Rafaella Sávia Monteiro

Isolamento de microssatélites e análise genética
de ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*, Aves,
Psittaciformes)

Isolation of microsatellites and genetic analysis
of Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*, Aves,
Psittaciformes)

São Paulo

2015

Rafaella Sávia Monteiro

Isolamento de microssatélites e análise genética
de ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*, Aves,
Psittaciformes)

Isolation of microsatellites and genetic analysis
of Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*, Aves,
Psittaciformes)

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Dra. Cristina Yumi
Miyaki

São Paulo

2015

Monteiro, Rafaella Sávia
Isolamento de microssatélites e
manejo genético de ararinha-azul
(*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes, Aves)
56 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Psitacídeos 2. Marcadores
moleculares 3. Similaridade Genética 4.
Parentesco 5. Manejo genético
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Cristina Yumi Miyaki
Orientador(a)

Aos meus amados pais, Ronaldo e Lourdes,
e à minha amada irmã Dayane

“[...] Se eu pudesse saber destinos ou futuros
Fazer mover as montanhas com minha fé
Se eu pudesse falar qualquer língua em qualquer lugar
E desse os meus bens ao mais pobre
Ou morresse em favor de alguém
Se não tivesse amor, de nada valeria
Se não tivesse amor, proveito algum teria
Vazio seria o falar
Um sino que insiste em tocar
Se dentro de mim não valesse o amor”

João Alexandre, *Essência de Deus* (música)
Baseado em 1 Cor 13, 1-3

Agradecimentos

Agradeço a Deus e à N. Sra. que me sustentaram em tantos momentos difíceis durante esses anos! Muitos desafios, aprendizado e vitórias!

À minha família, pai, mãe e day pelo amor incondicional, cuidado e incentivo! Ao Bruno pela companhia, incentivo e cuidado! Amo vocês! Aos meus tios, tia Vânia e primos pelo apoio!

Ao pe. Air, pelas conversas e conselhos! Aos amigos e toda a comunidade de N. Sra. do Sagrado Coração pelo sustento! À Comunidade Recado de São Paulo!

Aos meus amigos do GOU Paulo Apóstolo: Álvaro, Ana Clara, Bruno, Camila, Cauê, Inaiara, Jean, Karol, Leonardo, Luckas, Melissa, Nayara, Tiago Uanda, e tantos outros amigos de fé! Ao MUR sampa!

À professora Dra. Cris Miyaki pela oportunidade, atenção e confiança!

Aos amigos do LGEMA: Ana Cris, Ana Carol, Tiago, Henrique, Henrique 2, Fábio, Cibele, Adri, Bia, Fernanda, Claydson, Danilo, André, Ricardo, Maria, Marcos, Bruno, Érica, Yair, Flávia! Obrigada por toda ajuda e amizade!

À Dra. Iara Lopes por me apresentar a genética da conservação!

À Dra. Flávia Presti pelos dados de microssatélites heterólogos e outras informações sobre a ararinha-azul!

À professora Dra. Tatiana Teixeira Torres pela atenção e ajuda com as análises de bioinformática!

À Universidade de São Paulo e o Instituto de Biociências pelo ensino e infraestrutura! Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo financiamento e bolsas! Aos funcionários em geral, mas, principalmente Lucilene e Maria!

A todos que contribuem para a conservação da ararinha-azul (ICMBio, Save Brasil, AWWP, NEST, ACTP, VALE), das espécies ameaçadas e da natureza!

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Computação da Universidade de São Paulo (BioComp), com apoio da Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

Resumo

A ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) é uma das aves mais ameaçadas do mundo e está extinta na natureza. Estudos estão sendo realizados para o manejo e conservação em cativeiro para futura reintrodução. Microsatélites são marcadores moleculares úteis para estimar parentesco entre indivíduos. Esse dado pode ser utilizado para minimizar os efeitos deletérios da endogamia e a perda de diversidade genética do plantel do programa de reprodução em cativeiro, recomendando pares reprodutivos. O presente estudo teve como objetivos identificar microsatélites polimórficos específicos para acessar o nível de diversidade genética da espécie e estimar o parentesco entre pares de aves para auxiliar o manejo genético da população. O genoma de um indivíduo foi parcialmente sequenciado na plataforma 454 GS FLX (Roche). Foram desenhados 25 pares de *primers*, sendo 20 para dinucleotídeos e cinco para tetranucleotídeos. Dezenove microsatélites puderam ser amplificados e foram testados quanto ao nível de polimorfismo em 12 indivíduos selecionados. Desses, 14 microsatélites foram polimórficos. Também foram usados dados de microsatélites heterólogos nas análises. Dois microsatélites apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Wenberg e cinco microsatélites foram excluídos devido à presença de desequilíbrio de ligação. A probabilidade de exclusão de paternidade quando um parental é conhecido foi de 94,8% e a probabilidade de identidade foi de 0,00000793. A riqueza alélica média foi de 2,49 alelos por microsatélite, confirmando a baixa diversidade genética da espécie. Alguns alelos já foram perdidos no plantel atual em cativeiro. A população tem valor de índice de parentesco médio similar àquela de, no mínimo, primos de primeiro grau e alguns dos fundadores são muito aparentados. Alguns potenciais casais com baixo índice de parentesco r podem vir a ser importantes para o programa de reprodução em cativeiro.

Abstract

Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*) is one of the most endangered birds of the world and is extinct in the wild. Several coordinated studies are being conducted for its management and conservation in captivity for future reintroduction. Microsatellites are useful markers to estimate relatedness between individuals. This information can be used to minimize the deleterious effects of inbreeding and loss of genetic diversity of captive birds, recommending less closely related pairs for the breeding program. The present study aims to identify specific polymorphic microsatellites to assess the levels of genetic variability of the species and the genetic relatedness among birds for the genetic management of the population. The partial genome of an individual was sequenced on a 454 GS FLX (Roche) platform. Twenty-five pairs of primers were designed, being 20 for di- and five tetra-nucleotide microsatellites. Nineteen microsatellites were amplified and tested in 12 selected individuals. Fourteen microsatellites were polymorphic. Heterologous microsatellites were also used in the analyses. Two microsatellites were not in Hardy-Weinberg equilibrium and five presented linkage disequilibrium. Exclusion paternity probability when one parental is known was 94.8% and identity probability was 0.00000793. Mean allele richness was 2.49 alleles per microsatellite, confirming the low genetic diversity of the species. The current captive population has lost some alleles. The mean relatedness among individuals was, at least, similar to the one between first cousins and some founders are very closely related. Based on the relatedness index, some unrelated potential couples can become important for the captive program.

