciais não deve conseguir se reproduzir todos os anos (Guedes, 1993). Essa característica também pode influenciar nossos resultados, pois para essa espécie, o tempo necessário para os eventos demográficos sofrerem algum efeito pode ser longo. Além disso, o evento pode ser tão recente que os testes de neutralidade não detectaram o desvio. A rede de haplótipos (Figura 2.6) tem padrão congruente com expansão recente, já que se pode observar a presença de haplótipos de baixa frequência e com poucos passos mutacionais separando dos haplótipos mais frequentes. Além disso, a baixa variabilidade encontrada no conjunto de dados analisados também é uma grande limitação para os testes estatísticos (Ramos-Onsins e Rozas, 2002).

Com relação à modificação no tamanho populacional dessa espécie, o único dado existente foi gerado pelo Projeto arara-azul. O Projeto arara-azul é um projeto que estuda a biologia e relações ecológicas da arara-azul-grande, realiza o manejo e promove a conservação da espécie em seu ambiente natural a mais de 20 anos no Pantanal matogrossense. Estima-se que a população tem

aumentado e se expandido devido aos esforços conservacionistas nessa área (Guedes, 2004). Entretanto, claramente as escalas de tempo da expansão observada pelo Projeto arara-azul e pelos dados genéticos são muito diferentes.

Em termos de conservação, entender a história demográfica e as repostas das espécies às pressões climáticas do passado podem ser úteis para prever a sua susceptibilidade a futuras mudanças, ou seja, se for possível hipotetizar o período de divergência entre grupos genéticos, tempo de expansão ou gargalo populacional de uma espécie e relacionar esses eventos a acontecimentos geológicos e ecológicos, é possível manejar as populações futuras para evitar ou minimizar a diminuição populacional e da diversidade genética. No caso de *A. hycinthinus*, foi possível supor que as oscilações ocorridas no Quaternário podem ter influenciado a distribuição geográfica da espécie e esta se mantém com baixa variabilidade sem sofrer oscilações de tamanho populacionais (demograficamente estável). Se isso estiver correto, possivelmente a espécie (e até mesmo o gênero) possui baixa variabilidade genética há algum tempo. Assim, possivelmente a maior ameaça é a destruição do seu ambiente natural, além de outras ameaças como tráfico ilegal.

Capítulo 3. Análise do parentesco de pares de filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*): investigando monogamia e fidelidade ao ninho

3.1 Introdução

Análises de similaridade genética e de parentesco podem ser úteis em vários tipos de estudos. Por exemplo, programas de reprodução em cativeiro podem utilizar esses dados para evitar pareamentos consanguíneos. Isso é especialmente interessante em populações que não possuem um registro genealógico dos indivíduos (Miyaki *et al.*, 1997; Caparroz *et al.*, 2001b). Além disso, alguns aspectos da biologia de espécies podem ser explorados, como por exemplo, o estudo da fidelidade de casais. Embora 90% de todas as espécies de aves tenham como principal estratégia reprodutiva a monogamia (Lack, 1968, Gowaty e Mock, 1985), estudos com DNA fingerprinting e microssatélites têm identificado altas taxas de paternidade extra-par em muitas espécies de aves que antes eram consideradas monogâmicas (Westneat, 1990; Wetton *et al.*, 1987; Birkhead *et al.*, 1990; Ibaruchi *et al.*, 2000; Griffith *et al.*, 2010).

Baseado em observações de campo, a maior parte das espécies de psitacídeos é considerada estritamente monogâmica, vivendo em casais que possivelmente não se separam por toda a vida. Entretanto, poucos trabalhos genéticos foram feitos neste grupo de aves para testar se também são geneticamente monogâmicos. Entre os grandes psitacídeos, o *DNA fingerprinting* revelou que a similaridade genética entre filhotes das araras *Ara ararauna* e *Ara chloropterus* de mesmo ninho foi maior do que a encontrada entre filhotes de ninhos diferentes (Caparroz *et al.*, 2001a). Isso indica que os filhotes do mesmo ninho podem ser mais aparentados do que filhotes de ninhos diferentes apoiando a hipótese de monogamia genética. No entanto, em um ninho de *A. chloropterus* que era disputado por dois casais, a similaridade genética observada entre filhotes foi menor do que a esperada entre irmãos (Caparroz *et al.*, 2001a). Isso levou os autores a sugerirem que cada filhote era de um casal diferente. Em outro estudo com *Cyanoliseus patagonus* os dados genéticos indicam que a espécie é social e geneticamente monogâmica (Masello *et al.*, 2002).

Outro tema que pode ser explorado é a fidelidade dos casais por determinados ninhos. Isso pode ser testado indiretamente analisando a similaridade genética de filhotes do mesmo ninho mas de estações reprodutivas diferentes (consecutivas e/ou alternadas). Se eles forem mais similares do que filhotes de ninhos diferentes, não se pode descartar a hipótese de que casais voltam a utilizar o mesmo ninho em diferentes estações reprodutivas.

3.2 Materiais e métodos

Foram analisados indivíduos de duas populações de *A. hyacinthinus* coletadas no Pantanal: RPPN SESC Pantanal (Barão do Melgaço, Mato Grosso) denominada Pantanal norte (PN) e regiões

de Miranda e de Nhecolândia (Mato Grosso do Sul) denominadas Pantanal sul (PS). No PN, amostras de 34 filhotes foram coletadas em três estações reprodutivas consecutivas de 2001 a 2003 e no PS foram coletadas amostras de 65 filhotes em 10 estações reprodutivas consecutivas de 1998 a 2007 (Tabela 3.1). Só foi possível coletar amostras de filhotes já que é extremamente difícil realizar a captura de adultos devido a seu tamanho, força e alta mobilidade.

Tabela 3.1 Número de filhotes de *Anodorhynchus hyacinthinus* amostrados por ano e por ninho em cada região do Pantanal (PN – Pantanal norte; PS – Pantanal sul). N – número de identificação do ninho.

PN														
N	04	05	08	14	31	32	33	42	43	60	64	70	76	79
Ano														
2001	1	-	1	1	1	1	2	1	1	1	-	1	2	1
2002	1	1	1	1	-	2	1	-	1	1	-	1	1	1
2003	1	1	-	-	1	-	1	1	-	1	2	-	-	-
PS														
N	62	118	142	180	182	202	205	206	249	259	2061	2088	2141	2151
Ano														
1998	-	-	2	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
1999	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
2000	1	1	1	1	2	1	1	1	-	-	-	1	-	-
2001	1	-	-	2	1	1	1	-	-	-	-	1	2	-
2002	-	2	-	1	-	-	-	1	-	1	1	-	1	2
2003	1	-	-	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	-
2004	-	-	-	1	2	1	-	1	1	1	1	1	1	-
2006	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
2007	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

Todas as amostras estão mantidas em etanol absoluto e armazenadas no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. O DNA de todos os indivíduos foi isolado utilizando proteinase K e fenol-clorofórmio segundo o protocolo de Bruford *et al.* (1992). No mestrado foram analisados seis locos de microssatélites dessas amostras (Presti, 2006), sendo cinco dos *primers* desenvolvidos para *Ara ararauna* (Una CT21, UnaCT32, UnaCT43, UnaCT74, UnaGT55; Tabela 2.2; Caparroz *et al.* 2003) e um desenvolvido para *A. hyacinthinus* (HYA1172; Tabela 2.2; S. Davis, não publicado). No presente trabalho foram analisados mais dois locos, sendo um deles desenvolvido para *Psittacus erithacus* (Peeu11; Tabela 2.2; Taylor e Parkin, 2007a) e outro para *Ara ararauna* (UnaCT41int; Gebhardt e Waits, 2008).

Cada reação continha 12 µl, sendo 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/ µl, Pharmacia), 0,3 µl do *primer reverse* (10 µM), 0,2 µl *primer* M13 fluorescente (10 µM, Boutin-Ganache *et al.*, 2001) e 0,1 µl do *primer forward* (10 µM), 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTPs (4 mM), 1,2 µl de tampão (10x), 20 a 50 ng de DNA e água. As condições da PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10

min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 52-58°C por 40 seg e 72°C por 40 seg, e extensão final de 72°C por 10 min. Aproximadamente 2 µl do produto amplificado foi carregado em gel de agarose 1,5% para avaliar a qualidade e estimar a quantidade do amplificado. Cerca de 1 µl do produto foi carregado no sequenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare) utilizando o marcador de peso molecular GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD (Applied Biosystem). Os tamanhos dos alelos foram calculados com auxílio do programa MegaBACE™ Genetic Profiler Software Suite v2.2 (GE Healthcare). Para tornar esses dados comparáveis aos dados obtidos no mestrado mas em outro tipo de sequenciador (ABI 377; Lifetech), algumas amostras analisadas anteriormente foram genotipadas novamente no MegaBACE 1000. Assim, os mesmos alelos foram analisados nos dois equipamentos. Todas as amostras foram genotipadas pelo menos duas vezes para cada microssatélite.

O grau de variabilidade genética em cada região (PN e PS) foi avaliado através do número de alelos e da heterozigosidade observada e esperada utilizando o programa GENEPOP 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). Dois coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos (r) foram obtidos utilizando os programas Relatedness 4.2 (Queller e Goodnight, 1989) e ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006). Esses dois coeficientes levam em consideração a frequência alélica das populações para sugerir o parentesco entre pares de indivíduos. A estimativa de parentesco de Queller e Goodnight (1989) utiliza em seu cálculo, as frequências dos alelos nos indivíduos comparados e na população excluindo os indivíduos comparados. O índice é obtido pela somatória dos valores de todos os locos. Foram testadas as seguintes relações para os indivíduos do mesmo ninho: irmãos vs. não relacionados ($H_1: r = 0,5$ e $H_0: r = 0,0$), meio-irmãos vs. não relacionados ($H_1: r = 0,25$ e $H_0: r = 0,0$) e meio-irmãos vs. irmãos ($H_1: r = 0,25$ e $H_0: r = 0,5$).

O programa ML-Relate foi utilizado para testar qual relação (irmãos, meio-irmãos e não relacionados) é a mais verossímil para cada par de indivíduos. Esses dois métodos foram escolhidos pois parecem ser os mais precisos quando comparados a outras estimativas (Queller e Goodnight, 1989; Milligan, 2003). Como foi verificada moderada estruturação genética populacional entre PN e PS (Capítulo 2), as amostras de cada uma foram analisadas separadamente evitando que possíveis diferenças nas suas frequências alélicas influenciassem os coeficientes. A média dos índices r e MLr foram obtidas para filhotes de ninhos diferentes e para filhotes do mesmo ninho (mesma estação reprodutiva, em estações reprodutivas consecutivas e alternadas). Foi utilizado o teste estatístico paramétrico T-student e o não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar essas médias. Se as araras são fiéis a seus ninhos esperamos encontrar médias significativamente maiores entre indivíduos do mesmo ninho em comparação a de ninhos diferentes. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL) e Statistica (StatSoft, Inc., 2005).

Também foram analisados os índices encontrados para cada ninho e estabelecidas três categorias. O índice r variou de -0,9926 a 1 e o MLr de 0 a 0,89. Dividindo esses intervalos em três categorias, foram considerados: índices baixo ($r \leq -0,33$ e $MLr \leq 0,25$), intermediário ($-0,33 < r \leq 0,33$ e $0,25 < MLr \leq 0,50$) e alto ($r > 0,33$ e $MLr > 0,50$).

3.3 Resultados

Dos oito microssatélites genotipados, um é monomórfico no PN (UnaCT32) e outro é no PS (UnaCT43), portanto, para as subseqüentes análises, foram utilizados sete locos por população. Os locos analisados apresentam de dois a cinco alelos na região do PN e de dois a sete no PS. As médias das heterozigosidades observada e esperada a partir dos sete locos foram $H_o=0,450$ e $H_e=0,429$ para PN e $H_o=0,557$ $H_e=0,525$ para o PS.

As médias dos valores de similaridade genética entre filhotes do mesmo ninho da mesma estação reprodutiva foram significativamente maiores que os valores observados entre filhotes de ninhos diferentes no PS (T-student $t = -4,66166$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 3498,50$, $p < 0,01$ para r ; T-student $t = -5,93943$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 3359,00$, $p < 0,01$ para MLr). No entanto, isso não foi encontrado para o PN (T-student $t = 0,547866$, $p = 0,58$ e Mann-Whitney $U = 894,00$, $p = 0,57$ para r ; T-student $t = -1,90145$, $p = 0,05778$ e Mann-Whitney $U = 591,00$, $p = 0,11$ para MLr) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Média e desvio padrão dos índices r e MLr entre indivíduos de ninhos diferentes e do mesmo ninho (mesma estação reprodutiva, em estações reprodutivas consecutivas e alternadas). PN – Pantanal norte, PS – Pantanal sul; N – número de pares comparados.

Categorias		r	MLr	N
Filhotes de ninhos diferentes	PN	0,06 ± 0,39	0,17 ± 0,21	534
	PS	0,02 ± 0,33	0,14 ± 0,19	2056
Filhotes do mesmo ninho na mesma estação reprodutiva	PN	0,17 ± 0,52	0,38 ± 0,29	4
	PS	0,46 ± 0,24	0,47 ± 0,18	12
Filhotes do mesmo ninho em estações reprodutivas consecutivas	PN	0,31 ± 0,33	0,36 ± 0,21	17
	PS	0,38 ± 0,30	0,41 ± 0,20	46
Filhotes do mesmo ninho em estações reprodutivas alternadas	PN	0,31 ± 0,37	0,34 ± 0,24	06
	PS	0,38 ± 0,31	0,39 ± 0,26	31

As médias entre filhotes do mesmo ninho em estações reprodutivas consecutivas foram significativamente mais altas ($p < 0,005$) que as médias observadas entre filhotes de ninhos

diferentes (Tabela 3.2) com os seguintes valores estatísticos: PN - T-student $t = -2,57201$, $p < 0,05$ e Mann-Whitney $U = 2842,500$, $p < 0,01$ para o índice r ; T-student $t = -3,59353$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 2445,000$, $p < 0,01$ para o índice MLr ; PS - T-student $t = -7,41901$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 19365,50$, $p < 0,01$ para o r ; T-student $t = -9,26820$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 17569,00$, $p < 0,01$ para MLr . Também foram analisados filhotes do mesmo ninho em estações reprodutivas alternadas e foi verificado que a média do índice r entre filhotes do mesmo ninho foi significativamente maior que a média de ninhos diferentes somente na população do PS (PN: T-student $t = -1,57820$, $p = 0,1151$ e Mann-Whitney $U = 1037,000$, $p = 0,1371$ para o índice r ; T-student $t = -1,95929$, $p = 0,05059$ e Mann-Whitney $U = 976,000$, $p = 0,09954$ para o índice MLr ; PS: T-student $t = -6,05976$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 13635,50$, $p < 0,01$ para o r ; T-student $t = -7,18656$, $p < 0,01$ e Mann-Whitney $U = 13251,00$, $p < 0,01$ para MLr).

As análises de verossimilhança indicaram que dos 16 pares de indivíduos do mesmo ninho (PN e PS) na mesma estação reprodutiva, para dois, ou seja, 12,5% (ninhos 76 e 182) não podemos descartar as possibilidades de serem não-aparentados ou meio-irmãos, e um par do ninho 180 (6,25%) podem ser indivíduos não-aparentados. Todos os outros pares de indivíduos (81,25%) possuem maior probabilidade de serem irmãos, possuindo altos valores de índices de parentesco. Dentre os 63 pares amostrados no mesmo ninho em estações reprodutivas consecutivas, cinco (7,9%) podem ser não-relacionados ou meio-irmãos e dois (3,2%) parecem ser não aparentados. Para as outras combinações (88,9%), a probabilidade de serem irmãos não pode ser descartada. Em estações reprodutivas alternadas foram analisados 37 pares de indivíduos. Entre eles, seis (16,2%) podem ser não-relacionados ou meio-irmãos. Para todos os outros pares (83,8%) a relação de irmãos não é descartada. Não há diferença significativa entre as duas regiões analisadas. Os dados dos índices de parentesco se encontram nos apêndices I e II.