Lista de tabelas

Tabela 1. Instituições mantenedoras e número de indivíduos vivos participantes do programa de conservação do ICMBio.....	07
Tabela 2. Indivíduos amostrados, número de registro no <i>Studbook</i> e sexo.....	17
Tabela 3. Valor teórico de parentesco para categorias de parentesco em populações com e sem endogamia.....	23
Tabela 4. <i>Primers</i> específicos de ararinha-azul desenvolvidos a partir do sequenciamento parcial do genoma da espécie.....	25
Tabela 5. Microssatélites polimórficos testados em 12 indivíduos representativos da diversidade da espécie	27
Tabela 6. Heterozigosidade observada e esperada e PIC de cada microssatélite	28
Tabela 7. Alelos raros perdidos de indivíduos fundadores.....	28
Tabela 8. Média e variância de parentesco entre 85 ararinhas-azuis calculadas com sete estimadores de parentesco.....	30
Tabela 9. Coeficiente de correlação entre os sete estimadores de parentesco.....	30
Tabela 10. Valores de parentesco entre os indivíduos fundadores estudados.....	31
Tabela 11. Relação de parentesco entre indivíduos fundadores.....	31
Tabela 12. Relações de parentesco com incongruência entre dados moleculares e heredograma	32
Tabela 13. Coeficiente de endogamia das 85 ararinhas-azuis estudadas.....	33

Sumário

1.	Introdução.....	01
	1.1. A extinção de aves	01
	1.2. A espécie em estudo: a ararinha-azul.....	02
	1.3. Reprodução em cativeiro.....	04
	1.4. Estratégias para o manejo genético em cativeiro.....	08
	1.5. Estimadores de parentesco.....	10
	1.6. Os microssatélites.....	11
2.	Objetivos.....	14
3.	Material e métodos.....	15
	3.1. Isolamento de microssatélites específicos.....	15
	3.2. Genotipagem de microssatélites específicos e heterólogos.....	17
	3.3. Análises de parentesco	21
4.	Resultados.....	24
	4.1. Isolamento de microssatélites específicos	24
	4.2. Genotipagem de microssatélites específicos e heterólogos.....	26
	4.3. Análises de parentesco	29
5.	Discussão.....	34
6.	Conclusões.....	41
7.	Referências bibliográficas.....	42
8.	Anexos.....	53

1. Introdução

1.1. A extinção de aves

As aves são um dos grupos de animais mais conhecidos e estudados (MMA, 2008). Existem mais de 10 mil espécies de aves no mundo (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014). Porém, a taxa de extinção tem aumentado de forma exponencial, principalmente devido a atividades humanas, tais como degradação e fragmentação de habitat, caça e captura de indivíduos (SODHI *et al.*, 2011). As aves com maior risco de extinção geralmente são especialistas, de grande tamanho, raras e com distribuição restrita (SODHI *et al.*, 2011). Desde 1500, 154 espécies de aves foram extintas e, provavelmente, a taxa de extinção de aves pode ser mais que 30 vezes o esperado naturalmente (PIMM *et al.* 2006).

Os efeitos da extinção de aves sobre os ecossistemas são diversos, como, por exemplo, redução da dispersão de sementes e limitação da polinização de plantas, perda do controle natural de pragas, dentre outros (SEKERGIOGLU *et al.*, 2004). Devido à sensibilidade de algumas espécies, as aves são consideradas importantes bioindicadores da qualidade do ar e da água (SICK, 1997). Além disso, por serem de relativa fácil visualização e carismáticas, são importantes na conservação de outras espécies atuando como espécies “bandeiras” (MMA, 2008).

O Brasil está localizado na região biogeográfica com maior riqueza e grau de endemismo de aves no mundo, a região Neotropical (SICK, 1997). Está também entre os países com maior riqueza de aves abrigando mais de 1800 espécies de aves (CBRO, 2011), das quais 240 são endêmicas do país (MMA, 2008). Porém, é o país com maior número de espécies de aves ameaçadas do

mundo com 234 espécies presentes na lista de espécies ameaçadas de extinção mais recente do Brasil (MMA, 2014).

O Brasil é também o país mais rico em espécies de psitacídeos (mais de 70 espécies), uma das ordens de aves mais ameaçadas de extinção (SICK, 1997). A ordem dos Psittaciformes é composta por papagaios, araras, periquitos, maracanãs, entre outros. Há registro de 16 espécies extintas de psitacídeos (IUCN, 2015) sendo que uma delas, a arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*), tinha ocorrência também no Brasil (MMA, 2008). Cerca de 180 psitacídeos estão ameaçados de extinção (IUCN, 2015), principalmente devido à perda de habitat e tráfico (WRIGHT *et al.* 2001). As populações de psitacídeos são vulneráveis ao tráfico em geral devido a baixas taxas de reprodução e maior idade para a primeira reprodução, podendo ser agravado com a falta de ninhos (WRIGHT *et al.* 2001).

1.2. A espécie em estudo: ararinha-azul

A ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*; cyano azul, *psitta* papagaio; Figura 1) é uma ave endêmica do Brasil e uma das mais ameaçadas do mundo (SILVA, 1994). Pertence à família Psittacidae, sendo a única espécie do gênero. Possui coloração azulada nas penas com tom azul mais escuro na cauda e nas asas e a região dos olhos acinzentada e com íris amarela (SICK, 1997). Os imaturos possuem a mesma coloração dos adultos, mas com os olhos escuros e bico com uma faixa branca (ABRAMSON *et al.*, 1995). Possui 56 cm de tamanho em média (77,5 cm considerando a cauda) e pesa, em média, 345 g (ABRAMSON *et al.*, 1995).

A ararinha-azul foi coletada pela primeira vez em 1819 por Johan Baptista Von Spix, em Curaçá, na Bahia (JUNIPER & YAMASHITA, 1990). Em 1987 e 1988, havia apenas três indivíduos remanescentes, os quais

provavelmente foram capturados. Em 1990, um último indivíduo foi descoberto na natureza (COLLAR *et al.*, 1992). Em 2000, por não haver mais nenhum indivíduo encontrado em vida livre, a espécie foi considerada extinta na natureza (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2000). Na classificação do governo brasileiro e da IUCN a espécie é considerada como criticamente ameaçada e provavelmente extinta na natureza (ICMBIO, 2014; IUCN, 2015). A ararinha-azul habitava florestas de galeria e se alimentava de *Tabebuia caraiba* (SICK, 1997) presente na caatinga, bioma altamente degradado (AGUIAR *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2005). Além do comércio ilegal e da perda de hábitat (JUNIPER & YAMASHITA, 1990), acredita-se que a espécie tenha sido historicamente rara (RIDGELY, 1981).

Figura 1. *Cyanopsitta spixi* adulto em cativeiro (Foto de Cristina Miyaki)

A maioria das espécies de aves pode ser preservada se o seu hábitat original for mantido, sem a necessidade de um manejo específico, de forma a evitar a extinção completa ou na natureza. Porém, para casos como o da ararinha-azul, a reprodução em cativeiro é essencial para uma futura

reintrodução no ambiente natural, apesar de muito dispendioso e com pequena chance de sucesso se não tiver monitoramento intensivo e o ambiente estiver bem degradado (GOERCK, 2001).

Foi produzido um plano de ação para conservação da espécie que inclui a reprodução em cativeiro a fim de, futuramente, reintroduzi-la na natureza. Diversas ações coordenadas estão sendo realizadas desde novas buscas por indivíduos em campo, educação ambiental, monitoramento do hábitat (ICMBIO, 2011) e estudos genéticos (CAPARROZ *et al.*, 2001; PRESTI *et al.*, 2011).

1.3. Reprodução em cativeiro

Para a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), quando há menos de 1000 indivíduos, é necessário criar um programa de cativeiro (RALLS & BALLOU, 2004). Muitas espécies extintas na natureza, incluindo várias espécies animais, tais como o condor da Califórnia (*Gymnogyps californianus*) e o cavalo de Przewalski (*Equus przewalskii*), tem sido conservados em cativeiro (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Nos programas de conservação, o principal objetivo da reprodução em cativeiro, do ponto de vista genético, é manter o máximo possível de diversidade genética e minimizar a endogamia, afim de que a população seja demográfica e geneticamente sustentável para suplementar a população na natureza ou reintroduzir indivíduos em áreas onde a espécie já existiu (FRANKHAM *et al.*, 2008). Para isso, é necessário aumentar o tamanho populacional de espécies ameaçadas e evitar oscilações nesse tamanho para minimizar a estocasticidade demográfica, ou seja, a variação nas taxas de nascimento, morte e razão sexual ao acaso (FRANKHAM *et al.*, 2008). O pequeno tamanho populacional acentua também o efeito da estocasticidade

genética como a deriva genética (oscilações aleatórias na frequência dos alelos que tende a diminuir a variabilidade genética), bem como aumenta os níveis de endogamia. Com isso, a diversidade genética é perdida podendo comprometer o potencial evolutivo da espécie. Em cativeiro, é recomendado que as espécies sejam manejadas para reter 90% da diversidade genética da população por 100 anos (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A endogamia refere-se ao cruzamento de indivíduos proximamente relacionados, e a depressão endogâmica, ao *fitness* reduzido da prole desses cruzamentos (HEDRICK & KALINOWSKI, 2000). A depressão endogâmica e o acúmulo de mutações deletérias têm maior efeito em pequenas populações. A endogamia pode afetar todos os aspectos da reprodução e sobrevivência, tais como produção de esperma, maturidade sexual, fecundidade, sobrevivência de adultos e de juvenis (FRANKHAM *et al.*, 2008). A magnitude e os efeitos específicos da depressão endogâmica são variáveis, pois dependem da constituição genética e da interação dos genótipos com o ambiente. O efeito da endogamia tem sido avaliado mais detalhadamente em populações de cativeiro, porém, na natureza, o efeito pode ser maior, já que em cativeiro, as condições são mais controladas (HEDRICK & KALINOWSKI, 2000). Os efeitos combinados do pequeno tamanho populacional, ação da deriva genética e altas taxas de endogamia, combinado com outros fatores, tendem a levar as espécies a entrarem em um vórtice de extinção (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Os estágios de um programa de reprodução em cativeiro podem ser definidos como: 1) fundação de uma população em cativeiro, quando a população ainda é pequena e há esforços para a formação de pares reprodutores; 2) crescimento rápido para um tamanho seguro com manejo; 3) seleção de indivíduos para a reintrodução (FRANKHAM *et al.*, 2008). O número e a identidade dos fundadores são os principais fatores que

determinam o conjunto de genes da população cativa, e devem ter impacto maior na diversidade genética que o tamanho da população de cativeiro (WITZENBERGER & HOCHKIREC, 2011). Porém, o tamanho populacional efetivo, que geralmente é bem menor que o tamanho populacional, é de grande importância para a manutenção da diversidade genética. Para manter a maior parte da diversidade genética que havia na natureza, sugere-se que haja 50 indivíduos em cativeiro, mas são estimados tamanhos populacionais efetivos de 500 a 5000 indivíduos para manter o potencial evolutivo da espécie (FRANKHAM *et al.*, 2008). Porém, não é possível alcançar tais números para todas as espécies.

O manejo genético para evitar ou reduzir a endogamia e a redução na diversidade genética pode ser conflitante com o objetivo de “rápido aumento populacional”, que visa que todos os adultos se reproduzam e não apenas os geneticamente “mais valiosos”. Assim que a população se aproxima do tamanho objetivado, as preocupações genéticas imediatas são reduzir a endogamia, reter diversidade genética e analisar o acúmulo de mutações e a adaptação ao cativeiro (FRANKHAM *et al.*, 2008). É fundamental conhecer as relações de parentesco para minimizar a reprodução entre indivíduos aparentados, evitando ou reduzindo a depressão endogâmica e a perda de diversidade genética (MONTGOMERY *et al.*, 1997).

Atualmente a população em cativeiro de ararinha-azul é composta por 90 indivíduos (Tabela 1). Os objetivos do programa de conservação são aumentar o número de aves e manter populações genética e demograficamente viáveis em cativeiro, além de determinar o grau de parentesco entre elas (ICMBIO, 2011).

Sobre a biologia reprodutiva da espécie, só existem dados de indivíduos de cativeiro, não sendo necessariamente o mesmo para a natureza. A maturidade reprodutiva em cativeiro é alcançada aos quatro ou cinco anos

(ICMBIO, 2012). Existem também informações sobre o último indivíduo de vida livre que formou um par heteroespecífico com uma fêmea de *Primolius maracana* (maracanã) e produziram um híbrido, que não eclodiu (MIYAKI *et al.*, 2001). Araras em geral produzem de um a quatro ovos elípticos e brancos por ninhada/estação reprodutiva. A maioria dessas espécies é monogâmica e possui cuidado biparental (ABRAMSON *et al.*, 1995).

Tabela 1. Instituições mantenedoras e número de indivíduos vivos participantes do programa de conservação do ICMBio.