Assumindo que ambos os pais podem ser heterozigotos, suas ninhadas podem ter no máximo quatro alelos diferentes para cada microssatélite. Assim, foi realizada uma análise dos genótipos dos ninhos do mesmo ninho. Apesar de ser possível ocorrer, mutação não foi considerada para explicar a presença de alelos não congruentes com a relação de irmãos. Ou seja, combinações de alelos incompatíveis na mesma estação reprodutiva foram consideradas como resultado de paternidade extra-par ou parasitismo de ninho e, além desses fatores, em estações consecutivas e alternadas como sendo casais diferentes utilizando o mesmo ninho. Mesmo porque não foi possível analisar os genótipos dos pais sociais para identificar qual dos fatores (mutação, infidelidade e parasitismo ou mais de um casal utilizando o mesmo ninho em estações reprodutivas distintas) resultou na combinação de alelos. Em nenhum dos 28 ninhos analisados foram encontrados mais que quatro alelos para cada um dos locos. Em 24 desses ninhos (85,7%) os filhotes apresentam combinações de genótipos compatíveis para irmãos. Entretanto, entre todos os

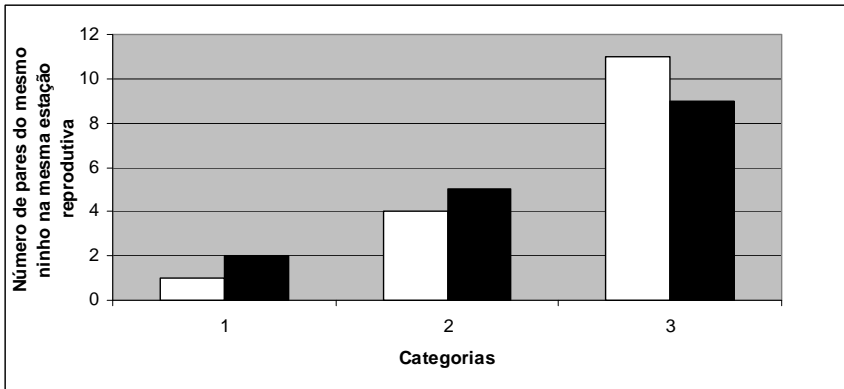
filhotes de um mesmo ninho (considerando mesma estação reprodutiva, estações consecutivas e alternadas), algumas combinações de genótipos indicam que não se tratam de irmãos. Por exemplo, no ninho N182 os seis ninhegos amostrados possuem os genótipos 172/176, 172/174, 172/172, 162/172, 172/172, 172/176 para o microssatélite UnaCT41. Assumindo presença de um indivíduo homocigoto, os pais devem carregar o alelo 172 e, observando os alelos presentes nos filhotes, ainda restam os alelos 176, 174 e 162, portanto algumas combinações poderiam ser no máximo meio-irmãos entre si em relação aos outros filhotes. Dos quatro ninhos com genótipos incompatíveis, o ninho 182 apresenta um par de filhotes da mesma estação reprodutiva e um de estações consecutivas que, através das análises de verossimilhança, somente não podemos descartar as possibilidades de serem não-aparentados ou meio-irmãos e o ninho 205 que apresenta um par de filhotes de estações reprodutivas consecutivas e dois pares de estações alternadas que somente onde não é possível descartar as possibilidades de serem não-aparentados ou meio-irmãos.

Como ninhos com apenas dois indivíduos sempre terão combinações de genótipos compatíveis para a relação de irmãos, ao excluí-los temos o total de 18 ninhos, sendo que em 14 deles (77,8%) a combinação de genótipos é compatível para a relação de irmãos. Alguns exemplos de indivíduos que não podem ser irmãos (*full sibs*) de nenhum dos demais filhotes amostrados no ninho correspondente são:

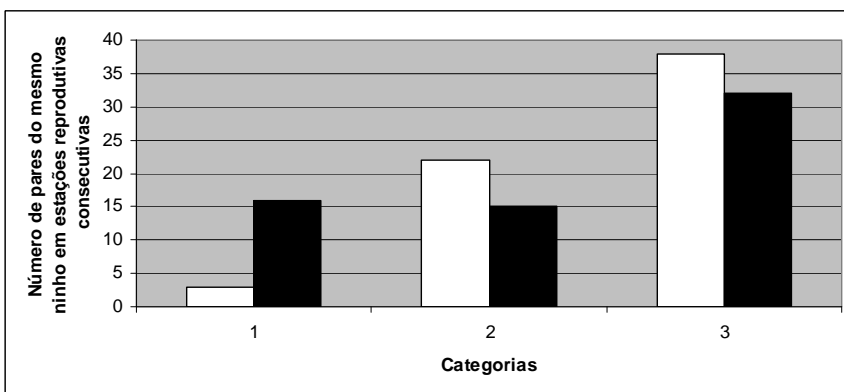
- no ninho 182, o filhote do ano de 2004 não pode ser irmão dos outros cinco indivíduos analisados deste ninho (ver loco UnaCT41, Apêndice I);
- no ninho 202, o filhote amostrado em 1998 não pode ser irmão dos outros quatro indivíduos analisados no mesmo ninho (ver loco UnaCT74 incompatível, Apêndice I);
- no ninho 205, o filhote de 2003 não pode ser irmão dos outros quatro ninhegos (ver loco Peeμ11, Apêndice I).

A maioria dos índices observados para os pares de indivíduos do mesmo ninho são considerados altos (segundo as categorias estabelecidas neste trabalho), com exceção para o índice MLr em estações reprodutivas alternadas (Figura 3.1).

a)



b)



c)

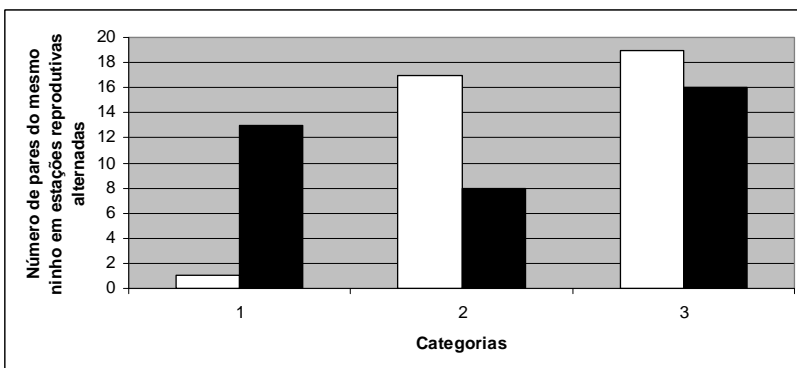


Figura 3.1 Números de pares de indivíduos que apresentam índices baixos (1), médios (2) ou altos (3), no mesmo ninho na mesma estação reprodutiva (a), no mesmo ninho em estações reprodutivas consecutivas (b) e no mesmo ninho em estações alternadas (c). Branco: índice r (Queller e Goodnight, 1989); preto: índice MLr (Kalinowski *et al.*, 2006).

3.4 Discussão

A média dos valores dos índices de parentesco entre filhotes do mesmo ninho na mesma estação reprodutiva no Pantanal sul (PS) foi significativamente maior que a média entre pares de indivíduos de ninhos diferentes. O mesmo resultado não foi observado no Pantanal norte (PN) onde a média dos filhotes de ninhos diferentes não difere estatisticamente da média entre filhotes do mesmo ninho. Esse resultado pode ser devido à baixa amostragem de indivíduos do mesmo ninho na população do PN (somente quatro pares de indivíduos). Além disso, três pares de filhotes encontrados no mesmo ninho na mesma estação reprodutiva no PN não compartilham alelos em um ou dois locos. Isso não descarta a possibilidade de serem irmãos, pois se seus pais forem heterozigotos para alelos diferentes do mesmo loco, é possível ter filhotes que não compartilhem alelos em alguns locos. Com isso, a similaridade entre os filhotes é diminuída.

Assim, os resultados das médias dos coeficientes de parentesco, unidos aos resultados da análise de cada ninho na mesma estação reprodutiva indicam que 81,25 % dos filhotes encontrados no mesmo ninho sejam irmãos de pai e de mãe (*full sibs*), enquanto os filhotes encontrados em ninhos diferentes não apresentam relação de parentesco próximo. Esse resultado é similar ao encontrado para outra espécie de arara, *Ara ararauna* (Caparroz, 2003). Neste estudo utilizando minissatélites e seis microssatélites foi possível comparar pares de filhotes do mesmo ninho e filhotes de ninhos diferentes. Altos valores de similaridade genética entre filhotes do mesmo ninho foram encontrados. A monogamia genética estrita é relativamente rara em aves e ocorre predominantemente em alguns grupos de não passeriformes que exibem vida longa, alternância de gerações e cuidado parental (Griffith *et al.*, 2010). Psitacídeos e rapinantes se enquadram nesse padrão. Masello *et al.* (2002) sugerem que o cuidado parental tem um papel crucial na evolução e na manutenção da monogamia genética no psitacídeo *Cyanoliseus patagonus*. Os resultados da análise de *DNA fingerprinting* obtidos por Masello *et al.* (2002) mostraram que, em uma amostragem de 166 filhotes e pais em dois anos de coleta, não houve nenhum caso de paternidade extra-par. Da mesma maneira, Saladin *et al.* (2007) encontraram um único jovem gerado de cópula extra-par em 137 filhotes na coruja *Strix aluco*. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios com outros rapinantes, nos quais a monogamia genética é uma regra (Roulin *et al.*, 2004). Isto favorece a hipótese de que o alto investimento parental na reprodução pode estar associado a esse comportamento. Possivelmente o alto investimento parental pode levar machos e fêmeas a terem menos tempo para se engajarem em uma eventual cópula extra-par (Roulin *et al.*, 2004). No entanto, o resultado obtido no presente estudo de que os filhotes de *A. hyacinthinus* amostrados no mesmo ninho sejam irmãos (*full sibs*) poderia ser explicado por: 1) os pais são monogâmicos e fiéis (pais sociais e biológicos) ou 2) a mãe foi fertilizada por um único macho que não é o pai social (paternidade extra-par com preferência por um único macho) ou 3) houve parasitismo de ninho

(pais sociais não são os pais biológicos). Como não foi possível analisar geneticamente os pais sociais, essas três possibilidades não podem ser descartadas. No entanto, as duas últimas hipóteses parecem ser menos plausíveis. No período reprodutivo, *A. hyacinthinus* é observada aos pares (Guedes, 1993), o que facilitaria a guarda da fêmea por parte do macho, tornando baixa a frequência de eventos de paternidade extra-par. Além disso, casais de *A. hyacinthinus* apresentam comportamento bastante forte de guarda do ninho (Guedes, 1993), o que tornaria a frequência de parasitismo de ninho bastante baixa.

Baseado no teste do ML-Relate, um par de filhotes amostrado no PN e outro no PS (12,5 % do total de pares de filhotes do mesmo ninho) apresentam como relações mais verossímeis serem meio-irmãos ou não-aparentados. Além disso, os índices de parentesco desses dois pares são considerados baixos. Se eles forem meio-irmãos, pode ter ocorrido paternidade extra-par. Já se eles não forem aparentados, pode ter havido parasitismo de ninho. Ainda, um par do PS (6,25%) dos 16 pares de filhotes de mesmo ninho analisados no presente estudo parece não ser composto de irmãos de pai e de mãe (*full sibs*), indicando que pode ter ocorrido parasitismo de ninho. Em *A. chloropterus* foi observado uma disputa de dois casais por um mesmo ninho e a similaridade genética observada entre filhotes foi menor do que a esperada entre irmãos (Caparroz *et al.*, 2001a). Isso levou os autores a sugerirem que cada filhote poderia ser de um casal diferente, mostrando que a competição por cavidades pode levar um casal a criar o filhote de outro. Esse evento pode ter ocorrido com as araras-azuis, já que é documentada a escassez de cavidades naturais (Guedes, 2003). Por outro lado, em outra espécie de psitacídeo (*Cyanoliseus patagonus*) casos de parasitismo de ninho são raramente observados (aproximadamente 1,2 %; Masello *et al.*, 2002).

Os dados obtidos sugerem a ocorrência de pelo menos 12,5 % de paternidade extra-par. O que não foi encontrado em outras espécies de psitacídeos já analisadas (*Ara ararauna*; Caparroz *et al.*, 2001a e *Cyanoliseus patagonus*, Masello *et al.*, 2002). Essas espécies não são consideradas ameaçadas, mas *A. hyacinthinus* é considerada em perigo e um dos fatores que favorecem essa ameaça é a falta de cavidades para reprodução. Assim, a competição por cavidade poderia favorecer esse comportamento. A porcentagem de paternidade extra-par encontrada no presente trabalho é mais elevada do que no passeriforme *Taeniopygia guttata*, com taxa de paternidade extra-par de somente 1,7% entre 316 filhotes analisados com seis locos de microssatélites (Griffith *et al.*, 2010). No entanto, essas taxas são consideradas baixas quando comparado com valores encontrados para outros passeriformes: 82 % em *Gymnorhina tibicen* (Hughes *et al.*, 2003), 79 % em *Maulurus cyaneus* (Double e Cockburn, 2000) e 49 % em *Acrocephalus sechellensis* (Richardson *et al.*, 2001).

Com os dados de comparações entre filhotes de diferentes estações reprodutivas, é possível levantar algumas especulações sobre o uso recorrente da mesma cavidade por um único casal ou se

vários casais utilizam o mesmo ninho em anos distintos. Embora as araras tenham grande capacidade de dispersão, informações obtidas pelo trabalho de campo sugerem que os casais de *A. hyacinthinus* são sedentários e apresentam alta fidelidade ao sítio de nidificação, voltando para o mesmo ninho para se reproduzirem (Guedes, 1993). Segundo observações em campo, foi possível identificar um casal cujo macho tinha uma marca visível em um dos olhos e, por isso, era facilmente identificado. Assim, foi possível verificar que este casal ocupou o mesmo ninho em anos consecutivos (ninho 8; Paulo T.Z. Antas, comunicação pessoal). Os dados genéticos são parcialmente concordantes com essa observação: o par de filhotes desse ninho apresenta alto índice r (0,475) e índice MLr intermediário (0,46). Os resultados das médias dos filhotes de anos consecutivos e alternados sugerem que alguns casais devem se reproduzir no mesmo ninho em anos consecutivos, enquanto outros não. Por exemplo, filhotes do ninho 33 apresentam altos índices de parentesco na mesma estação reprodutiva e em estações consecutivas, sendo os valores significativamente maiores que a média entre indivíduos de ninhos diferentes. Isto pode indicar que eles são filhotes do mesmo casal. Por outro lado, o par de filhotes de anos consecutivos do ninho 70 tem baixa probabilidade de serem irmãos. Da mesma maneira, no ninho 142 existem três pares de filhotes com baixos índices ou seja, com pouca probabilidade de serem irmãos. Ainda, os filhotes do ninho 205 têm um par com baixa probabilidade de serem irmãos e dois pares com altos índices de similaridade e, portanto, altas probabilidades de serem irmãos.

Embora existam evidências de que alguns casais se reproduzem anualmente, outros parecem se reproduzir a cada dois anos, pois após o vôo, o filhote de *A. hyacinthinus* pode permanecer com seus pais por mais de um ano, aprendendo a comer e se defender (Guedes e Harper, 1995). A média dos índices r e MLr entre filhotes do mesmo ninho em estações reprodutivas alternadas (Tabela 3.2) foi significativamente maior que a média entre indivíduos de diferentes ninhos e não difere significativamente da média entre os pares de indivíduos de pares do mesmo ninho em estações reprodutivas consecutivas para o PS. Para região do PN, a comparação entre filhotes do mesmo ninho em estações reprodutivas alternadas não difere estatisticamente de filhotes de ninhos diferentes. Entretanto, do total de 37 pares de indivíduos analisados, 27 (73%) apresentam altas probabilidades de serem irmãos. Ainda, desses 27 pares, os filhotes do ninho 142 apresentam baixa similaridade em anos consecutivos e altos índices de similaridade em anos alternados. Entre os outros pares, os filhotes de 24 dos ninhos apresentam índices de similaridade mais altos entre anos alternados do que entre anos consecutivos.

Dentre todos os ninhos amostrados, o 180 merece destaque, pois tem sido ativo com um ou dois filhotes por sete anos seguidos (de 1998 a 2004). Todos os pares de filhotes apresentam altas probabilidades de serem irmãos (mesmo ano, anos alternados e anos consecutivos), sugerindo que o mesmo casal pode ter usado o mesmo ninho em todos os anos. Ou seja, não há evidências de que

outro casal está usando este ninho. Em geral, os dados obtidos em campo e os dados genéticos obtidos no presente trabalho sugerem que muitos dos casais analisados se reproduzem anualmente. Essa capacidade pode estar relacionada à maturidade do casal. Os casais mais experientes teriam maior capacidade de se reproduzirem anualmente do que casais menos experientes. Mais dados de campo são necessários para testar essa hipótese.