Instituição/País	Machos	Fêmeas	Não sexados	Total
Al Wabra Wildlife Preservation/ Qatar	27	39	5	71
Loro Parque Fundación/ Espanha	0	1	0	1
NEST/Brasil	2	7	0	9
Association for the Conservation of Threatened Parrots/Alemanha	5	4	0	9
Total	34	51	5	90

O manejo em cativeiro inclui uso de hormônios reprodutivos, enriquecimento ambiental e cuidados veterinários e nutricionais (HAMMER & WATSON, 2012). São realizados vários exames hematológicos (FOUDNAUER *et al.*, 2007). Alguns dos obstáculos da propagação em cativeiro da ararinha-azul são: psitacídeos em geral apresentam comportamento de forte preferência individual por parceiros - o que dificulta a seleção de melhores pares do ponto de vista genético - e há aves fisicamente impossibilitadas de se reproduzir devido a doenças, idade avançada ou comportamento inapropriado para reprodução (ICMBIO, 2011). Outro problema é a baixa fertilidade dos machos (NEUMANN *et al.*, 2013). Cerca de apenas 10% dos embriões eclodiram com sucesso entre 2003 e 2011 e 6% dos ovos apresentaram embriões com deformações em diferentes estágios do

desenvolvimento (HAMMER & WATSON, 2012). Dentre os ovos de ararinha-azul que não eclodiram no mantenedor Al Wabra Wildlife Preservation (Qatar), 45% eram ovos férteis (HEMMINGS *et al.*, 2012). Porém, a quantidade de espermatozoides foi menor que o esperado, indicando também alta taxa de infertilidade. Os altos níveis de endogamia e baixa diversidade genética poderiam estar relacionado à incompatibilidade genética e falha na fertilização (ICMBIO, 2011; HEMMINGS *et al.*, 2012). Recentemente, foi realizada inseminação artificial nas aves mantidas na Alemanha e dois indivíduos nasceram (Cromwell - *studbook keeper*, comunicação pessoal). A reprodução assistida será importante em casos de baixo índice de espermatozoides e problemas comportamentais de acasalamento (NEUMANN *et al.*, 2013).

1.4. Estratégias para o manejo genético em cativeiro

Existem algumas estratégias que permitem minimizar a endogamia e, ou, a redução da diversidade genética. Uma das estratégias de manejo que tem sido muito utilizada é escolher pares para a reprodução que tenham menor parentesco médio. O parentesco médio de um indivíduo é a média dos valores de parentesco desse indivíduo com todos os indivíduos da população, incluindo ele próprio. Indivíduos com menor parentesco médio possuem menos parentes e assim, são valiosos na retenção de diversidade genética geral da população. Geralmente, a reprodução dos indivíduos com menor parentesco médio minimiza o parentesco médio da população (IVY & LACY, 2012) e, assim, maximiza a retenção de diversidade genética (FALCONER & MACKAY, 1996). Além de evitar a endogamia, essa estratégia permite que sejam consideradas as contribuições dos fundadores da população em cativeiro, para que todos tenham descendentes (BALLOU & LACY, 1995).

Geralmente estabelece-se uma classificação de indivíduos machos e fêmeas do menor para o maior parentesco médio individual. Essa lista pode ser estática - mesma lista até determinado número de casais serem formados; dinâmica - recalculada após cada possível acasalamento, supondo que filhotes aumentarão o parentesco médio do casal; classificatória - lista com classificação de indivíduos aparentados (retirada sucessiva de indivíduos mais aparentados e classificação sucessiva até chegar a um grupo de indivíduos que podem produzir indivíduos com menor parentesco médio); ou simultânea - baseando-se mais nos indivíduos que produzem maior prole (IVY & LACY, 2012).

Por outro lado, a endogamia pode ser deliberadamente utilizada para a purificação de alelos deletérios (LACY & BALLOU, 1998). No processo de seleção purificadora, a frequência dos alelos deletérios recessivos diminui, reduzindo a depressão endogâmica futura (FU *et al.*, 1998). Essa estratégia tem sido proposta para a conservação em cativeiro (WANG, 2000). Assim, um possível manejo seria forçar a endogamia para resultar em purificação, mas isso não deve ser aplicado em espécies ameaçadas cujo pequeno tamanho populacional é fator limitante (LEBERG & FIRMIN, 2008).

A estratégia de manter a heterozigose da prole selecionando os indivíduos baseado na proporção de seus locos heterozigotos também é possível de ser adotada (RUIZ-LOPES *et al.*, 2009). Pode-se ainda usar como critério uma estratégia para manter alelos raros e, ou para manter alelos com importância adaptativa tais como os do complexo de histocompatibilidade principal, MHC (HUGUES, 1991). É importante adaptar a estratégia de manejo utilizada para o sistema de acasalamento, tamanho populacional, estrutura social, tempo de geração, dentre outros fatores (WITZENBERG & HOCHKIRCH, 2011). Dependendo da espécie, pode ser importante permitir a escolha individual dos organismos para aumentar o sucesso reprodutivo dos

casais, podendo ter naturalmente um embasamento genético de escolha de “melhores genes” (parceiros mais saudáveis e fortes) e indivíduos com maiores distâncias genéticas (evitando a endogamia), aumentando também o bem estar dos indivíduos (ASA *et al.*, 2011).

Na medida do possível, a ararinha-azul vem sendo manejada baseada nos dados de heredograma e dados moleculares desde 2008 e baseia-se na estratégia de reduzir o parentesco médio da população e evitar casais muito aparentados, respeitando também as escolhas individuais (ICMBIO, 2012).

1.5. Estimadores de Parentesco

As análises de parentesco são importantes em várias áreas da biologia tais como evolução e comportamento (AVISE, 1994). No campo da conservação, essas análises são utilizadas no manejo genético a fim de minimizar acasalamentos entre indivíduos proximamente relacionados para minimizar a perda de diversidade genética e a depressão endogâmica (LYNCH & RITLAND, 1999; WITZENBERG & HOCHKIRCH, 2011).

O grau de parentesco pode ser calculado direto do heredograma (BALLOU & LACY, 1995); ou de dados moleculares, quando os dados do heredograma estão incompletos ou são duvidosos (PEMBERTON, 2004; BOAKES *et al.*, 2007). Os dados moleculares são importantes também quando não se sabe a origem dos fundadores (RUDNICK & LACY, 2008). Os cálculos baseados em heredograma ou no registro genealógico da espécie (*studbook*) assumem que os fundadores não são aparentados, o que nem sempre é real, podendo subestimar o parentesco entre indivíduos caso os fundadores sejam aparentados (BALLOU & LACY, 1995). Análises de parentesco podem se basear em estimativa de um valor de parentesco (*relatedness*) ou em categorias específicas de parentesco. A estimativa de

valor de parentesco baseia-se na probabilidade de dois indivíduos possuírem 2, 1 ou 0 alelos idênticos por descendência. Já categorias de parentesco são relações genealógicas específicas, tais como pais e filhos, irmãos completos, meio irmãos e primos de primeiro grau (BLOUIN *et al.*, 2003).

Existem vários tipos de estimadores de valor de parentesco cuja performance depende do número de alelos, distribuição da frequência alélica, número de marcadores moleculares analisados e composição de parentesco da população em estudo (QUELLER & GOODNIGHT, 1989; RITLAND, 1996; LYNCH & RITLAND 1999; VAN DE CASTEELE ET AL., 2001; WANG, 2002; MILLIGAN, 2003).