Embora os resultados sejam interessantes, só foi possível utilizar sete locos de microssatélites. Como é sugerido na literatura, seria adequado ter um número maior de locos para aumentar a eficiência na determinação das relações de parentesco e para diminuir a variância dos índices. De acordo com Blouin *et al.* (1996), para o camundongo *Mus musculus* seria necessário o uso de 20 microssatélites para discriminar todos os indivíduos não-relacionados de irmãos, 80% dos indivíduos meio-irmãos de irmãos inteiros e 80% dos indivíduos meio-irmãos de indivíduos não-relacionados. Resultados similares foram obtidos por Alderson *et al.* (1999) para a ave *Molothrus ater*. Quando o número de locos usados nas análises iniciais foi dobrado (de sete para 14), foi verificado que o intervalo de confiança diminuiu consideravelmente. Portanto, o aumento do número de locos analisados de *A. hyacinthinus* poderia tornar os resultados mais robustos.

Finalmente, será essencial cruzar os dados obtidos no presente trabalho com os dados obtidos por observações em campo para cada ninho, enriquecendo ainda mais a discussão e possivelmente atingindo resultados mais conclusivos.

APENDICE I

Apêndice I. Genótipo e relação de parentesco de filhotes em cada ninho amostrado na mesma estação reprodutiva, em estações reprodutivas consecutivas e alternadas. PN- Pantanal norte; PS- Pantanal; número do ninho; QGr – índice de similaridade baseado em Queller e Goodnight (1989); MLr – índice baseado em Kalinowski *et al.* (2006); LT Kinship - significância dos testes das seguintes relações baseados no QGr: meio-irmãos vs. não relacionados ($H_1: 0.25$ e $H_0: 0.0$), irmãos (*full sibs*) vs. não relacionados ($H_1: 0.5$ e $H_0: 0.0$) e meio-irmãos vs. irmãos inteiros ($H_1: 0.25$ e $H_0: 0.5$); HLR ML - relação mais verossímil baseado no MLr; U - não aparentados; HS - meio-irmãos; FS - irmãos (*full sibs*); PO - pais-filhos SR ML - relações que não podem ser descartadas .

Região	N	Ano/ Filhote	Locos								QGr	MLr	LT kinship			HLR ML	SR ML
			UnaCT21	UnaCT32	UnaCT43	UnaGT55	UnaCT74	HYA	UnaCT41	Peep11			$H_1:0.25$ $H_0:0.0$	$H_1:0.5$ $H_0:0.0$	$H_1:0.25$ $H_0:0.5$		
Mesma estação reprodutiva																	
PN	32	2002F1 2002F2	261/263 263/271	-	224/248 224/224	202/202 202/222	268/276 268/276	172/172 172/172	172/176 172/172	365/369 365/369	0.0244	0.52	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	33	2001F1 2001F2	261/271 261/261	-	224/224 224/224	222/222 222/222	266/276 276/276	172/172 172/172	162/172 172/176	369/369 365/369	0.4714	0.31	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	64	2003F1 2003F2	261/263 263/271	-	224/224 224/224	202/202 202/202	276/276 276/276	172/172 172/174	172/172 172/172	361/369 361/369	0.6735	0.67	N.S.	N.S.	N.S.	FS	FS
	76	2001F1 2001F2	261/263 261/271	-	224/224 224/224	202/222 202/202	266/276 270/276	172/174 172/172	172/174 172/176	363/369 369/369	-0.5038	0	N.S.	N.S.	**	U	U. HS
PS	118	2002F1 2002F2	261/261 261/261	279/283 279/279	-	202/222 202/222	266/276 266/276	172/174 174/174	162/172 162/162	365/365 361/365	0.6101	0.5	*	*	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	142	1998F1 1998F2	261/263 261/271	283/283 283/283	-	222/222 222/222	266/266 266/276	172/172 172/172	172/176 172/176	361/365 361/365	0.7414	0.67	*	*	N.S.	FS	HS. FS. PO
	180	2001F1 2001F2	271/271 261/263	279/283 283/283	-	222/226 202/202	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 172/176	365/365 365/365	0.2917	0.41	N.S.	N.S.	N.S.	U	U
	180	2003F1 2003F2	263/271 271/271	283/283 279/283	-	222/226 222/226	276/276 266/276	172/174 174/174	162/174 162/174	365/365 361/365	0.4509	0.55	***	***	N.S.	PO	HS. FS. PO
	182	2000F1 2000F2	261/271 261/271	279/283 283/283	-	222/222 222/222	266/276 266/276	172/172 172/172	172/176 172/174	365/365 365/365	0.7456	0.72	*	*	N.S.	FS	HS. FS. PO
	182	2004F1 2004F2	261/263 261/263	283/283 279/283	-	222/226 222/222	266/266 276/276	172/172 172/174	172/172 162/172	357/361 361/365	-0.1355	0	N.S.	N.S.	*	U	U. HS
	259	2003F1 2003F2	261/261 261/261	283/283 279/283	-	202/222 202/222	266/266 266/276	172/172 172/172	172/176 176/176	361/365 361/365	0.5557	0.54	N.S.	*	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2061	2003F1 2003F2	261/271 261/261	279/283 283/283	-	202/222 222/222	276/276 276/276	174/174 174/174	176/176 172/176	361/365 365/365	0.4778	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2088	2003F1 2003F2	261/271 261/271	279/279 279/283	-	222/226 222/222	268/276 276/286	172/172 172/172	172/176 172/174	361/365 361/365	0.4757	0.34	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	2141	2001F1 2001F2	261/261 261/263	279/283 279/283	-	202/202 202/202	276/276 276/276	172/172 172/174	162/176 172/176	357/361 357/361	0.5924	0.44	**	**	N.S.	FS	HS. FS. PO
	2141	2003F1 2003F2	261/263 261/261	279/283 279/279	-	202/226 202/226	276/276 276/276	172/172 172/174	172/176 172/172	361/365 361/365	0.4694	0.53	*	*	N.S.	PO	HS. FS. PO
	2151	2002F1 2002F2	261/263 261/261	283/283 283/283	-	202/226 222/226	266/270 276/276	172/174 174/174	162/172 162/172	361/375 361/375	0.2609	0.45	N.S.	N.S.	N.S.	FS	HS. FS

Estações reprodutivas consecutivas																	
PN	4	2001F1 2002F1	261/263 261/271	- -	224/224 224/224	202/202 222/222	276/276 276/276	176/176 172/172	172/172 172/172	361/369 361/363	0.0909	0	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS
	4	2002F1 2003F1	261/271 261/261	- -	224/224 224/224	222/222 222/222	276/276 276/276	172/172 172/172	172/172 172/172	361/363 361/369	0.8556	0.51	N.S.	*	N.S.	PO	HS. FS. PO
	5	2002F1 2003F1	261/261 261/261	- -	224/224 224/224	222/222 202/222	266/270 276/276	172/174 172/174	172/172 172/176	361/369 361/369	0.1561	0.39	N.S.	N.S.	N.S.	FS	U. HS. FS
	8	2001F1 2002F1	263/263 263/263	- -	224/224 224/224	202/202 202/222	266/276 276/276	172/174 172/172	172/172 172/172	369/369 365/369	0.5620	0.5	*	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	14	2001F1 2002F1	271/271 285/289	- -	224/224 224/224	202/222 202/202	268/276 276/276	172/172 172/174	172/172 172/174	365/369 369/369	-0.2017	0	N.S.	N.S.	**	U	U. HS
	32	2001F1 2002F1	263/263 261/263	- -	224/224 224/248	202/222 202/202	270/276 268/276	172/172 172/172	172/172 172/176	365/369 365/369	0.0338	0.21	N.S.	N.S.	*	HS	U. HS. FS. PO
	32	2001F1 2002F2	263/263 263/271	- -	224/224 224/224	202/222 202/222	270/276 268/276	172/172 172/172	172/172 172/172	365/369 365/369	0.5855	0.58	N.S.	N.S.	N.S.	FS	U. HS. FS. PO
	33	2001F1 2002F1	261/271 261/261	- -	224/224 224/224	222/222 202/222	266/276 266/266	172/172 172/172	162/172 162/172	369/369 365/369	0.4894	0.5	*	*	N.S.	PO	HS. FS. PO
	33	2001F2 2002F1	261/261 261/261	- -	224/224 224/224	222/222 202/222	276/276 266/266	172/172 172/172	172/176 162/172	365/369 365/369	0.1608	0.34	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS
	33	2002F1 2003F1	261/261 261/261	- -	224/224 224/224	202/222 202/222	266/266 266/276	172/172 172/172	162/172 172/176	365/369 365/369	0.6522	0.65	*	*	N.S.	FS	HS. FS. PO
	43	2001F1 2002F1	263/263 263/271	- -	224/224 224/248	202/222 202/222	276/276 276/276	172/174 172/172	172/172 172/172	365/369 363/369	0.4059	0.27	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	60	2001F1 2002F1	261/271 261/263	- -	224/224 224/224	222/222 222/222	266/276 266/276	172/172 172/174	172/176 172/172	361/369 361/365	0.3220	0.33	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	60	2002F1 2003F1	261/263 263/263	- -	224/224 224/224	222/222 222/222	266/276 276/276	172/174 172/174	172/172 172/176	361/365 361/361	0.4783	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	HS. FS. PO
	70	2001F1 2002F1	285/289 263/271	- -	220/222 224/224	202/202 202/202	268/272 276/276	172/172 172/174	178/178 172/172	351/351 361/369	-0.4444	0	N.S.	N.S.	***	U	U
	76	2001F1 2002F1	261/263 261/263	- -	224/224 224/224	202/222 202/222	266/276 270/276	172/174 172/172	172/174 172/174	363/369 361/369	0.1667	0.38	*	*	N.S.	FS	U. HS. FS. PO
	76	2001F2 2002F1	261/271 261/263	- -	224/224 224/224	202/202 202/222	270/276 270/276	172/172 172/172	172/176 172/174	369/369 361/369	0.2053	0.36	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	79	2001F1 2002F1	261/261 261/263	- -	224/224 224/224	202/222 202/202	276/276 276/276	172/172 172/172	172/172 172/172	369/369 369/369	0.6735	0.6	N.S.	N.S.	N.S.	PO	HS. FS. PO
PS	62	2000F1 2001F1	261/271 261/271	283/283 283/283	- -	202/202 202/202	266/276 266/276	172/172 174/174	172/172 172/172	361/365 365/365	0.5239	0.62	**	**	N.S.	FS	FS
	142	1998F1 1999F1	261/263 261/271	283/283 283/283	- -	222/222 202/226	266/266 266/276	172/172 174/174	172/176 172/176	361/365 361/365	-0.1211	0.13	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS
	142	1998F2 1999F1	261/271 261/271	283/283 283/283	- -	222/222 202/226	266/276 266/276	172/172 174/174	172/176 172/176	361/365 361/365	-0.0819	0.57	N.S.	N.S.	N.S.	U	U
	142	1999F1 2000F1	261/271 261/271	283/283 279/283	- -	202/226 222/222	266/276 266/276	174/174 172/174	172/176 172/176	361/365 369/369	-0.2547	0.21	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS
	180	1998F1 1999F1	263/271 271/271	283/283 283/283	- -	222/226 222/226	266/274 266/276	172/174 174/174	162/174 162/174	365/365 361/365	0.6475	0.6	***	***	N.S.	FS	FS. PO

180	1999F1 2000F1	271/271 261/263	283/283 283/283	- -	222/226 202/222	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 162/174	361/365 361/365	0.5522	0.62	***	***	N.S.	FS	FS
180	2000F1 2001F1	261/263 271/271	283/283 279/283	- -	202/222 222/226	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 162/174	361/365 365/365	0.4924	0.46	***	**	N.S.	FS	FS
180	2000F1 2001F2	261/263 261/263	283/283 283/283	- -	202/222 202/202	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 172/176	361/365 365/365	0.5392	0.43	*	*	N.S.	PO	U. HS. FS
180	2001F1 2002F1	271/271 261/271	279/283 283/283	- -	222/226 202/222	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 162/172	365/365 361/365	0.5775	0.5	**	*	N.S.	PO	HS. FS. PO
180	2001F2 2002F1	261/263 261/271	283/283 283/283	- -	202/202 202/222	266/276 266/276	174/174 174/174	172/176 162/172	365/365 361/365	0.5180	0.37	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
180	2002F1 2003F1	261/271 263/271	283/283 283/283	- -	202/222 222/226	266/276 276/276	174/174 172/174	162/172 162/174	361/365 365/365	0.2059	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
180	2002F1 2003F2	261/271 271/271	283/283 279/283	- -	202/222 222/226	266/276 266/276	174/174 174/174	162/172 162/174	361/365 361/365	0.5012	0.52	**	*	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
180	2003F1 2004F1	263/271 261/271	283/283 283/283	- -	222/226 202/226	276/276 266/276	172/174 172/174	162/174 162/174	365/365 365/365	0.5684	0.56	***	***	N.S.	PO	HS. FS. PO
180	2003F2 2004F1	271/271 261/271	279/283 283/283	- -	222/226 202/226	266/276 266/276	174/174 172/174	162/174 162/174	361/365 365/365	0.5890	0.6	***	***	N.S.	U	FS. PO
182	2000F1 2001F1	261/271 261/263	279/283 283/283	- -	222/222 202/222	266/276 266/266	172/172 172/172	172/176 172/172	365/365 357/361	0.0640	0	N.S.	N.S.	*	U	U. HS
182	2000F2 2001F1	261/271 261/263	283/283 283/283	- -	222/222 202/222	266/276 266/266	172/172 172/172	172/174 172/172	365/365 357/361	0.2600	0.12	N.S.	N.S.	*	PO	U. HS. FS
182	2003F1 2004F1	261/261 261/263	283/283 283/283	- -	202/222 222/226	266/276 266/266	172/172 172/172	172/176 172/172	361/361 357/361	0.4562	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS. PO
182	2003F1 2004F2	261/261 261/263	283/283 279/283	- -	202/222 222/222	266/276 276/276	172/172 172/174	172/176 162/172	361/361 361/365	-0.0763	0	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. PO
202	2000F1 2001F1	261/261 259/261	279/283 279/283	- -	222/222 202/222	266/276 266/268	172/172 172/172	172/176 174/176	365/365 365/365	0.4872	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
202	2003F1 2004F1	261/261 261/261	279/283 283/283	- -	218/222 202/222	266/276 266/266	172/172 172/172	172/176 172/176	365/365 365/365	0.7157	0.56	*	*	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
205	1998F1 1999F1	261/263 261/261	279/279 283/283	- -	202/222 202/222	268/276 266/276	172/174 172/172	174/176 174/176	365/365 357/361	-0.3493	0.15	N.S.	N.S.	*	U	U. HS
205	1999F1 2000F1	261/261 261/261	283/283 283/283	- -	202/222 202/202	266/276 266/276	172/172 172/172	174/176 162/174	357/361 365/365	0.4432	0.38	**	*	N.S.	HS	U. HS. FS
205	2000F1 2001F1	261/261 261/261	283/283 283/283	- -	202/202 202/222	266/276 276/276	172/172 172/172	162/174 174/176	365/365 365/365	0.7026	0.5	**	**	N.S.	PO	HS. FS. PO
206	1999F1 2000F1	263/271 261/263	283/283 279/283	- -	222/222 202/202	276/276 276/276	174/174 174/174	174/176 162/176	361/361 361/361	0.3949	0.33	*	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS
206	2002F1 2003F1	261/261 261/261	283/283 279/283	- -	202/222 202/222	268/276 276/276	172/172 172/172	162/176 162/176	361/361 361/365	0.5862	0.6	*	*	N.S.	FS	U. HS. FS. PO
206	2003F1 2004F1	261/261 261/263	279/283 279/283	- -	202/222 202/222	276/276 268/276	172/172 172/172	162/176 162/176	361/365 361/365	0.6076	0.55	*	*	N.S.	FS	HS. FS. PO
249	2003F1 2004F1	261/271 261/263	283/283 283/283	- -	222/222 222/222	276/276 276/276	174/174 174/174	162/172 172/176	361/361 365/365	0.4412	0.43	N.S.	N.S.	N.S.	FS	U. HS. FS