1.6. Os microssatélites

Os microssatélites são marcadores moleculares compostos de unidades de repetições em *tandem* de um a seis nucleotídeos encontrados tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos (ZANE *et al.*, 2002). Possuem alto grau de polimorfismo (DAKIN & AVISE, 2004) e, por isso, são muito utilizados em estudos populacionais e análises de parentesco (DAKIN & AVISE, 2004). Além dessas características, esse tipo de marcador molecular é relativamente fácil de amplificar por PCR e possui codominância (SCHLOTTERER, 1998). No entanto, pode haver problemas na utilização de microssatélites, como a presença de alelos nulos (DAKIN E AVISE, 2004; SCHLOTTERER, 1998) e homoplasia (JARNE & LAGODA, 1996). Geralmente, encontram-se em regiões não codificantes, mas por exemplo, em humanos, 8% estão em regiões codificadoras (ELLEGEN, 2000) podendo estar sob seleção.

É possível utilizar *primers* desenvolvidos para espécies filogeneticamente próximas (amplificação cruzada), o que dispensa o

isolamento de microssatélites específicos. Porém, é frequente que a amplificação cruzada pode não ocorrer e os microssatélites amplificados sejam monomórficos e incluam alelos nulos (SELKOEN & TOONEN, 2006). Pode ser necessário então isolar microssatélites para a espécie a ser estudada (ZANE *et al.*, 2002). Em aves, foi constatada menor frequência de microssatélites quando comparada à de outros vertebrados, como mamíferos. Uma das possíveis causas é possuir genoma menor que dos outros grupos (PRIMMER *et al.*, 1997). Publicações com microssatélites ainda são relativamente raras para psitacídeos (PRESTI & WASKO, 2014).

O método tradicional de isolamento de microssatélites inclui a construção de biblioteca genômica enriquecida com esses marcadores, sequenciamento dos clones selecionados e avaliação do nível de polimorfismo de cada microssatélite (SCHLOTTERER, 1998). Tal metodologia é bastante laboriosa e uma alternativa é buscar microssatélites entre sequências de seu genoma. Isso tem se tornado economicamente mais viável a partir do desenvolvimento do sequenciamento de nova geração, reduzindo tempo e custo em relação ao sequenciamento de Sanger (ABDELKRIM *et al.*, 2009). Algumas vantagens são a produção de grande quantidade de dados em apenas uma corrida, baixo custo por base e ausência de necessidade de clonagem (LERNER & FLEISCHER, 2010). Acredita-se que a utilização dessa metodologia irá aumentar em estudos de biodiversidade e, em especial, de aves (LERNER & FLEISCHER, 2010). Os principais problemas do sequenciamento de nova geração são alinhar curtos segmentos de DNA, a necessidade de conhecimentos em bioinformática, e pode se tornar mais caro quando o projeto é pequeno ou tem pequeno tamanho amostral (LERNER & FLEISHER, 2010).

Os estudos de diversidade genética da ararinha-azul realizados por Caparroz e colaboradores (2001) baseados em minissatélites (*DNA*

fingerprinting) indicaram baixa variabilidade genética entre os sete indivíduos analisados, como esperado. A similaridade genética entre pares foi utilizada para recomendar os pareamentos em cativeiro. Os microssatélites, porém, permitem analisar maior quantidade de indivíduos e fazer análises baseadas na frequência dos alelos.

Já Presti e colaboradores (2011) testaram 19 *primers* de microssatélites desenvolvidos para outras espécies de psitacídeos em ararinha-azul. Apenas quatro puderam ser utilizados. Foi confirmado que a diversidade genética encontrada entre os 11 indivíduos analisados foi menor do que a de outras espécies de aves não ameaçadas.

Apesar de os trabalhos já realizados com minissatélites (CAPARROZ *et al.*, 2001) e microssatélites (PRESTI *et al.*, 2011) terem resultado em informações sobre a diversidade genética, similaridade genética e sugerido alguns potencialmente bons pares reprodutivos para a espécie, a identificação de novos microssatélites polimórficos e o aumento do número amostral devem aumentar o poder da análise. Assim, no presente trabalho foram desenvolvidos *primers* para amplificar microssatélites específicos e foram adicionadas amostras de mais indivíduos de ararinha-azul.

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Isolar microssatélites polimórficos específicos de ararinha-azul;
- Calcular os coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos baseados nesses marcadores e em quatro microssatélites heterólogos;
- Inferir o parentesco dos indivíduos fundadores;
- Conferir algumas relações de parentesco do heredograma;
- Indicar casais de ararinhas com menor parentesco a fim de minimizar a endogamia e a perda de diversidade genética;
- Sugerir algumas estratégias de manejo.

3. Material e métodos

3.1. Identificação de microssatélites

A amostra de sangue de um indivíduo (*Studbook* #74, fêmea) preservada em tampão *Queen's Buffer* (SEUTIN *et al.*, 1991) teve o DNA extraído com kit *Dneasy Tissue* (Qiagen) e foi preparada para o sequenciamento de nova geração seguindo as instruções do fabricante (Roche Diagnostics). O pirosequenciamento foi realizado em sequenciador FLX-454 (meia placa) no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, <http://www.lncc.br/frame.html>) em Petrópolis, RJ. A seguir descrevemos de modo resumido o protocolo utilizado. Bibliotecas de DNA de fita simples (ssDNA) foram construídas: 5 µg de DNA genômico foram fragmentados em 300-800 pb por nebulização e adaptadores curtos foram adicionados a cada fragmento. As sequências dos adaptadores ligados às extremidades 5' e 3' eram diferentes e foram adicionados para serem ponto de ancoragem de *primers*. Em seguida, realizou-se a PCR em emulsão gerando fragmentos que foram individualmente sequenciados.