	259	2002F1 2003F1	261/261 261/261	283/283 283/283	- -	220/222 202/222	268/276 266/266	172/172 172/172	176/176 172/176	365/365 361/365	0.5950	0.5	*	*	N.S.	PO	HS. FS. PO
	259	2002F1 2003F2	261/261 261/261	283/283 279/283	- -	220/222 202/222	268/276 266/276	172/172 172/172	176/176 176/176	365/365 361/365	0.5851	0.21	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	259	2003F1 2004F1	261/261 261/261	283/283 283/283	- -	202/222 222/222	266/266 266/276	172/172 172/172	172/176 172/176	361/365 365/365	0.6261	0.54	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	259	2003F2 2004F1	261/261 261/261	279/283 283/283	- -	202/222 222/222	266/276 266/276	172/172 172/172	176/176 172/176	361/365 365/365	0.4883	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2061	2002F1 2003F1	261/271 261/271	283/283 279/283	- -	202/222 202/222	268/276 276/276	174/174 174/174	172/176 176/176	365/365 361/365	0.4928	0.53	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2061	2002F1 2003F2	261/271 261/261	283/283 283/283	- -	202/222 222/222	268/276 276/276	174/174 174/174	172/176 172/176	365/365 365/365	0.6906	0.62	*	*	N.S.	FS	HS. FS. PO
	2061	2003F1 2004F1	261/271 261/261	279/283 279/279	- -	202/222 222/222	276/276 268/276	174/174 174/174	176/176 172/176	361/365 361/365	0.4608	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2061	2003F2 2004F1	261/261 261/261	283/283 279/279	- -	222/222 222/222	276/276 268/276	174/174 174/174	172/176 172/176	365/365 361/365	0.4586	0.45	N.S.	N.S.	N.S.	FS	HS. FS
	2088	2000F1 2001F1	261/271 261/261	283/283 279/283	- -	222/222 222/222	266/266 276/276	172/172 172/172	172/176 174/176	361/365 361/365	0.1830	0.15	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS
	2088	2003F1 2004F1	261/271 261/271	279/279 279/283	- -	222/226 222/222	268/276 276/276	172/172 172/172	172/176 174/176	361/365 365/365	0.3637	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2088	2003F2 2004F1	261/271 261/271	279/283 279/283	- -	222/222 222/222	276/286 276/276	172/172 172/172	172/174 174/176	361/365 365/365	0.7304	0.58	**	**	N.S.	PO	HS. FS. PO
	2141	2001F1 2002F1	261/261 261/263	279/283 279/283	- -	202/202 202/226	276/276 266/276	172/172 174/174	162/176 172/176	357/361 365/365	-0.3456	0	N.S.	N.S.	**	U	U. HS
	2141	2001F2 2002F1	261/263 261/263	279/283 279/283	- -	202/202 202/226	276/276 266/276	172/174 174/174	172/176 172/176	357/361 365/365	0.1077	0.25	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS
	2141	2002F1 2003F1	261/263 261/263	279/283 279/283	- -	202/226 202/226	266/276 276/276	174/174 172/172	172/176 172/176	365/365 361/365	0.0562	0.45	*	*	N.S.	FS	FS
	2141	2002F1 2003F2	261/263 261/261	279/283 279/279	- -	202/226 202/226	266/276 276/276	174/174 172/174	172/176 172/172	365/365 361/365	0.3118	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2141	2003F1 2004F1	261/263 261/271	279/283 279/283	- -	202/226 202/202	276/276 276/276	172/172 172/174	172/176 162/176	361/365 357/361	0.1391	0	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS. PO
	2141	2003F2 2004F1	261/261 261/271	279/279 279/283	- -	202/226 202/202	276/276 276/276	172/174 172/174	172/172 162/176	361/365 357/361	0.1432	0	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS
	206	2006F1 2007F2	261/263 261/263	279/279 279/279	- -	202/222 202/202	276/276 270/276	172/172 172/172	162/172 172/176	365/365 365/365	0.7171	0.62	**	***	N.S.	PO	HS. FS. PO

Estações reprodutivas alternadas

PN	4	2001F1 2003F1	261/263 261/261	- -	224/224 224/224	202/202 222/222	276/276 276/276	176/176 172/172	172/172 172/172	361/369 361/369	0.2157	0.26	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS
	31	2001F1 2003F1	261/271 261/271	- -	224/224 224/224	222/222 222/222	276/276 276/276	172/172 172/172	162/172 172/172	361/363 365/369	0.8238	0.47	N.S.	*	N.S.	FS	U. HS. FS
	33	2001F1 2003F1	261/271 261/261	- -	224/224 224/224	222/222 202/222	266/276 266/276	172/172 172/172	162/172 172/176	369/369 365/369	0.2982	0.4	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	33	2001F2 2003F1	261/261 261/261	- -	224/224 224/224	222/222 202/222	276/276 266/276	172/172 172/172	172/176 172/176	365/369 365/369	0.6396	0.71	*	*	N.S.	FS	HS. FS. PO

	42	2001F1 2003F1	261/263 261/271	- -	224/224 224/224	202/222 202/202	266/276 270/276	174/174 172/172	172/172 172/172	365/369 361/363	-0.2174	0	N.S.	N.S.	**	U	U. HS
	60	2001F1 2003F1	261/271 263/263	- -	224/224 224/224	222/222 222/222	266/276 276/276	172/172 172/174	172/176 172/176	361/369 361/361	0.1111	0.22	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS
PS	62	2001F1 2003F1	261/271 261/271	283/283 279/279	- -	202/202 202/222	266/276 266/276	174/174 172/172	172/172 176/176	365/365 361/365	-0.3636	0	N.S.	N.S.	**	U	U. HS
	118	2000F1 2002F1	259/261 261/261	279/283 279/283	- -	202/222 202/222	266/276 266/276	174/174 172/174	162/172 162/172	361/365 365/365	0.7119	0.76	**	**	N.S.	FS	FS
	118	2000F1 2002F2	259/261 261/261	279/283 279/279	- -	202/222 202/222	266/276 266/276	174/174 174/174	162/172 162/162	361/365 361/365	0.5495	0.52	*	*	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	142	1998F1 2000F1	261/263 261/271	283/283 279/283	- -	222/222 222/222	266/266 266/276	172/172 172/174	172/176 172/176	361/365 369/369	0.0838	0.08	N.S.	N.S.	*	U	U. HS. FS
	142	1998F2 2000F1	261/271 261/271	283/283 279/283	- -	222/222 222/222	266/276 266/276	172/172 172/174	172/176 172/176	361/365 369/369	0.1779	0.42	*	*	N.S.	FS	U. HS. FS
	180	1998F1 2000F1	263/271 261/263	283/283 283/283	- -	222/226 202/222	266/274 266/276	172/174 174/174	162/174 162/174	365/365 361/365	0.4534	0.52	**	**	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	180	1999F1 2001F1	271/271 271/271	283/283 279/283	- -	222/226 222/226	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 162/174	361/365 365/365	0.9134	0.89	***	***	N.S.	FS	FS
	180	1999F1 2001F2	271/271 261/263	283/283 283/283	- -	222/226 202/202	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 172/176	361/365 365/365	0.1328	0.23	N.S.	N.S.	*	U	U. HS
	180	2000F1 2002F1	261/263 261/271	283/283 283/283	- -	202/222 202/222	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 162/172	361/365 361/365	0.7082	0.59	*	**	N.S.	FS	HS. FS. PO
	180	2001F1 2003F1	271/271 263/271	279/283 283/283	- -	222/226 222/226	266/276 276/276	174/174 172/174	162/174 162/174	365/365 365/365	0.7157	0.67	***	***	N.S.	FS	FS. PO
	180	2001F1 2003F2	271/271 271/271	279/283 279/283	- -	222/226 222/226	266/276 266/276	174/174 174/174	162/174 162/174	365/365 361/365	0.8185	0.8	***	***		FS	FS
	180	2001F2 2003F1	261/263 263/271	283/283 283/283	- -	202/202 222/226	266/276 276/276	174/174 172/174	172/176 162/174	365/365 365/365	0.1475	0.06	N.S.	N.S.	*	U	U. HS. FS
	180	2001F2 2003F2	261/263 271/271	283/283 279/283	- -	202/202 222/226	266/276 266/276	174/174 174/174	172/176 162/174	365/365 361/365	-0.0154	0.11	N.S.	N.S.	**	U	U. HS
	180	2002F1 2004F1	261/271 261/271	283/283 283/283	- -	202/222 202/226	266/276 266/276	174/174 174/174	162/172 162/174	361/365 365/365	0.6333	0.62	**	**	N.S.	FS	HS. FS. PO
	182	2001F1 2003F1	261/263 261/261	283/283 283/283	- -	202/222 202/222	266/266 266/276	172/172 172/172	172/172 172/176	357/361 361/361	0.5535	0.5	*	*	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	202	1998F1 2000F1	261/261 261/261	279/283 279/283	- -	202/202 222/222	276/288 266/276	172/172 172/172	172/176 172/176	361/365 365/365	0.2801	0.32	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS
	202	2001F1 2003F1	259/261 261/261	279/283 279/283	- -	202/222 218/222	266/268 266/276	172/172 172/172	174/176 172/176	365/365 365/365	0.5206	0.15	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	205	1998F1 2000F1	261/263 261/261	279/279 283/283	- -	202/222 202/202	268/276 266/276	172/174 172/172	174/176 162/174	365/365 365/365	0.0545	0.06	N.S.	N.S.	*	U	U. HS
	205	1999F1 2001F1	261/261 261/261	283/283 283/283	- -	202/222 202/222	266/276 276/276	172/172 172/172	174/176 174/176	357/361 365/365	0.4988	0.58	**	**	N.S.	FS	FS
	205	2001F1 2003F1	261/261 263/271	283/283 283/283	- -	202/222 222/226	276/276 276/276	172/172 172/172	174/176 172/176	365/365 361/361	0.0034	0.05	N.S.	N.S.	**	U	U. HS

	206	2000F1 2002F1	261/263 261/261	279/283 283/283	- -	202/202 202/222	276/276 268/276	174/174 172/172	162/176 162/176	361/361 361/361	0.1731	0.16	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS
	206	2002F1 2004F1	261/261 261/263	283/283 279/283	- -	202/222 202/222	268/276 268/276	172/172 172/172	162/176 162/176	361/361 361/365	0.5302	0.64	**	**	N.S.	FS	HS. FS. PO
	259	2002F1 2004F1	261/261 261/261	283/283 283/283	- -	220/222 222/222	268/276 266/276	172/172 172/172	176/176 172/176	365/365 365/365	0.7939	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2061	2002F1 2004F1	261/271 261/261	283/283 279/279	- -	202/222 222/222	268/276 268/276	174/174 174/174	172/176 172/176	365/365 361/365	0.2550	0.41	*	N.S.	N.S.	FS	U. HS. FS
	2088	2001F1 2003F1	261/261 261/271	279/283 279/279	- -	222/222 222/226	276/276 268/276	172/172 172/172	174/176 172/176	361/365 361/365	0.3316	0.45	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2088	2001F1 2003F2	261/261 261/271	279/283 279/283	- -	222/222 222/222	276/276 276/286	172/172 172/172	174/176 172/174	361/365 361/365	0.7159	0.56	**	**	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2141	2001F1 2003F1	261/261 261/263	279/283 279/283	- -	202/202 202/226	276/276 276/276	172/172 172/172	162/176 172/176	357/361 361/365	0.4281	0.35	N.S.	N.S.	N.S.	HS	U. HS. FS. PO
	2141	2001F1 2003F2	261/261 261/261	279/283 279/279	- -	202/202 202/226	276/276 276/276	172/172 172/174	162/176 172/172	357/361 361/365	0.2518	0.05	N.S.	N.S.	N.S.	U	U. HS. FS
	2141	2001F2 2003F1	261/263 261/263	279/283 279/283	- -	202/202 202/226	276/276 276/276	172/174 172/172	172/176 172/176	357/361 361/365	0.4588	0.61	N.S.	*	N.S.	FS	U. HS. FS. PO
	2141	2001F2 2003F2	261/263 261/261	279/283 279/279	- -	202/202 202/226	276/276 276/276	172/174 172/174	172/176 172/172	357/361 361/365	0.3675	0.5	N.S.	N.S.	N.S.	PO	U. HS. FS. PO
	2141	2002F1 2004F1	261/263 261/271	279/283 279/283	- -	202/226 202/202	266/276 276/276	174/174 172/174	172/176 162/176	365/365 357/361	-0.1447	0	N.S.	N.S.	**	U	U. HS

* p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; N.S – não significativo

APENDICE II

Apêndice II. Tabela com ninhos cujos filhotes não apresentam maior probabilidade de serem irmãos (*full sibs*). QGr – índice de similaridade baseado em Queller e Goodnight (1989); MLr – índice baseado em Kalinowski *et al.* (2006); LT Kinship - significância dos testes das seguintes relações baseados no QGr: meio-irmãos vs. não relacionados ($H_1: 0.25$ e $H_0: 0.0$), irmãos (*full sibs*) vs. não relacionados ($H_1: 0.5$ e $H_0: 0.0$) e meio-irmãos vs. irmãos inteiros ($H_1: 0.25$ e $H_0: 0.5$); N.S. não significante; HLR ML - relação mais verossímil baseado no MLr; U - não aparentados; HS - meio-irmãos; SR ML - relações que não podem ser descartadas. Genótipos – análise de compatibilidade de genótipos assumindo que pais podem ser heterozigotos: OK – podem ser irmãos (*full sibs*), * - não podem ser irmãos (*full sibs*). PN- Pantanal norte; PS – Pantanal sul.

Mesma estação reprodutiva				LT kinship			ML Relate		Genótipos
Local	Ninho	QGr	MLr	$H_1:0.25$ $H_0:0.0$	$H_1:0.5$ $H_0:0.0$	$H_1:0.25$ $H_0:0.5$	HLR ML	SR ML	
PN	76	-0,5038	0	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK
PS	180	0,2917	0,41	N.S.	N.S.	N.S.	U	U	OK
PS	182	-0,1355	0	N.S.	N.S.	*	U	U, HS	*
Estações reprodutivas consecutivas									
PN	4	0,0909	0	N.S.	N.S.	N.S.	U	U, HS	OK
PN	14	-0,2017	0	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK
PN	70	-0,4444	0	N.S.	N.S.	***	U	U	OK
PS	142	-0,0819	0,57	N.S.	N.S.	N.S.	U	U	OK
PS	182	0,0640	0	N.S.	N.S.	*	U	U, HS	*
PS	205	-0,3493	0,15	N.S.	N.S.	*	U	U, HS	*
PS	2141	-0,3456	0	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK
Estações reprodutivas alternadas									
PN	42	-0,2174	0	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK
PS	62	-0,3636	0	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK
PS	180	0,1328	0,23	N.S.	N.S.	*	U	U, HS	OK
PS	180	-0,0154	0,11	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK
PS	205	0,0545	0,06	N.S.	N.S.	*	U	U, HS	*
PS	205	0,0034	0,05	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	*
PS	2141	-0,1447	0	N.S.	N.S.	**	U	U, HS	OK

Capítulo 4. Teste de sexagem com amostras de penas em *Anodorhynchus hyacinthinus*

4.1 Introdução

A identificação do sexo de aves é muito importante em muitos estudos, como por exemplo, no manejo de populações ameaçadas e cativas. Essa informação é essencial para o estabelecimento de programas de reprodução em cativeiro (Miyaki *et al.*, 1992; Russello e Amato, 2001), detecção de viés na razão sexual (Heinsohn *et al.*, 1997), em estudos comportamentais (Eberhard, 1998), entre outros. A técnica de sexagem molecular de aves (Griffiths *et al.* 1998; Fridolfsson e Ellegren 1999) vem sendo aplicada rotineiramente, principalmente em grupos como os psitacídeos que não apresentam dimorfismo sexual. Esse teste utiliza a diferença de comprimento de um íntron do gene CHD-1 que se localiza nos cromossomos Z e W de 300-400 pb e 400–700 pb, respectivamente (Griffiths *et al.* 1998; Fridolfsson e Ellegren 1999).

Apesar de utilizar a PCR, essa técnica de sexagem apresenta baixa eficiência de amplificação a partir de amostras de DNA de peles de museu quando comparada à amplificação de fragmentos de DNA mitocondrial e de microssatélites (Glenn *et al.* 1999; Lee e Griffiths 2003; Sefc *et al.* 2003; Bantock *et al.*, 2007). O mesmo ocorre com penas de muda (Meyer, comunicação pessoal). Bantock *et al.* (2007) desenvolveram um *primer* mais interno para amplificar o CHD-1 (M5) que reduz o comprimento do fragmento amplificado para 200 a 250 pb em patos. Isso corresponde a uma redução de 130 pb em comparação com os *primers* inicialmente descritos por Griffiths *et al.* (1998).

No presente estudo padronizamos a metodologia de sexagem para amostras de penas de *Anodorhynchus hyacinthinus* com objetivo de melhorar a eficiência da técnica com amostras de DNA de baixa qualidade.

4.2 Materiais e métodos

Foram analisadas penas de coberteiras com canhão novo, ou seja, penas arrancadas frescas de 14 indivíduos e penas coletadas no solo próximos a 11 ninhos de *Anodorhynchus hyacinthinus* monitorados pela equipe do Dr. Paulo Antas na RPPN do Sesc Pantanal no município de Barão do Melgaço-MT.

O DNA das penas de coberteiras foi extraído individualmente utilizando o protocolo padrão de digestão com proteinase K seguida de purificação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) segundo descrito por Bruford *et al.* (1992). Na extração de DNA de penas coletadas embaixo do ninho foi utilizado o kit *DNeasy Tissue Kit* (QIAGEN), descrito a seguir com modificações. Para penas com cálamo maior ou igual a 2 cm de comprimento, cortou-se longitudinalmente o cálamo e toda a parte interna foi raspada, descartando-se a externa. Em penas com o cálamo menor, toda a base foi cortada em pedaços pequenos. Para a digestão, o raspado ou

os fragmentos foram colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml e adicionou-se 180 µl de tampão ATL (do kit), 30 µl de DDT (diclorodifeniltricloreto; 0,1g/ml) e 20 µl de proteinase K (5 U/µl), e incubados a 56 °C até o tecido estar completamente digerido (aproximadamente 6 horas). Os tubos de 1,5 ml foram centrifugados para que as gotas da tampa fossem para o fundo do tubo e então foram adicionados 200 µl de tampão AL (do kit), misturados por 15 segundos e depois incubados a 70 °C por 10 minutos. Novamente os tubos foram centrifugados e foram adicionados 200 µl de etanol absoluto em cada amostra, misturados por 15 segundos e incubados durante a noite a -20°C. Cuidadosamente, colocou-se essa mistura no *QIAmp Spin column* sem molhar o filtro e centrifugou-se a 8000 rpm durante um minuto, o filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada em um novo tubo coletor. Foram adicionados 500 µL de tampão AW2 (do kit) e centrifugou-se a 14000 rpm por 3 minutos. Colocou-se a coluna em um novo tubo de 1,5 ml, descartou-se o filtrado e foi adicionado 100 µl de tampão AE (do kit), incubou-se a 70 °C durante 10 minutos e depois centrifugou-se a 8000 rpm durante uma hora. Este último passo foi repetido, porém com a adição de 50 µl de tampão AE.

As reações de amplificação foram inicialmente realizadas com os *primers* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Griffiths *et al.*, 1998) em volume final de 10 µl, sendo 4,7 µl de água MilliQ, 1,0 µl de tampão (10X), 1,0 µl de dNTPs (2 mM), 0,2 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl, Pharmacia), 1 µl do *primer* P2 (10µM) e 1 µl do *primer* P8 (10µM) e 1 µl de DNA (20-50 ng). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, hibridação a 43 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg, por fim, extensão a 72 °C por 7 min. As amostras que não puderam ter o sexo identificado com essa técnica foram utilizadas em nova reação de amplificação com as mesmas quantidades de reagentes, somente substituindo o *primer* P2 pelo M5 (5'-YTYMCTTCAYTTCCATTAAAGC-3'; Bantock *et al.* 2007). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 8 min, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, hibridação a 54 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg, por fim, extensão a 72 °C por 2 min. Os produtos foram separados em gel de agarose 3% e todas as reações foram acompanhadas de controle positivo, ou seja, uma amostra de fêmea anteriormente sexada.

4.3 Resultados e Discussão

Das 14 penas de coberteiras, foi possível sexar 12 (86%) com os *primers* P2 e P8 (Griffiths *et al.*, 1998), enquanto nenhuma (0%) pena coletada embaixo do ninho resultou em produto utilizando a mesma metodologia. As amostras de DNA das duas coberteiras e das penas coletadas no solo que não produziam produtos foram utilizadas em reações com os *primers* M5 e P8 (Bantock *et al.*,

2007). Na primeira tentativa foi possível sexar as duas penas de coberteiras restantes (100%) e três das 11 penas coletadas no chão (Figura 4.1). Na segunda tentativa, três das oito amostras restantes foram amplificadas, totalizando seis das 11 amostras com sexo identificado (56%). Os fragmentos encontrados tinham entre 250 e 300 pb (Figura 4.1).

Como esperado, esses resultados indicam que a metodologia de Bantock *et al.* (2007) é mais eficiente quando utilizada em estudos com DNA de baixa qualidade devido ao menor fragmento resultante da amplificação com os *primers* M5 e P8 e, portanto, poderá ter muita utilidade em estudos de genética da conservação e manejo de populações, entre outros (Bunce *et al.*, 2003; Huynen *et al.*, 2003).

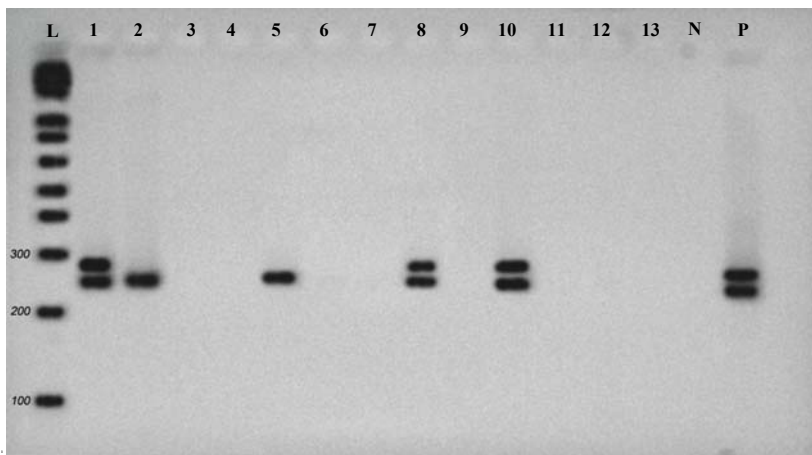


Figura 4.1 Gel de agarose 3% com produtos obtidos com os *primers* M5 e P8. L: *ladder 1 kb Plus*; 1 e 2: penas da coberteira; 3-13: penas caídas no chão; N: controle negativo; P: controle positivo.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos pela análise de microssatélites e de DNA mitocondrial em *Anodorhynchus hyacinthinus* nos permitem concluir que:

- Há baixa variabilidade encontrada nos microssatélites e no DNA mitocondrial de *A. hyacinthinus* quando comparado com outras espécies de psitacídeos;
- Os *primers* de microssatélites utilizados foram informativos na análise de estrutura genética populacional;
- A região controladora do DNA mitocondrial se mostrou mais variável, mas foram encontrados picos duplos. Assim, foram sequenciadas partes dos genes ND5, citocromo b e ND2, regiões estas, que apresentavam polimorfismo. Não foi encontrado nenhum sítio polimórfico nas seqüências de COI, ND3 e ATPase 6 e 8;
- Há moderada diferenciação genética populacional em *A. hyacinthinus*. Os índices R_{ST} e a análise Bayesiana indicam quatro principais grupos: do Pantanal Norte, do Pantanal Sul, do Norte e do Nordeste. No entanto, os índices de F_{ST} e a rede de haplótipos indicam diferenciação somente entre três regiões, com norte e nordeste sem diferenciação;
- O isolamento das araras das regiões N e NE pode ter ocorrido recentemente e não houve tempo suficiente para essas populações se diferenciarem e por isso, testes supostamente mais sensíveis, como a análise Bayesiana, seriam capazes de detectar estruturação, enquanto outros, como o F_{ST} , por exemplo, não teriam essa capacidade;
- A maior estruturação genética evidenciada pelo DNA mitocondrial em comparação com os microssatélites pode ser explicada pela existência de dispersão diferencial dos sexos ou essa diferença ser devido ao DNAm que possui herança matrilinear e haplóide, então o tamanho populacional efetivo é aproximadamente um quarto do DNA nuclear, resultando no aumento da taxa de deriva genética e rápida aproximação do equilíbrio entre deriva e migração em populações. Além disso, os microssatélites podem conter homoplasias e estas podem subestimar os valores de diferenciação populacional;
- Foi possível atribuir a maioria dos indivíduos de *A. hyacinthinus* à sua respectiva população de origem, assim, esse tipo de análise pode auxiliar a identificar a origem de aves apreendidas;
- A data de divergência entre os grupos genéticos de *A. hyacinthinus* foi estimada entre 16 mil e 42 mil anos atrás, o que corresponde ao final do Pleistoceno. Isso sugere que as mudanças climáticas deste período podem ter influenciado a distribuição atual da espécie;

- Como os resultados de simulação apontam para uma população estável ao longo do tempo, é possível que a baixa variabilidade seja uma característica da espécie ou que a expansão tenha ocorrido em tempo recente;
- O fato de o gênero *Anodorhynchus* incluir duas espécies ameaçadas (*Anodorhynchus hyacinthinus* e *A. leari*) e uma extinta (*A. glaucus*) pode indicar que as espécies desse gênero parecem ser muito sensíveis às variações ambientais ocorridas durante a história evolutiva do continente;
- Os dados de similaridade genética entre filhotes de *A. hyacinthinus* corroboram dados de campo que sugerem uma predominância do comportamento monogâmico estrito, mas que há uma inesperada alta frequência de paternidade extra-par e parasitismo de ninho e que há casais que se reproduzem no mesmo ninho anualmente enquanto outros o fazem em anos alternados;
- A metodologia de sexagem proposta por Bantock *et al.* (2007) é mais eficiente quando utilizada em estudos com DNA de baixa qualidade, no nosso caso, DNA extraído de penas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderson G.W., Gibbs H.L., Sealy S.G. 1999. Parentage and kinship studies in an obligate brood parasitic bird, the Brown-Headed Cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellite DNA markers. *Journal of Heredity* 90: 182-190.
- Alvarenga, H. 2007. *Anodorhynchus glaucus* e *A. leari* (Psittaciformes, Psittacidae): osteologia, registro fósseis e antiga distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Ornitologia* 15: 427-432.
- Antas, P.T.Z., Carrara, L.A., Yabe, R.S. Ubaid, F.K., Oliveira-Júnior, S.B., Ferreira, L.P. No prelo. A Arara-azul *Anodorhynchus hyacinthinus* na Reserva Particular do Patrimônio Natural SESC-Pantanal. *Série Conhecendo o Pantanal* 4.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge.
- Baloux, F., Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Bantock, T.M., Prys-Jones, R.T.P., Lee, P.L.M. 2007. New and improved molecular sexing for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resource* 8: 519-528.
- Bates, J.M. 2002. The genetic effect of forest fragmentation on five species of Amazonian birds. *Journal of Avian Biology* 33: 276-294.
- Bech, N., Boissier, J., Drovetski, S., Novoa, C. 2009. Population genetic structure of rock ptarmigan in the “sky islands” of French Pyrenees: implications for conservation. *Animal Conservation* 12: 138-146.
- Behling, H., Lichte, M. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research* 48: 348-358.
- Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology* 177: 19-27.
- Beiguelman, B. 2002. *Curso Prático de Bioestatística*. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.
- Berlin, S., Tomaras, D., Charlesworth, B. 2007. Low mitochondrial variability in birds may indicate Hill-Robertson effects on the W chromosome. *Heredity* 99: 389-396.
- Bierregaard, R.O. Jr., Lovejoy, T.E. 1989. Effects of forest fragmentation on Amazonian understory bird communities. *Acta Amazonica* 19: 215-241.
- Birdlife International. 2000. *Threatened Birds of the World*, 1st ed. Lynx Edicions and Birdlife International, Barcelona.

- Birdlife International. 2010. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. 09 junho 2010.
- Birky, C.W.Jr., Maruyama, T., Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103: 513–527.
- Birkhead, T.R., Burke, T., Zann, R., Hunter, F.M., Krupa, A.P. 1990. Extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches (*Taeniopygia guttata*), revealed by DNA fingerprinting. *Behaviors Ecology and Sociobiology* 27: 315-324.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V., Lotz S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
- Bos, D.H., Gopurenko, D., Williams, R.N., DeWoody, J.A. 2008. Inferring population history and demography using microsatellite, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution* 62: 1458-1468.
- Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., Descepper, C.F. 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques* 31:1-3.
- Bouzat, J.L. 2001. The population genetic structure of the greater rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biological Conservation* 99: 277-284.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates. Time and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18: 225-239.
- Browne, R.A., Collins, E., Anderson, D.J. 2008. Genetic structure of Galapagos population of the yellow warbler. *The Condor* 110: 549-553.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel C.A.R. (Ed.). *Molecular Genetic Analyses of Populations: a Practical Approach*. Oxford University Press, New York. Pp: 225 – 269.
- Bruford, M. W., Cheesman, D.J., Coote, T., Green, H.A.A., Haines, S.A., O’Ryan, C., Williams, T.R. 1996. Microsatellite and their application to conservation genetics. In: Smith, T.B., Wayne, R.K (Eds.). *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York. Pp: 278 - 297.
- Bunce, M., Worthy, T.H., Ford, T. 2003. Extreme reversed sexual dimorphism in the extinct New Zealand moa *Dinornis*. *Nature* 425: 172-175.
- Burland, T.M., Barratt, E.M., Nichols, R.A., Racey, P.A. 2001. Mating patterns, relatedness and the basis of natal philopatry in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*. *Molecular Ecology* 10: 1309-1321.

- Caizergues, A., Ratti, O., Helle, P., Rotelli, L., Ellison, L., Rasplus, J. 2003. Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix* L.) in fragmented vs. continuous landscapes. *Molecular Ecology* 12: 2297-2305.
- Caparroz, R., Guedes, N.M., Bianchi, C.A., Wajntal, A. 2001a. Analysis of the genetic variability and breeding behaviour of wild populations of two macaw species (Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. *Ararajuba - Revista Brasileira de Ornitologia* 9: 43-49.
- Caparroz, R., Miyaki, C.Y., Bampi, M.I., Wajntal, A. 2001b. Analysis of the genetic variability in a sample of the remaining group of Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. *Biological Conservation* 99: 307-311.
- Caparroz, R. 2003. *Filogeografia, Estrutura e Variabilidade Genética de Arara-canindé (Arara ararauna, Psittaciformes: Aves) no Brasil Baseadas na Análise de DNA Mitochondrial e de DNA Nuclear*. Tese de Doutorado, University of São Paulo, São Paulo.
- Caparroz, R., Miyaki, C.Y., Baker, A.J. 2003. Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes* 10: 1046-1048.
- Caparroz, R., Miyaki, C., Baker, A.J. 2009a. Contrasting phylogeographic patterns in mitochondrial DNA and microsatellite: evidence of female philopatry and male-biased gene flow among regional populations of the blue-and-yellow macaw (Psittaciformes: *Ara ararauna*) in Brazil. *The Auk* 126: 359-370.
- Caparroz, R., Seixas, G.H.F., Berkunsky, I., Callevatti, R.G. 2009b. The role of demography and climatic events in shaping the phylogeography of *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Aves) and definition of management units for conservation. *Diversity and Distribution* 15: 459-468.
- Cheng, S., Higuchi R., Stoneking, M. 1994. Complete mitochondrial genome amplification. *Nature Genetics* 7: 350-351.
- Chesser, R. T. 1999. Molecular phylogenetics of the rhinocryptid genus *Pteroptochos*. *Condor* 101: 439-445.
- Clarke, A.L., Saether, B-E., Roskaft, E. 1997. Sex biases in avian dispersal: a reappraisal. *Oikos* 79: 429-438.
- Collar, N.J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliot, A.E., Sargatal, J. (eds.). *Handbook of the Birds of the World*, vol.4, Lynx Edicions, Barcelona, Pp: 280-477.
- Cornuet, J.M., Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Crick, H.Q.P. 2004. The impact of climate change on birds. *Ibis* 146: 48-56.
- Crochet, P.A. 1996. Can measures of gene flow help to evaluate bird dispersal? *Acta Oecologica* 17: 459-474.