A equipe do LNCC filtrou as sequências obtidas quanto a qualidade, sendo excluídas as com valores de Phred menores que 20, e retirou as sequências dos adaptadores. As análises seguintes contaram com a orientação da Profa. Tatiana T. Torres. Utilizou-se o programa *sff_extract* (http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html) para extrair três arquivos: “.fasta” com as sequências, “.qual” com informações sobre a qualidade de cada base da sequência e “.xml” com informações técnicas sobre as sequências. Para identificar as sequências que continham microssatélites, utilizamos o *script* escrito em *perl*, MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) que identifica microssatélites perfeitos e compostos. Os

critérios de busca por microssatélites com o *script* foram: dinucleotídeos com no mínimo dez repetições, e trinucleotídeos com pelo menos oito repetições e os demais tipos de microssatélites (tetra, penta e hexa) contendo, no mínimo, cinco unidades de repetição. Foi gerada uma tabela com as características dos microssatélites (sequência da unidade de repetição, número de repetições, tamanho das sequências flanqueadoras) desde que a sequência total tivesse mais de 300 pb. Para a etapa seguinte foram selecionados dinucleotídeos e tetranucleotídeos com 10 a 20 unidades de repetição, devido a maior possibilidade de estes possuírem maior variabilidade (GARDNER *et al.*, 2011). Essas sequências foram alinhadas no programa Bioedit 7.1.11 (HALL, 1999) para verificar se não se tratavam de sequências repetidas e foi utilizado o programa Oligo Explorer (KUULASMAA E MUTHUSAMY, 2004) para o desenho dos *primers*. Os critérios para o desenho dos *primers* seguiram várias recomendações de Gardner e colaboradores (2011). Esses critérios foram: tamanho de 20 nucleotídeos, conteúdo GC entre 40 e 60%; dois a três G e C entre as cinco bases na extremidade 3'; diferença máxima de temperatura de *annealing* dos *primers* de 5°C; e menor probabilidade possível de formação de estruturas secundárias entre os *primers*. Evitou-se microssatélites compostos e nanosatélites na região flanqueadora e o *amplicon* deveria ter entre 80 e 250 pb. Além disso, tentamos evitar ao máximo a presença de homopolímeros (repetições de um nucleotídeo) na região flanqueadora que poderiam ter sido gerados erroneamente pelo pirosequenciamento. Foram sintetizados 20 pares de *primers* para microssatélites dinucleotídeos e cinco pares para tetranucleotídeos, pois, em geral, microssatélites com dinucleotídeos são mais polimórficos, mas geram mais *stuttering* que os tetranucleotídeos (GARDNER *et al.*, 2011).

3.2. Genotipagem de microssatélites específicos e heterólogos

No acervo do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo estão depositadas amostras de sangue de 85 espécimes de ararinha-azul do programa de conservação do ICMBio (sendo 18 indivíduos mortos, Tabela 2). Essas amostras estão estocadas em etanol absoluto a -20°C. A extração de DNA total dessas amostras foi realizada utilizando o protocolo padrão de digestão com proteinase K e purificadas com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (BRUFORD *et al.*, 1992).

Para o teste inicial de amplificação dos *primers* para microssatélites específicos, foram utilizadas amostras de 12 indivíduos da espécie, os quais representam toda a diversidade alélica encontrada no trabalho anterior de Flávia Presti (com 77 indivíduos da espécie) e todos indivíduos que vieram da natureza com amostra disponível (Tabela 2). Uma vez confirmado que um determinado microssatélite apresentou polimorfismo, todos os 85 indivíduos foram analisados. Mesmo indivíduos mortos foram genotipados para analisar a diversidade genética da espécie como um todo.

Tabela 2. Indivíduos amostrados, número de registro no *Studbook* e sexo.

#LGEMA	# Studbook	Sexo	#LGEMA	# Studbook	Sexo	#LGEMA	# Studbook	Sexo
4257	o ^a *2	F	10308	59	M	10822	88	M
4259	o ^a *3	M	10815	60	F	10823	89	M
4258	o ^a *5	M	10103	61	F	10259	90	F
4451	o ^a *6	M	10102	62	F	10824	91	F
4130	o ^a *7	F	10125	63	F	10825	92	F
4041	o ^a *10	M	10122	*64	M	10826	93	F
10110	15	M	10816	65	M	10127	94	F
10107	*16	F	10114	66	M	10128	95	F
10118	*17	F	10817	67	F	10260	96	F

Continuação da tabela 2.

#LGEMA	# Studbook	Sexo	#LGEMA	# Studbook	Sexo	#LGEMA	# Studbook	Sexo
4452	*18	F	10108	68	F	16890	109	F
10251	° ^a 20	M	10818	69	M	11939	110	M
10117	°22	F	10123	*70	F	11940	111	F
8776	*26	F	10111	71	F	11941	112	F
10109	°32	M	10819	72	F	11942	113	F
10104	°34	M	9079	73	F	15889	114	F
10248	35	M	9078	°74	F	14168	115	F
10119	*39	F	10250	75	M	14169	116	M
10253	*40	M	9080	° ^a *76	M	14170	*117	M
10115	°43	F	10120	77	F	14171	118	M
8732	44	M	10121	78	M	14172	119	F
8733	45	M	10113	79	M	16891	120	F
10112	46	F	10254	*80	F	15890	127	M
10124	48	F	10820	81	M	15888	130	M
10106	50	F	10307	82	M	15887	131	F
10252	*51	M	10255	83	M	16888	151	M
10309	53	F	10256	*84	F	16889	152	F
10249	54	F	10257	85	F	12824	*embrião	M
10105	55	F	10258	86	F			
10116	57	M	10821	87	F			

° Indivíduos utilizados no teste inicial dos microsatélites. ^a Indivíduos provenientes da natureza. *

Indivíduos que já morreram.

Foram feitas reações em gradiente de temperatura para identificar as melhores temperaturas de hibridação dos *primers* específicos baseando-se na temperatura sugerida pelo programa Oligo-explorer (KUULASMAA & MUTHUSAMY, 2004). As condições de amplificação para os microsatélites específicos que puderam ser amplificados de forma satisfatória foram: volume final de 10,5 µl, dos quais 7,2 µl eram de água Milli Q, 1,2 µl de tampão (10X), 1,0 µl de dNTPs (2mM), 0,4 µl de MgCl₂ (25mM), 0,1 µl do *primer Forward* com uma cauda 5'M13 (5'- CACGACGTTGTAAAACGAC, Boutin-Ganache *et al.*, 2001) (10 µM), 0,2 µl de *primer* M13 (10µM) marcado com fluorescência (FAM, HEX ou TET, Applied Biosystem), 0,3 µl do *primer Reverse* (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5U/ul, Pharmacia) e 1,5 µl de DNA (20-50ng). As reações foram realizadas em termociclador nas

seguintes condições: desnaturação a 95°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, hibridação (temperatura em Resultados, Tabela 4) por 15 seg e extensão a 72°C por 30 seg e, após os 35 ciclos, extensão final a 72°C por 7 min. Depois de amplificados, 1,5 µl dos produtos foram carregados em gel de agarose 2% para verificação de presença e quantidade de produto.

Também foi realizada a genotipagem de amostras de oito indivíduos (*Studbook* #114, 109, 120, 127, 130, 131, 151 e 152) com quatro *primers* heterólogos (CT21, CT32, CT74 e GT55) desenvolvidos para a arara-canindé *Ara ararauna* (Caparroz *et al.*, 2003) para completar o conjunto de dados obtidos no nosso laboratório por Flávia Presti (77 amostras analisadas). As condições de amplificação com *primers* heterólogos, foram: volume final de 10 µl, dos quais eram 7,2 µl de água Milli Q, 1,2 µl de tampão (10X), 1,0 µl de dNTPs (2mM), 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,1 µl do *primer Forward* com uma cauda 5'M13 (5'- CACGACGTTGTAAAACGAC, BOUTINGANACHE *et al.*, 2001) (10 µM), 0,2 µl de *primer* M13 (10µM) marcado com fluorescência (FAM, Applied Biosystem), 0,3 µl do *primer Reverse* (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5U/ul, Pharmacia) e 1 µl de DNA (20-50ng). As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, 20 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, hibridação a 58°C por 40 seg e extensão a 72°C por 40 seg, 20 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, hibridação a 56°C por 40 seg e extensão a 72°C por 40 seg e, por fim, extensão a 72°C por 10 min.

Para todos os microssatélites, aproximadamente 13 µl da mistura de 0,08 µl do marcador molecular Genescan-500 ROX (Applied Biosystem) com 12,92 µl de formamida Hi-Di foram misturados a uma alíquota de 2,0 µl de cada uma das amostras amplificadas diluídas (1:5). Cerca de 4,0 µl dessa mistura foi aplicada em gel de poliacrilamida 7% e analisada em sequenciador

automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystem). O tamanho dos alelos foi verificado com o programa *Genemarker* (www.softgenetics.com).

Erros de genotipagem foram avaliados usando Micro-checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada microssatélite foi feito pela comparação das frequências de heterozigotos esperada e observada no programa Genepop 4.0 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). A presença de desequilíbrio de ligação entre os microssatélites foi testada por meio da criação de tabelas de contingência para todos os pares de microssatélites e cálculo da probabilidade para cada tabela usando a cadeia de Markov com auxílio do programa Genepop 4.0 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). Foi feita a correção de Bonferroni (ZAR, 1999) da seguinte maneira: os valores de P foram ordenados de forma crescente e P deveria ser menor ou igual a $\alpha/(n - i + 1)$ para ser significativo, onde $\alpha = 0,05$ e i = total de testes conduzidos.

O número de alelos por microssatélites e as heterozigosidades esperada e observada (NEI, 1978), a probabilidade de identidade (PAETKAU & STROBECK *et al.*, 1995) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram obtidas usando Cervus 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998).

A probabilidade de identidade genética foi calculada a partir da fórmula:

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

; onde: p_i e p_j são as frequências dos alelos i e j na população.

Foi calculada a probabilidade de exclusão de p

aternidade (Q, WEIR, 1996) utilizando o Coancestry 1.0.1.2 (WANG, 2011), sendo a equação utilizada para calcular a probabilidade de exclusão de paternidade para cada microssatélite a seguinte:

$$PE_n = \sum_{i=1}^n (1 - p_i)^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (p_i p_j)^2 [4 - 3(p_i + p_j)]$$

; onde p_i e p_j são as frequências dos alelos i e j na população.

5.3. Análises de parentesco

A partir da genotipagem dos 85 indivíduos para os microssatélites específicos e heterólogos, foram realizadas as análises de parentesco. Inicialmente foi realizada uma comparação entre os genótipos dos pais e dos filhos, baseado nas relações de parentesco do heredograma (note que está desatualizado; Anexo 1). Se para mais de um microssatélite os genótipos não fossem compatíveis, o parentesco de um ou dos dois parentais, baseado no heredograma, não foi considerado como correto.

O programa Coancestry utiliza sete estimadores para estimar o valor de parentesco entre pares de indivíduos e três estimadores para valores de endogamia e ainda compara a variância de valores obtidos com os diferentes estimadores. Baseado no estimador de parentesco com menor variância, foi calculado o coeficiente de endogamia para cada indivíduo.

Desses sete estimadores, dois utilizam métodos de máxima verossimilhança (TrioML e DyadML) e cinco são de momento (LYNCH, 1988; QUELLER & GOODNIGHT, 1989; RITLAND, 1996; LYNCH & RITLAND 1999; WANG, 2002). Os estimadores calculam e consideram a probabilidade das possíveis configurações de identidade por descendência (do inglês, IBD; Figura 2). Na figura, alelos idênticos por descendência no mesmo indivíduo e entre indivíduos estão ligados por linhas.

Figura 2. Nove configurações de IBD (S1~S9) para dois indivíduos diploides X e Y, com seus alelos correspondentes na horizontal e probabilidades dessas configurações Δ1 a Δ9 (WANG, 2011).

Os cinco estimadores de “momento” (LYNCH, 1988; QUELLER & GOODNIGHT, 1989; RITLAND, 1996; LYNCH & RITLAND, 1999; WANG, 2002) não permitem considerar a presença de endogamia. Assim, não consideram as configurações Δ₁ a Δ₆. Mas calculam Δ₇ a Δ₉ e, em seguida, calculam o índice de parentesco r entre pares de indivíduos (r_{XY}).

Os estimadores baseados em máxima verossimilhança, DyadML (MILLIGAN, 2003) e TrioML (WANG, 2011), permitem considerar presença de endogamia nos cálculos. Assim, é possível estimar: as probabilidades dos coeficientes de IBD baseados nas nove configurações possíveis (Figura 2), os coeficientes de endogamia individuais (F_X e F_Y ; ver a seguir) e o índice de parentesco r_{XY} (ver a seguir; Tabela 3). A diferença entre esses dois estimadores é que o TrioML utiliza um terceiro indivíduo “Z” como controle na estimativa de r_{XY} entre os pares indivíduos (X e Y) em análise, diminuindo a probabilidade de alelos idênticos por estado serem considerados idênticos por descendência. Dessa forma, temos:

$$\sum_{i=1}^9 \Delta_i \equiv 1.$$

; onde Δ_i são as probabilidades de ocorrerem as nove configuração de IBD.

sendo os coeficientes de endogamia:

$$F_X = \sum_{i=1}^4 \Delta_i$$

; onde F_X é o coeficiente de endogamia do indivíduo X e Δ_i são as probabilidades de ocorrerem as quatro configurações de IBD (S1 a S4) que consideram endogamia para esse indivíduo X.

$$F_Y = \Delta_1 + \Delta_2 + \Delta_5 + \Delta_6;$$

onde F_Y é o coeficiente de endogamia do indivíduo Y e $\Delta_1, \Delta_2, \Delta_5$ e Δ_6 são as probabilidades de ocorrerem as respectivas configurações de IBD (S1, S2, S5 e S6) para as quais o indivíduo Y apresenta endogamia.

E o índice de parentesco:

$$r_{XY} = 2\Delta_1 + \Delta_3 + \Delta_5 + \Delta_7 + \frac{1}{2}\Delta_8$$

; onde $\Delta_1, \Delta_3, \Delta_5, \Delta_7$ e Δ_8 são as probabilidade de ocorrerem as respectivas configurações de IBD (S1, S3, S5, S7 e S8) que consideram compartilhamento de alelos por descendência entre os indivíduos X e Y.