- Crochet, P.A. 2000. Genetic structure of avian populations- allozymes revisited. *Molecular Ecology* 9: 1463-1469.
- Dallas, J.F. 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* 3: 452-456.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slakin, M., Frelmer, N.B. 1994. Mutation processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 3166-3170.
- Double, M., Cockburn, A. 2000. Pre-dawn infidelity: females control extra-pair mating in superb fairy wrens. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 267: 465-470.
- Eberhard, J. R. 1998. Breeding biology of the Monk Parakeet. *Wilson Bulletin* 110: 463-473.
- Eberhard, J.R., Wright, T.F., Bermingham, E. 2001. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology Evolution* 18: 1330-1342.
- Eberhard, J.R., Bermingham, E. 2004. Phylogeny and biogeography of *Amazona ocrocephala* - (Aves: Psittacidae) complex. *Auk* 121: 318-332.
- Ellegren, H. 1991. Typing of museum birds. *Nature* 354: 113.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11:1591-1604.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564- 567.
- Faria, P.J., Miyaki, C.Y. 2006. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). *Genetics and Molecular Biology* 29: 231-240.
- Faria, P.J., Guedes, N.M.R., Yamashita, C., Martuscelli, P., Miyaki, C.Y. 2007. Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 17: 765-779.
- Fleischer, R. C., Mcintosh, C. E. 2001. Molecular systematics and biogeography of the Hawaiian avifauna. *Studies Avian Biology* 22: 51-60.
- Forshaw, J.M. 1989. *The Parrots of the World*, 3 ed., Lansdowne Press, Willoughby.
- Francisco, M.R., Gibbs, H.L., Galetti, M., Lunardi, V.O., Galetti Júnior, P.M. 2007. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 16: 4908-4918.

- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fridolfsson, A.K., Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.
- Friesen, V., Gonzalez, J., Cruz-Delgado, F. 2006. Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Conservation Genetics*: 7: 105-115.
- Fu, X.Y. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Galbusera, P., Githiru, M., Lens, L., Matthysen, E. 2004. Genetic equilibrium despite habitat fragmentation in an Afrotropical bird. *Molecular Ecology* 13: 1409-1421.
- Gebhardt, K.J., Waits, L.P. 2008. Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six neotropical parrots. *Molecular Ecology Resources* 4: 835-839.
- Glenn, T.C., Stephan, W., Braun, M.J. 1999. Effects of a population bottleneck on whooping crane mitochondrial DNA variation. *Conservation Biology* 13: 1097-1107.
- Goodman, S.J. 1997. Rstcalc: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Molecular Ecology* 6: 881-885.
- Gowaty, P.A., Mock, D.W. 1985. Multiple parentage and apparent monogamy in birds. *Ornithological Monographs* 37:11-17
- Greenwood, P.J. 1980. Mating system, philopatry, and dispersal among birds and mammals. *Animal Behaviour* 28: 1140-1162.
- Griffith, S.C., Holleley, C.E., Mariette, M.M., Pryke, S.R., Svedin, N. 2010. Low level of extrapair parentage in wild zebra finches. *Animal Behaviour* 79: 261-264.
- Griffiths, R., Double, M., Orr, K.C.Y., Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Griffiths, A.J.F. 2002. Extranuclear genes. In: Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbard, W.M. (eds.). *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company, New York. Pp: 623-646.
- Guedes, N.M.R. 1993. *Biologia Reprodutiva da Arara Azul (Anodorhynchus hyacinthinus) no Pantanal-MS, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Guedes, N.M.R. 2004. Management and conservation of the large macaws in the wild. *Ornitologia Neotropical* 15: 279-283.
- Guedes, N.M.R., Bianchi, C., Barros, Y. 2008. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: Machado, A.B.M., G.M. Drummond & A.P. Paglia (eds.) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. 2 vol. MMA – Ministério de Meio Ambiente. Brasília, DF.

- Guedes, N.M.R., Harper, L.H. 1995. Hyacinth macaws in the Pantanal. In: Abramson, J.; Speer, B.L.; Thomsen, J.B. (eds.). *The Large Macaws. Their Care, Breeding and Conservation*. Raintree Publications, Fort Bragg. Pp: 394-421.
- Haffer, J. 1967. Some allopatric species pairs of birds in northwestern Colombia. *The Auk* 84: 343 - 365.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity Conservation* 6: 451-476.
- Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D.B., Schlotterer, C. (eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford. Pp: 1-9.
- Harris, S.A., Fairbridge, R.W. 1967. Ice-age meteorology. In: Fairbridge, R.W. (ed.). *Encyclopedia of atmospheric science and astrogeology*. Reinhold Publication. Pp: 454-461.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hefti-Gautschi, B., Pfunder, M., Jenni, L., Keller, V., Ellegren H. 2009. Identification of conservation units in the European *Mergus merganser* based on nuclear and mitochondrial DNA markers. *Conservation Genetics* 10: 87-99.
- Heinsohn, R., Legge, S., Barry, S. 1997. Extreme sex bias in sex allocation in *Ecletus* parrots. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 1325-1329.
- Hickey, A.J.R. 2008. An alternate explanation for low mtDNA diversity in birds an age-old solution? *Heredity* 100: 443.
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A., Lorente M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America . *Geology* 23: 234-240.
- Hughes, C.R.; Meland, R.R.; Beissinger, S.R. 1998. Polymorphic trinucleotide microsatellite loci for neotropical parrot, the green-rumped parrotlet, *Forpus passerinus*. *Molecular Ecology* 7: 1247-1248.
- Hughes, J.M., Mather, P.B., Toon, A., Ma, J., Rowley, I., Russell, E. 2003. High levels of extra-group paternity in a population of Australian magpies *Gymnorhina tibicen*: evidence from microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 3441-3450.
- Huynen, L., Millar, C.D., Scofield, R.P., Lambert, D.M. 2003. Nuclear DNA sequences detect species limits in ancient moa. *Nature* 425: 175-178.
- Ibarguchi, G., Birt, T.P., Warheit, K.I., Boag, P.T., Friesen, V.L. 2000. Microsatellite loci from common and thick-billed murre, *Uria aalge* and *U. lomvia*. *Molecular Ecology* 9: 638-639.
- Juniper, A.T., Parr, M. 1998. *Parrots: A Guide to the Parrots of the World*. Pica Press, Sussex.

- Kahindo, C., Bowie, R.C.K., Bates, J.M. 2007. The relevance data on genetic diversity for the conservation of Afro-montane regions. *Biological Conservation* 134: 262-270.
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P., Taper, M.L. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6: 576-579.
- Karr, J.R. 1982. Avian extinction on Barro Colorado Island, Panama: a reassessment. *American Naturalist* 119: 220-239.
- Kearns, A.M., Joseph, L., Edwards, S.V., Double, M.C. 2008. Inferring the phylogeography and evolutionary history of the splendid fairy-wren *Malurus splendens* from mitochondrial DNA and spectrophotometry. *Journal of Avian Biology* 40: 7-17.
- Keeney, D.B., Heupel, M.R., Hueter, R.E., Heist, E.J. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 14: 1911-1923.
- Kimura, M., Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kingman, J.F.C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13: 235-248.
- Kirchman, J.J., Whittingham, L.A., Sheldon, F.H. 2000. Relationships among cave swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparisons of microsatellite and cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 107-121.
- Klein, B.C. 1989. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central Amazonia. *Ecology* 70: 1715-1725.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 6796-6200.
- Kornegay, J.R., Kocher, T.D., Williams, L.A., Wilson, A.C. 1993. Pathways of lysozyme evolution inferred from the sequences of cytochrome b in birds. *Journal of Molecular Evolution* 37: 367-379.
- Kusukawa, N., Uemori, T., Asada, K., Kato, I. 1990. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9: 66-72.
- Kyle, C.J., Strobeck, C. 2001. Genetic structure of North American wolverine (*Gulo gulo*) populations. *Molecular Ecology* 10: 337-347.
- Lack, D. 1968. *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. Methuen, London.
- Laval, G., Excoffier, L. 2004. Simcoal 2.0: a program to simulate genomic diversity over large recombining regions in a subdivided population with a complex history. *Bioinformatics* 20: 2485-2487.

- Lawrence, H.A., Taylor, G.A., Millar, C.D., Lambert, D.M. 2008. High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the Chatham Island Taiko (*Pterodroma magentae*). *Conservation Genetics* 9: 1293-1301.
- Leberg, P.L. 1991. Influence of fragmentation and bottlenecks on genetic-divergence of wild turkey populations. *Conservation Biology* 5: 522-530.
- Lee, P.L.M., Griffiths, R. 2003. Sexing errors among museum skins of a sexually monomorphic bird, the Moorhen *Gallinula chloropus*. *Ibis* 145: 695-698.
- Lee, P.L., Bradbury, R.B., Wilson, J.D., Flanagan, N.S., Richardson, L., Perkins, A.J., Krebs, J.R. 2001. Microsatellite variation in the yellowhammer *Emberiza citrinella*: population structure of a declining farmland bird. *Molecular Ecology* 10: 1633-1644.
- Leite, K.C.E., Seixas, G.H.F., Berkunsky, I., Collevatti, R.G., Caparroz, R. 2008. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. *Genetics and Molecular Research* 7: 819-829.
- Lerner, H.R.L., Johnson, J.A., Lindsay, A.R., Kiff, L.F., Mindell, D.V. 2009. It's not too late for the Harpy Eagle (*Harpia harpyja*): high levels of genetic diversity and differentiation can fuel conservation programs. *PLoS ONE* 4: e7336.
- Lopes I.F., Miño, C.I., Del Lama, S.N. 2007. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. *Brazilian Journal of Biology* 67: 849-857.
- Lovejoy, N.R., Bermingham, E., Martin, A.P. 1998. Marine incursions into South America. *Nature* 396: 421-422.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M., Sherman, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89: 238-247.
- Masello, J.F., Sramkova, A., Quillfeldt, P., Epplen, J.T. 2002. Genetic monogamy in burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus*? *Journal of Avian Biology* 33: 99-103.
- Milligan, B.G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163: 1153-1167.
- Miyaki, C.Y., Hanotte, O., Wajntal, A., Burke, T. 1992. Sex typing of *Aratinga* parrots using human minisatellite probe 33.15. *Nucleic Acids Research* 20: 5235-5236.
- Miyaki, C.Y., Pereira, S.L., Biasia, I., Wajntal, A. 1997. DNA fingerprinting applied to parrot captive breeding program. *Ararajuba. Revista Brasileira de Ornitologia* 5: 127-133.
- Miyaki, C. Y. 2001. Genética e evolução aplicadas à conservação. In: Albuquerque, J.L.B. *Ornitologia e Conservação: da Ciência às Estratégias*. Editora Unisul, Tubarão. Pp: 239-246.
- Moritz, C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.

- Mundy, N.I., Winchell, C.S., Woodruff, D.S. 2003. Genetic differences between the endangered San Clemente Island loggerhead shrike *Lanius ludovicianus mearnsi* and two neighbouring subspecies demonstrated by mtDNA control region and cytochrome *b* sequence variation. *Molecular Ecology* 6: 29-37.
- Munn, C.J., Thomsen, J.A., Yamashita, C. 1989. The Hyacinth Macaw. In: Chadler, W.J (ed.). *Audubon Wildlife Report*. Academic Press, New York. Pp: 404-419.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York, USA.
- Nielsen, R. 2001. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity* 86: 641-647.
- Nielsen, R., Wakeley, J. W. 2001. Distinguishing migration from isolation: an MCMC approach. *Genetics* 158: 885-896.
- Nodari, F. 2008. *Filogenia do Gênero Paroaria (Aves: Passeriformes: Oscines) e Filogeografia de Paroaria dominicana*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Noriko, A., Yasushi, K., Jun, S., Eiji, M., Yukio, M., Tomoaki, Y., Deuk-Hee, J., Syuiti, A. 2008. Genetic variation and population structure of hair crab (*Erimacrus isenbeckii*) in Japan inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine Biotechnology* 10: 39-48.
- Ohta, T., Kimura, M. 1973. The model of mutation appropriate to calculate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. *Genetic Resource* 22: 201-204.
- Oliveira, K.G. e Barbosa, A.E.A. 2010. Relatório Parcial do Monitoramento Populacional de Araras-Azuis-de-Lear, *Anodorhynchus leari* (Bonaparte, 1856) (Aves: Psittacidae) na Natureza. Relatório técnico CEMAVE/ICMBio.
- Oliveira-Marques, A.R. 2006. *Filogenia Molecular das Espécies do Gênero Ara (Psittaciformes, Aves)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C., Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Pearce, J.M., Talbot, S.L., Pierson, B.J., Petersen, M.R., Scribner, K.T., Dickson, P.L., Mosbech, A. 2004 Lack of genetic structure among nesting and wintering king eiders. *The Condor* 106: 229-240.

- Pennington, R. T., Lavin, M., Prado, D. E., Pendry, C. A., Pell, S. K. 2005. Climate change and speciation in neotropical seasonally dry forest plants. *In: Malhi, Y.; Phillips, O. (Eds.) Tropical Forests & Global Atmospheric Change*. Oxford University Press, Oxford. Pp. 199-214.
- Piertney, S.B., MacColl, A.D.C., Bacon, P.J., Dallas, J.F. 1998. Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 7: 1645-1654.
- Pillay, K., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Perrin, M.R., Burke, T., Taylor, T.D. 2010. Twenty-two polymorphic microsatellite loci aimed at detecting illegal trade in the Cape parrot, *Poicephalus robustus* (Psittacidae, Aves). *Molecular Ecology Resources* 10: 142- 149.
- Pinho, J.B., Nogueira, F.M.B. 2003. Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) reproduction in the northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Ornitologia Neotropical* 14: 29-38.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.J. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity* 90: 502- 503.
- Polzin, T., Daneschmand, S. V. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31: 12-20.
- Poulakakis, N., Antoniou, A., Montziou, G., Parmakelis, A., Skartsi, T., Vasilakis, D., Elorriaga, J., De La Puente, J., Gavashelishvili, A., Ghasabyan, M., Kartner, T., McGrady, M., Batbayar, N., Fuller, M., Natsagdorj, T. 2008. Population structure, diversity and phylogeography in the near-threatened Eurasian black vulture *Aegypius monachus* (Falconiformes; Acciptridae) in Europe: insights from microsatellite and mitochondrial DNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 859-872.
- Primack, R.B., Rodrigues, E. 2002. *Biologia da Conservação*. Londrina, E. Rodrigues. 83 pp.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U., Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36: 348-360.
- Prichard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 170-181.
- Presti, F.T. 2006. *Caracterização da Variabilidade Genética em Espécies de Psitacídeos Ameaçados*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Presti, F.T., Oliveira-Marques, A.R, Silva, G.F., Miyaki, C.Y., Guedes, N.M. 2009. Notas sobre alguns aspectos da biologia da arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (Psittaciformes: Psittacidae) na região do Carajás, Pará. *Atualidades Ornitológicas* 151: 4 – 7.
- Queller, D.C., Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.

- Raisin, C., Dawson, D.A., Greenwood, A.G., Jones, C.G., Groombridge, J.J. 2009. Characterization of Mauritius parakeet (*Psittacula eques*) microsatellite loci and their cross-utility in other parrots (Psittacidae, Aves). *Molecular Ecology Notes* 9: 1231-1235.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- Rappole, J.H., King, D.I., Diez, J. 2003. Winter vs. breeding habitat limitation for an endangered avian migrant. *Ecological Application* 13: 735-742.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Ribas, C.C. 2004. *Filogenias Moleculares e Biogeografia Histórica em Psitacídeos (Aves: Psittacidae): Padrões e Processos de Diversificação no Neotrópico*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ribas, C.C., Tavares, E.S., Yoshihara, C., Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeny and biogeography of yellow-headed and blue-fronted parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the South American taxa. *Ibis* 149: 564-574.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Richardson, D.S., Jury, F.L., Blaakmeer, K., Komdier, J., Burke, T. 2001. Parentage assignment and extra-group paternity in a cooperative breeder: the Seychelles warbler *Acrocephalus sechellensis*. *Molecular Ecology* 10: 2263-2274.
- Rivers, N.M., Roger, K.B., Altringham, J.D. 2005. Genetic population structure of Natterer's bat explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology* 14: 4299-4312.
- Rogers, A. R.; Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Roulin, A., Muller, W., Sasvári, L., Dijkstra, C., Ducrest, A., Riols, C., Wink, M., Lubjuhn, T. 2004. Extra-pair paternity, testes size and testosterone level in relation to colour polymorphism in the barn owl *Tyto alba*. *Journal of Avian Biology* 35: 492-500.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rowley, H. 1997. Family Cacatuidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliot, A.E., Sargatal, J. (eds.). *Handbook of the Birds of the World*. Lynx Edicions, Barcelona. Pp: 280-477.
- Russello, M.A., Calcagnotto, D., DeSalle, R., Amato, G. 2001. Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes* 1: 13-15.
- Russello, M.A., Amato, G. 2001. Application of a non-invasive, PCR-based test for sex identification in an endangered parrot, *Amazona guildingii*. *ZooBiology* 20: 41-45.

- Russello, M.A., Saranathan, V., Buhrman-Deever, S., Eberhard, J., Caccone, A. 2007. Characterization of polymorphic microsatellite loci for the invasive monk parakeet (*Myiopsitta manachus*). *Molecular Ecology Notes* 7: 990-992.
- Russello, M.A., Avery, M.L., Wright, T.F. 2008. Genetic evidence links invasive monk parakeet population in the United States to the international pet trade. *BMC Evolutionary Biology* 8: 217.
- Ryder, O.A. 1986. Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 9-10.
- Saladin, V., Ritschard, M., Roulin, A., Bize, P., Richner, H. 2007. Analysis of genetic parentage in the tawny owl (*Strix aluco*) reveals extra-pair paternity is low. *Journal of Ornithology* 148: 113-116.
- Sant'Anna Neto, J.L., Nery, J.T. 2005. Variabilidade e mudanças climáticas no Brasil e seus impactos. In: Souza, G.R.G., Suguio, K., Oliveira, M.A.S., Oliveira, P.L. (eds.). *Quaternário do Brasil*. Holos Editora, Ribeirão Preto, 28-50p.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. *Arlequin, version 2.0: A Software for Population Genetics Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sefc, K.M., Payne, R.B., Sorenson, M.D. 2003. Microsatellite amplification from museum feather samples: effect of fragment size and template concentration on genotyping errors. *The Auk* 120: 982-989.
- Shields, G. F., Wilson, A. C. 1987. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *Journal of Molecular Evolution* 24: 212-217.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- Silva, J.S.V., Abdon, M.M. 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33: 1703-1711.
- Skole, D., Tucker, C. 1993. Tropical deforestation and habitat fragmentation in the Amazon: satellite data from 1978-1988. *Science* 260: 1905-1910.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Slatkin, M., Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Sherwin, W.B., Timms, P., Wilcken, J., Bronwyn, H. 2000. Analysis and conservation implication of koala genetics. *Conservation Genetics* 14: 639-649.
- Snyder, N.F.R., McGowan, P., Gilard, J., Grajal, A. 2000. *Parrots: Status Survey and Conservation Action Plan 2000-2004*. IUCN, Cambridge.

- Solé-Cava, A.M. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Mاتيoli, S.R. (ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Editora Holos, Ribeirão Preto. Pp: 172-192.
- Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T., Mindell, D.P. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 105-114.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Tavares, E.S., Yamashita, C., Miyaki, C.Y. 2004. Phylogenetic relationships among some neotropical parrot genera (Psittacidae) based on mitochondrial sequences. *The Auk* 121: 230-242.
- Tavares, E.S., Baker, A.J., Pereira, S.L., Miyaki, C.Y. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of Neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Biology* 55: 454-470.
- Taylor, T.D., Parkin, D.T. 2007a. Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. *Molecular Ecology Notes* 7: 163-167.
- Taylor, T.D., Parkin, D.T. 2007b. Characterization of 13 microsatellite loci for the Moluccan Cockatoo, *Cacatua moluccensis*, and Cuban Amazon, *Amazona leucocephala*, and their conservation and utility in other parrot species (Psittaciformes). *Conservation Genetics* 8: 991-994.
- Temple, H.J., Hoffman, J.I., Amos, W. 2006. Dispersal, philopatry and intergroup relatedness fine-scale genetic structure in white-breasted thrasher, *Ramphocinclus brachyurus*. *Molecular Ecology* 15: 3449-3458.
- Templeton, A.R. 1995. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction-enzyme mapping or DNA sequencing. V. Analysis of case/ control sampling designs: Alzheimer's disease and the Apoprotein E locus. *Genetics* 140: 403-409.
- Tokita, M., Kiyoshi, T., Armstrong, K.N. 2007. Evolution of craniofacial novelty in parrots through developmental modularity and heterochromy. *Evolution and Development* 9: 590-601.
- Veit, M.L., Robertson, R.J., Hamel, P.B., Friesen, V.L. 2005. Population genetic structure and dispersal across a fragmented landscape in Cerulean warblers (*Dendroica cerulean*). *Conservation Genetics* 6: 159-174.

- Villard, M-A; Trzcinski, M.K., Merriam, G. 1999. Fragmentation effects on forest birds: relative influence of woodland cover and configuration on landscape occupancy. *Conservation Biology* 13: 774-783.
- Waser, P., Strobeck, C. 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 43-44.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir, J.T., Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17: 2321-2328.
- Westneat, D.F. 1990. Genetic parentage in the indigo bunting: a study using DNA fingerprinting. *Behaviour Ecology and Sociobiology* 27: 67-76.
- Wetton, J.H., Carter, R.E., Parkin, D.T., Walters, D. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327: 147-149.
- Wright, T.F., Rodriguez, A.M., Fleischer, R.C. 2005. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. *Molecular Ecology* 14: 1197-1205.

Notas sobre alguns aspectos da biologia da arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (Psittaciformes: Psittacidae) na região de Carajás, Pará

Flavia T. Presti^{1*}; Adriana R. Oliveira-Marques¹; Grace F. da Silva²; Cristina Y. Miyaki¹ & Neiva M.R. Guedes^{2,3*}

A arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) se destaca pela beleza e por ser o maior psitacídeo existente. Atualmente a espécie é considerada vulnerável (BirdLife International 2009), sendo o número total de indivíduos em vida livre no Brasil estimado em 6.500, distribuídos em três regiões: Pará (leste da região amazônica e oeste de Altamira), nordeste do país (região de encontro entre Tocantins, Piauí, Maranhão e Bahia) e Pantanal Matogrossense, onde ocorre a maioria dos indivíduos (Guedes *et al.* 2008). Dentre as três áreas de ocorrência, é somente no Pantanal onde há um programa de monitoramento da espécie a longo prazo (Projeto Arara Azul). Assim, quase todas as informações sobre a biologia da espécie foram obtidas nessa região (Guedes 2004). Por isso, dados sobre a espécie nas outras áreas de ocorrência são bastante relevantes.

No Pantanal, o período de reprodução geralmente compreende de julho a fevereiro e envolve desde o preparo do oco até o vôo do filhote. Sua postura é de um a três ovos (em média dois) e a incubação é feita por um dos membros do casal (possivelmente a fêmea) durante um período de 28 a 30 dias. Até a eclosão, esse indivíduo do casal permanece a maior parte do tempo no ninho, sendo alimentada pelo outro membro (possivelmente o macho). Após a eclosão, os filhotes permanecem no ninho aproximadamente 100 dias. Após o vôo os jovens ainda são dependentes dos pais para alimentação e a separação geralmente ocorre após 12 a 18 meses (Guedes 1993). Durante todo este período o casal permanece próximo ao ninho. Fora da época de reprodução, as araras tendem a se socializar sendo muito comum observá-las em bandos.

O presente trabalho constitui um estudo inicial visando obter informações gerais que possam vir a auxiliar a conservação de araras-azuis na região da Serra dos Carajás (sul do Pará, Figura 1). A Serra dos Carajás apresenta clima tropical chuvoso tipo "Aw" (classificação de Köppen), com seca de inverno e forte período de estiagem coincidindo com o inverno do hemisfério sul e as precipitações flutuam entre 2.000 e 2.400 mm anuais. O mês com menor precipitação é agosto, na faixa de 15 mm. A temperatura média anual está em torno de 23 a 25 °C. O período mais quente do ano está no terceiro trimestre (julho a setembro). O mês mais frio é fevereiro e a umidade relativa média fica em torno de 80 % (Rolim *et al.* 2006). Nessa área a floresta ombrófila densa aberta é o principal tipo de cobertura vegetal com variações locais, principalmente relacionadas ao relevo (Cavalcanti 1986). Além disso, na Serra dos Carajás ocorrem formações especiais denominadas de canga, com fisionomias de savanas (Secco & Mesquita 1983) que se localizam no alto da serra formando ilhas, entre as altitudes de 600 e 750 m. Na Serra dos Carajás há três Florestas Nacionais (Flonas), uma Área de Proteção Ambiental (APA) e uma Reserva Biológica (REBIO, Figura 1). No entorno da Serra dos Carajás, à sudeste, se encontra um município de 11 mil habitantes, Canaã dos Carajás (que inclui o distrito de Mozartínópolis, Figura 1), que se originou a partir de um assentamento agrícola. Sua economia se baseia



Figura 1. Serra dos Carajás. Fonte: <http://mosaicocarajas.webng.com/>. De: Fabiano Gumier Costa

na cultura de arroz, milho e feijão e na pecuária. Praticamente toda a área do município foi desmatada para a realização dessas atividades (Coelho *et al.* 2005, Palheta da Silva 2004, Cavalcanti 1986).

Foram realizadas três campanhas para a área: em novembro de 2007 (10 dias na floresta amazônica da Flona Tapirapé-Aquiri e 15 dias em áreas com pasto de Mozartínópolis, Figura 1), outubro e novembro de 2008 (seis dias na floresta amazônica da Flona Carajás e 15 dias em áreas com pasto, Figura 1) e em março de 2009 (nove dias somente em áreas com pasto). Os períodos das visitas foram planejados de modo que a primeira e a segunda viagens coincidissem com a época reprodutiva e a terceira fosse fora dela. A busca por araras e por ninhos foi realizada por deslocamentos em estradas ou trilhas, mas principalmente por meio de entrevistas com a população local que forneceu informações sobre localização de ninhos. Todos os dados de avistamentos de indivíduos, de ninhos e de potenciais ninhos tiveram suas posições geográficas determinadas por GPS. Para verificar o tipo de distribuição (aleatória, agrupada ou uniforme) dos ninhos e dos avistamentos, a área foi amostrada segundo quadrantes de 28,80 km² e 30,42 km², respectivamente; e foram calculadas a média e a variância da frequência por quadrante para avistamentos e ninhos. Esses valores foram utilizados para calcular o coeficiente de dispersão (CD) que é dado por: $CD = s^2/X$, onde s^2 é a variância e X é a média. Segundo Odum (1988), quando a variância é igual à média ($CD = 1$) a distribuição é aleatória; se a variância é estatisticamente maior que a média ($CD > 1$) a distribuição é agrupada; e se a variância é menor que a média ($CD < 1$) a distribuição é uniforme. Também foi calculada a densidade de araras-azuis e de ninhos (número de indivíduos e ninhos por km²).

Durante os dois períodos reprodutivos, ocos com sinais de ocupação por arara-azul (borda do oco com sinais de bicadas, penas, fezes, restos de cocos, adultos vocalizando ou informações de terceiros) foram acessados sempre que possível. Para chegar até a entrada dos potenciais ninhos utilizamos a técnica de alpinismo (Figura 2). Foram feitos registros com fotos e gravações de imagens de todos os potenciais ninhos encontrados. A identificação da espécie arbórea foi feita baseada em Taroda (1980) e Gama *et al.* (2005). Durante a campanha de outubro e novembro de 2008, quando possível, o diâmetro da árvore na altura do peito (DAP) e altura do oco foram medidos com trena, a altura total da árvore foi estimada a olho nu e o número de ocos foi

registrado. As medidas relativas à abertura do oco que foram tomadas com trena foram a largura, comprimento e profundidade lateral (PLA, distância da abertura até o fundo). Também foram medidas as profundidades verticais da base do ninho, tanto para baixo (PVB, da abertura do oco até a base do ninho) e para cima (PVC, da copa da árvore até a base do ninho). Detalhes sobre procedimentos das medições estão descritos em Guedes & Seixas (2002). Restos de cocos encontrados próximos aos ninhos foram coletados.

As dimensões de ovos e de filhotes (comprimento do tarsometatarso e a altura, comprimento e largura do bico) foram medidas utilizando paquímetro mecânico (precisão de 0,05 mm; Mitutoyo). Foram feitas três repetições das medidas e, sempre que possível, pela mesma pessoa. Desses filhotes foi coletado aproximadamente 0,1 ml de sangue da veia braquial da asa utilizando seringa descartável para posteriores análises genéticas. As amostras biológicas foram estocadas no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em etanol absoluto a -20°C. Sempre que o tamanho permitisse, os filhotes foram anilhados. Em seguida o filhote foi colocado de volta em segurança no seu ninho.

Durante o período reprodutivo, nas áreas de pasto do entorno da Flona do Carajás (distrito de Mozartinópolis) e de Canaã dos Carajás foram realizados aproximadamente 100 avistamentos de arara-azul em 2007 e 192 avistamentos em 2008 (pode ter ocorrido duplo registro), ou seja, aproximadamente uma média de 6,7 araras/dia e 9,1 araras/dia, respectivamente. Como comparação, foram realizados 30 e 35 avistamentos (2 e 1,7 araras/dia, respectivamente) de araras-vermelhas (*Ara macao* ou *Ara chloropterus*) em 2007 e 2008, respectivamente. Nas duas estações reprodutivas, foram identificados 41 potenciais ninhos de arara-azul, sendo 38 deles (92,7%) em pastagem e três em borda de mata (7,3%) e também foram identificados oito potenciais ninhos de *Ara macao* e em dois ninhos não foi possível identificar a espécie de arara-vermelha (*A. macao* ou *A. chloropterus*), todos em borda de mata. Foi possível subir em três dos ninhos de *A. macao* e em um deles, havia três ovos e nos outros dois não havia filhote.

No interior da Flona Tapirapé-Aquiri (vistoriado durante dez dias no período reprodutivo de 2007) foram avistados somente dois pares (casais) de araras-azuis voando e não foi identificado nenhum ninho de arara-azul. Entretanto foram avistados mais de 40 casais de araras-vermelhas (*A. chloropterus* e *A. macao*) e identificados 11 ninhos. Desses potenciais ninhos, sete (64%) eram em castanheiras (*Bertholletia excelsa*) e quatro (36%) em amarelão (*Euxylophora paraensis*). O interior da Flona Carajás foi vistoriado durante seis dias no período reprodutivo de 2008, tendo sido percorridos aproximadamente 18 km de trilhas em sete rotas distintas e uma área estimada de 8 km² com altitude de aproximadamente 200 a 400 m. Também foram realizadas seis horas de observação em dois pontos distintos e não foi avistado nenhum indivíduo de arara-azul (somente um casal foi ouvido próximo ao rio Sossego), enquanto 21 indivíduos de araras-vermelhas foram avistados e dois potenciais ninhos foram identificados.

Apesar da maior dificuldade em realizar avistamentos em vegetação fechada do que em áreas abertas, parece que araras-azuis na região visitada tendem a preferir áreas de pasto quando comparadas às araras-vermelhas. A mesma preferência foi encontrada no Pantanal por Guedes (1993). Possivelmente isso está relacionado a algumas vantagens como visibilidade, acessibilidade e disponibilidade de alimento (Guedes 1993). Tal preferência também pode estar associada à maior disponibilidade de oco para reprodução, já que as espécies arbóreas utilizadas pelas araras-azuis (ver mais à frente) se adaptam melhor a áreas de pastagem (Rolim *et al.* 2006). Forshaw (1989) indica que arara-azul ocupa florestas densas somente no baixo rio Amazonas e no sudeste do Pará, enquanto nas demais áreas de ocorrência ocupam principalmente mata ciliar, percorrendo também áreas abertas. Entretanto, Forshaw (1989) descreve que nessa região habitam principalmente terras baixas e possuem uma acentuada preferência por bordas ou clareiras. Segundo Ridgely (1981) a perda de habitat não parece ser um grande problema para a espécie quando a principal forma de uso do solo é a pastagem, mas o crescente povoamento humano pode trazer captura e caça. No nosso curto trabalho de campo,



Figura 2. Técnica de alpinismo para acessar os ninhos.

parece que além da caça (relatada por moradores locais), a destruição do ambiente para a pastagem está possivelmente retirando árvores utilizadas para alimentação e ninhos das araras. Mesmo na área preservada de floresta amazônica, foi observada ausência natural de árvores com madeira mole que são essenciais para a reprodução da espécie.

O coeficiente de dispersão mostrou que a distribuição dos avistamentos e de potenciais ninhos foi agrupada (CD = 1,979 e CD = 11,576, respectivamente). A área de maior ocorrência de avistamentos e de potenciais ninhos corresponde à região próxima a Mozartinópolis (borda da Flona Carajás). A localização dos avistamentos em toda área estudada apresenta a densidade de 0,07 araras-azuis/km² e de potenciais ninhos foi de um ninho a cada 139 km² (0,007 ninhos/km²). Esses dados indicam que há concentração de avistamentos e de localização de potenciais ninhos. Serão necessários mais estudos e percorrer mais áreas para confirmar esses resultados. O coeficiente de dispersão observado no Pantanal também mostrou que a distribuição dos ninhos é agrupada e em toda a área monitorada a densidade de ninhos foi de 0,037/km² (Guedes 1993) mostrando uma maior concentração e agrupamento de ninhos no Pantanal em relação à região do Carajás.

Todos os ninhos e potenciais ninhos de arara-azul foram encontrados na árvore conhecida como axixá (*Sterculia pruriens*) e todos os ocos encontrados estavam no tronco principal. No Pantanal a maioria dos ninhos de arara-azul (90%) é encontrada em uma única espécie arbórea, o manduvi (*Sterculia apetala*) (Guedes 1993, Pinho & Nogueira 2003). É interessante notar que ambas as espécies pertencem ao mesmo gênero. Na região nordeste a espécie nidifica preferencialmente em paredões rochosos (Collar 1997). O fato de essas araras não conseguirem escavar seus próprios ninhos as tornam muito especialistas na nidificação, uma vez que necessitam de árvores com tronco mole ou cavidades pré-existent em paredões. Em termos de conservação da espécie, esses dados são de extrema importância, uma vez que seria necessário investir na conservação e plantio das espécies arbóreas identificadas para que, a longo prazo, as araras-azuis possam se reproduzir.



Figura 3. Ovos de arara-azul encontrados na região de Mozartinópolis, sul do Pará

O valor de DAP de 12 axixás com ninhos e potenciais ninhos variou de 2,05 a 6,14 m com média e desvio padrão de $3,68 \pm 1,18$ m. No caso dos manduvis no Pantanal, todos os ninhos e potenciais ninhos foram localizados em árvores com DAP maior que 0,5 m, sendo que a maioria dos ninhos com alto sucesso reprodutivo ocorre em árvores com DAP maior que 1 m (Santos *et al.* 2007). O valor da média de DAP nos axixás é estatisticamente maior do que o encontrado para o manduvi no Pantanal ($0,93 \pm 0,25$ m) (Guedes 1993). A altura total estimada dos axixás com ninhos e potenciais ninhos (N=15) variou de 17 a 30 m, com média e desvio padrão de $22,9 \pm 3,85$ m. A altura da entrada dos ninhos e potenciais ninhos encontrados variou de 7,5 a 22,2 m com média e desvio padrão de $15,6 \pm 4,28$ m. Comparando com as medidas dos manduvis (média e desvio padrão da altura estimada da árvore $14,3 \pm 2$ m e média e desvio padrão da altura da entrada do ninho $7,9 \pm 2$ m; Guedes 1993) pode-se verificar que são estatisticamente maiores. Quanto às medidas da abertura e da parte interna dos ninhos e de potenciais ninhos, foi verificada tendência de os manduvis do Pantanal (Guedes 1993) apresentarem largura e comprimentos maiores em relação ao dos axixás em Carajás. Para as outras medidas (número de ovos, profundidade lateral, profundidade vertical para cima e para baixo) não foram encontradas diferenças significativas. No entanto, como a amostra de axixás medidos (N=15) é muito pequena e bem menor do que a de manduvis (N=52) (Guedes 1993), seria necessário obter mais dados sobre os axixás para permitir realizar uma comparação mais robusta. Adicionalmente, seria importante realizar um estudo detalhado dessas duas espécies arbóreas buscando identificar características que possam estar correlacionadas com a seleção como ninho por parte das araras-azuis.

Nas duas estações reprodutivas estudadas, foram encontrados 41 ninhos com sinal de ocupação, isto é, presença ou vocalização de araras nas proximidades ou dentro dos ocos, entrada do oco com marcas de bico, presença de cocos ou penas. Dos 41 ninhos, foi possível investigar 30 deles. Dentre os onze ninhos que não puderam ser acessados, para quatro a montagem do equipamento de alpinismo não pode ser realizada e em sete havia abelhas ou marimbondos. Dos 30 ninhos que foram acessados, dois continham dois ovos (Figura 3), dezesseis tinham filhote (Figura 4; somente em dois deles havia dois filhotes) e doze estavam vazios. Em cinco dos ninhos sem filhotes, o substrato colocado pelas araras parecia velho sugerindo que, se havia filhote, ele poderia já ter abandonado o ninho. Nos demais, o substrato era novo sugerindo que o casal poderia estar se preparando para colocar ovos. Em um dos ninhos com filhote não foi possível retirá-lo devido ao pequeno diâmetro do oco. Os dezessete filhotes capturados tiveram amostras de sangue coletadas e os catorze com tamanho adequado foram anilhados. Também foram coletadas 39 penas de araras-azuis e oito de araras-vermelhas. Dois dos quatro ovos foram medidos (44×40 mm e 40×35 mm) e seus valores são semelhantes aos encontrados no Pantanal ($47 \pm 5,7 \times 36,9 \pm 3,1$) (Guedes 1993). Apesar de a amostragem de filhotes ser baixa, pudemos observar que filhotes avaliados próximo ao meio-dia eram os que estavam mais alimentados, indicando uma maior atividade de alimentação



Figura 4. Filhote de arara-azul encontrado dentro do ninho na região de Mozartinópolis, sul do Pará.

pela manhã. Foram medidos oito filhotes, sendo que as medidas de bico (largura, comprimento e altura, respectivamente) do menor e do maior filhote foram de 24, 22 e 17 mm e 83,32, 72,28 e 48,15 mm, respectivamente. O comprimento do tarsometatarso do maior filhote encontrado (aproximadamente 85 dias) foi de 43,17 mm, o que é congruente com a média e desvio padrão do tamanho do tarsometatarso de filhotes prontos para voar no Pantanal ($43 \pm 0,63$ mm) (Guedes 1993).

Na estação reprodutiva de 2007 somente foram encontrados filhotes bem empenados. Já no período reprodutivo de 2008 foi observada reprodução bastante assíncrona, com ninhos contendo desde ovos até filhotes bem empenados. Essa assincronia poderia estar relacionada com o período de chuvas que, segundo a população local, estava atrasado naquele ano e, portanto, a temperatura permanece muito alta. Um monitoramento mais longo é necessário para confirmar essas observações. Esse resultado pode explicado pelas altas temperaturas como o observado por Saunders (1982) que verificou que filhotes de uma espécie de psitacídeo australiano *Calyptorhynchus funereus* apresentavam crescimento significativamente menor quando a temperatura ambiental estava mais alta, dificultando o forrageamento dos pais. Resultados similares foram obtidos por Guedes (2009) para as araras-azuis analisando dez anos de reprodução no Pantanal. À medida que a temperatura aumentou, o sucesso reprodutivo das araras diminuiu. Outro fator que pode estar influenciado esses resultados é a disponibilidade de frutos de palmeiras que é menor em períodos secos (Guedes 2009).

Durante o período reprodutivo, embaixo das árvores com ninhos e potenciais ninhos de arara-azul foram coletados restos de cocos consumidos pelas araras. A maior parte dos cocos coletados foi de inajá (*Maximiliana regia*), seguido por tucuman ou tucum (*Astocarym sp.*), mas também foram encontrados gueroaba (*Syagrus oleracea*), poucos frutos de acuri ou bacuri (*Scheelea phaleata*) e de macaúba ou bocaiúva (*Acrocomia aculeata*). Moradores locais relataram que observam as araras se alimentando de inajá, gueroaba e tucum. Munn *et al.* (1989) descrevem que na região de Carajás (mesma região estudada no presente trabalho) e Altamira, a espécie se alimenta de inajá e de tucum, o que está parcialmente de acordo com as observações realizadas no presente trabalho. No Pantanal sua alimentação se baseia somente nos frutos de duas palmeiras: a bocaiúva (*Acromia aculeata*) e o acuri (*Scheelea phaleata*) (Guedes 1993). Na região de encontro do Piauí, Tocantins, Maranhão e Bahia, a arara-azul se alimenta de pia-

çava (*Atalea funifera*) e de catolé (*Syagrus coronata*) (Munn *et al.* 1989, Guedes 1993). Parece que a dieta mais variada na região de Carajás reflete a maior variedade de palmeiras disponíveis nesse local. Essas observações também são muito relevantes em termos de conservação, uma vez que parece ser importante preservar a diversidade de palmeiras que fazem parte da dieta das araras-azuis. Os moradores da área de Carajás também descrevem que, em geral, não observam araras-azuis se alimentando no chão, como é visto com frequência na região do Pantanal (Guedes 1993).

A campanha realizada fora da época da reprodução (área de pastagem) foi realizada em um intervalo de tempo menor, pois não envolveu escalada de árvores. Foram percorridos aproximadamente 2.000 km em estradas. Neste período foram realizados aproximadamente 223 avistamentos de arara-azul, ou seja, uma média de 24,8 araras/dia e 26 de araras-vermelhas ou 2,9 araras/dia (*Ara macao* ou *Ara chloropterus*). A quantidade de araras observada nesse período foi estatisticamente maior que a observada no período da reprodução. Tal diferença deve estar associada aos seguintes fatores: 1) na época da reprodução os casais permanecem muito próximos ao ninho durante grande parte do tempo de incubação de ovos e de desenvolvimento de filhotes, sendo que somente um deles sai à procura de alimento e se torna mais conspicuo (Guedes 1993); 2) fora do período reprodutivo foi muito comum ver araras-azuis em trios ou quartetos que, possivelmente, são o casal mais um ou dois filhotes gerados na estação reprodutiva anterior. Tal suspeita é reforçada pelo encontro de uma arara anilhada pertencente a um trio que estava próximo a um ninho e possivelmente tal anilha foi colocada na campanha anterior ainda na fase de ninhego; 3) fora do período reprodutivo araras-azuis se reúnem em bandos maiores e vocalizam mais, facilitando o avistamento. A localização dos avistamentos em toda área estudada corresponde à densidade de 0,18 araras-azuis/km². Além disso, assim como na estação reprodutiva, o coeficiente de dispersão mostrou que a distribuição dos avistamentos foi agrupada (CD = 26,71) e a área de maior ocorrência de avistamentos neste período corresponde à região próxima a Mozartópolis. Esses dados indicam que tanto os avistamentos quanto a localização dos ninhos se concentraram em uma área menor que a área total investigada.

Ainda na campanha de março de 2008 foram visitados nove dos 41 ninhos localizados no período reprodutivo e identificados outros três possíveis ninhos. Desses nove ninhos, um foi perdido pela queda da árvore possivelmente devido às fortes chuvas na região. Nos outros oito ninhos foram observados trios ou quartetos de araras-azuis defendendo o ninho. Relatos de moradores locais descrevem que as araras-azuis permanecem próximo ao ninho durante todo o ano, mas tal informação precisa ser confirmada por monitoramento por maior intervalo de tempo. A maioria (N=34) dos avistamentos foi de grupos de 2 a 4 indivíduos, possivelmente indicando um casal ou uma família de casal com filhote(s). Foram observados dois bandos de seis indivíduos, um bando de sete e um de 13 indivíduos pousados em árvores ou se alimentando em palmeiras. Esse resultado indica que, após o período reprodutivo casais podem permanecer próximos ao ninho com seu(s) filhote(s), defendendo o ninho e possivelmente ensinando o filhote a voar e se alimentar, assim como é relatado em Guedes (1993). Nessa época as palmeiras de macaúba e *tucum* praticamente não apresentavam frutos e as araras-azuis se alimentavam de inajá e de acuri. Apesar de dentre todas as espécies de palmeiras o babaçu apresentar a maior quantidade de frutos, não observamos araras-azuis se alimentando desse item pois o fruto de babaçu parece ser muito grande para servir de alimento para a espécie.

Finalizando, as informações coletadas poderão ser úteis para planejar melhor a conservação de araras-azuis na região do Carajás. No presente trabalho foi possível obter a distribuição e a localização de ninhos e de áreas de alimentação e avaliar a preferência ambiental desse grupo de araras-azuis. Essas informações, associadas a outros dados, podem ajudar a definir áreas prioritárias para a conservação da espécie. No entanto, é necessário realizar estudos de mais longo prazo e mais aprofundados para confirmar os dados obtidos, assim como obter outras informações da biologia e da ecologia da espécie na Serra dos Carajás.

Agradecimentos

Agradecemos à empresa Vale, em especial, à Diretoria de Ferrosos, Cobre e Projeto Salobo pelo apoio e financiamento, à FAPESP pelo financiamento, ao ICMBio local por todo suporte, ao melhor auxiliar de campo Patrick Y. H. Karassawa e a todos moradores da região, especialmente, Sr. Luís Sementeira.

Referências bibliográficas

- Birdlife International (2009) *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. 24 agosto 2009.
- Cavalcanti, R.B. (1986) Aspectos da fauna e sua conservação. In: Gonçalves Júnior, J.M. (org.). *Carajás: Desafio Político, Ecologia e Desenvolvimento*, CNPq, São Paulo, Pp: 214-221.
- Coelho, M.C.N., M.A. Monteiro, A. Lopes & S.B. Lira (2005) Regiões do entorno dos projetos de extração e transformação mineral na Amazônia Oriental. *Novos Cadernos NAEA* 8: 73-107.
- Collar, N.J. (1997) Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., A.E. Elliot & J. Sargatal (eds.). *Handbook of the Birds of the World*, vol.4, Lynx Edicions, Barcelona, Pp: 280-477.
- Forshaw, J.M. (1989) *The Parrots of the World*, 3 ed., Lansdowne Press, Wiltoughby.
- Gama, J.R.V., A.L. Souza, S.V. Martins & D.R. Souza (2005) Comparação entre florestas de várzea e de terra firme do Estado do Pará. *Revista Árvore* 29: 607-616.
- Guedes, N.M.R. (1993) *Biologia Reprodutiva da Arara Azul (Anodorhynchus hyacinthinus) no Pantanal-MS, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Guedes, N.M.R. (2004) Management and conservation of the large macaws in the wild. *Ornitologia Neotropical* 15: 279-283.
- Guedes, N.M.R. & G.H.F. Seixas (2002) Métodos para estudos de reprodução de psitacídeos. In: Galetti, M., Pizo, M.A. (eds.). *Ecologia e Conservação de Psitacídeos no Brasil*. Melopsittacus Publicações Científicas, Belo Horizonte, Pp: 123-139.
- Guedes, N.M.R., C. Bianchi & Y. Barros (2008) *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: Machado, A.B.M., G.M. Drummond & A.P. Paglia (eds.) *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. 2 vol. MMA – Ministério de Meio Ambiente. Brasília, DF.
- Guedes, N.M.R. (2009) Sucesso reprodutivo, mortalidade e crescimento de filhotes de araras azuis *Anodorhynchus hyacinthinus* (Aves, Psittacidae), no Pantanal, Brasil. Tese doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Munn, C.J., J.A. Thomsen & C. Yamashita (1989) The Hyacinth Macaw. In: Chadler, W.J (ed.). *Audubon Wildlife Report*. Academic Press, New York. Pp: 404-419.
- Odum, E.P. (1988) *Ecologia*. Editora Guanabara S.A., Rio de Janeiro.
- Palheta da Silva, J.M. (2004) *Poder, Governo e Território em Carajás*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Presidente Prudente.
- Pinho, J.B. & F.M.B. Nogueira (2003) Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) reproduction in the northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Ornitologia Neotropical* 14: 29-38.
- Ridgely, R.S. (1981) The current distribution and status of mainland Neotropical parrots. In: Pasquier, R.F. (ed.). *The Conservation of New World Parrots*. ICBP Parrot Working Group Meeting. Smithsonian Institution Press, Sta Lucia. Pp: 241-242.
- Rolim, S.G., H.T.Z. Couto, R.M. Jesus & J.T. França (2006) Modelos volumétricos para a Floresta Nacional do Tapirapé-Aquiri, Serra dos Carajás (PA). *Acta Amazonica* 36: 107-114.
- Santos, A.J., W.M. Tomas, I.H. Ishii, N.M.R. Guedes & J.D. Hay (2007) Occurrence of Hyacinth Macaw nesting sites in *Sterculia apetala* in the Pantanal Wetland, Brazil. *Gaia Scientia* 1: 127-130.
- Saunders, D.A. (1982) The breeding behavior of the short-billed form of the White-tailed Black Cockatoo (*Calyptorhynchus funereus*). *Ibis* 124: 422-455.
- Secco, R.S. & A.L. Mesquita (1983) Notas sobre a vegetação de canga de serra norte. *Botânica* 59: 1-13.
- Taroda, N. (1980) *O gênero Sterculia L. no Brasil: revisão taxonômica e aspectos da biologia da reprodução*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

¹ Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil; *flapresti@hotmail.com

² Instituto Arara Azul, R. Klaus Sthurk 178, CEP 79051-660, Campo Grande, MS, Brazil.

³ Universidade Anhanguera-UNIDERP. Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. *projetoararaazul@gmail.com