Tabela 3. Valor teórico do índice de parentesco r entre os indivíduos X e Y para categorias de parentesco em populações sem e com endogamia (adaptado de Wang, 2011).

Grau de parentesco	r_{XY} sem endogamia	r_{XY} com endogamia
Gêmeos monozigóticos	1	$\frac{1}{2}$
Pais-filhos	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$
Irmãos completos	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$
Meio-irmãos, tios-sobrinhos, avós-netos	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$
Primos de primeiro grau	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$
Não aparentados	0	0

Para os possíveis fundadores e nos casos de pais e filhotes com genótipos incongruentes, as relações de parentesco foram obtidas no programa ML-Relate (KALINOWSKI *et al.*, 2006) que utiliza o DyadML, mas não incorpora a endogamia. Esse programa é útil para discriminar quatro

relações de parentesco comuns: não aparentados, meio-irmãos, irmãos completos e pais/ filhos.

Os dados obtidos foram organizados em tabela contendo todos os machos e fêmeas vivos analisados e seus índices de parentesco r (Anexo 2). Essa tabela foi disponibilizada para o ICMBio, que decide os pareamentos que serão realizados de acordo não somente com os dados genéticos, mas também seguindo recomendações clínicas e comportamentais.

6. Resultados

6.1. Isolamento de microssatélites específicos

Foram analisadas 593.041 sequências (344.793.800 pb) no programa MISA e foram identificados 3.025 microssatélites em 2.688 das sequências, sendo 885 dinucleotídeos, 230 trinucleotídeos, 1156 tetranucleotídeos, 625 pentanucleotídeos e 129 hexanucleotídeos. Baseado nos critérios adotados para desenhar os pares de *primers* (ver “Material de Métodos”), milhares de pares de *primers* poderiam ser desenvolvidos para a espécie. No entanto, foram selecionados 25 pares de *primers* para serem testados quanto ao seu polimorfismo (Tabela 4).

Dos 25 microssatélites testados, 14 apresentaram algum polimorfismo (Tabela 5) e cinco foram monomórficos para os 12 indivíduos. Seis não puderam ser analisados devido à dificuldade de padronização da reação e à amplificação inespecífica ou inexistente. Os microssatélites polimórficos continham, para esses indivíduos, entre dois e quatro alelos.

Tabela 4. *Primers* específicos de ararinha-azul desenvolvidos a partir do sequenciamento parcial do genoma da espécie. Nome do microssatélite (Mic.), sequências dos *primers*, unidade de repetição, temperatura de *annealing* em °C (Ta), fluoróforo utilizado, tamanho do produto em pb (Tamanho) e número de alelos (Na) observados em 12 indivíduos (Spx01, Spx02, Spx04, Spx05, Spx06, Spx08, Spx14, Spx15, Spx16, Spx19, Spx25) e em 85 indivíduos (Spx03, Spx07, Spx09, Spx10, Spx11, Spx12, Spx13, Spx17, Spx18, Spx20, Spx21, Spx22, Spx23, Spx24).

Mic.	<i>Primers</i> (5'-3')	Repetição	Ta	Fluoróforo	Tamanho	Na
Spx01	F: 5'-GCTCACATGGAAGAACTTCC-3' R: 5'-GGTAGTGATCAGACATGTGG-3'	(CA) ₁₈	n.p.	TET	135*	n.i.
Spx02	F: 5'-GATCTTGCAGAAAGGTGTCC-3' R: 5'-GCAATAAGGCTCAGATGTCC-3'	(GA) ₁₁	54°C	FAM	130	1
Spx03	F: 5'-GCTACCAGAATTCTTAGTCC-3' R: 5'-CATAAGCCAGCCTCTAAAGG-3'	(TG) ₁₇	52°C	TET	129-137	4
Spx04	F: 5'-ACCTCCTTCTTGTAAGTACG-3' R: 5'-TCTCCAGAAAGAGGGAAGTG-3'	(TA) ₁₂	n.i.	HEX	125*	n.i.
Spx05	F: 5'-AGACTCCATTAAACACAAGG-3' R: 5'-TAAAGAAATGCATGGTCTGG-3'	(CT) ₁₀	54°C	TET	123	1
Spx06	F: 5'-CCAAGGACATCATAAGACTG-3' R: 5'-TATGACTGGAATATGGATGC-3'	(AC) ₁₈	n.i.	HEX	122*	n.i.
Spx07	F: 5'-TGGCTTTATTTTCACACTGG-3' R: 5'-AAGAGGCCTTTACTCACTAC-3'	(TG) ₁₄	58°C	FAM	124-126	2
Spx08	F: 5'-TAAAGATATTGCCCATGACC-3' R: 5'-CAGCAAAACCAACAGAAACC-3'	(AT) ₁₃	50°C	TET	123	1
Spx09	F: 5'-TCTGTTCAGATCTCCAGCCT-3' R: 5'-TCTCTGACTCAGCTAGCTCA-3'	(AC) ₁₄	56°C	TET	109-115	2
Spx10	F: 5'-TTTCACAGCAGTCATTGAGC-3' R: 5'-CAGGTAAAGCACTCATGGG-3'	(TA) ₁₂	58°C	HEX	118-120	2
Spx11	F: 5'-GATATCCTTGCTGCTCACTG-3' R: 5'-ATTACCGTGCTCAACTTGG-3'	(AC) ₁₇	58°C	HEX	132-144	4
Spx12	F: 5'-AACCCAGGCATGATATTCTG-3' R: 5'-TCAGTGTGAGTGCAGAGTTC-3'	(CA) ₁₃	54°C	FAM	122-124	2
Spx13	F: 5'-AAAAGTACACAGAACACCCT-3' R: 5'-TGTAAGTTGTGTGGATAGTGC-3'	(AC) ₁₀	54°C	FAM	101-103	2
Spx14	F: 5'-GCTGCTTTGAACATGCACAG-3' R: 5'-ACATGGGGTCACCATACATC-3'	(CA) ₁₀	49°C	HEX	124	1
Spx15	F: 5'-ATACGCAGAACAAACCGTCTG-3' R: 5'-TGTAAGTTGTGTGGAGTGTGC-3'	(AC) ₁₁	n.i.	FAM	103*	n.i.
Spx16	F: 5'-GCAACATATGTGTGATGAGG-3' R: 5'-ACCTCGTTCAAACATCTCC-3'	(TG) ₁₀	49°C	HEX	124	1

Continuação da tabela 4.

Mic.	Primers (5'-3')	Repetição	Ta	Fluoróforo	Tamanho	Na
Spx17	F: 5'-TATCTAAGAAGGTCTTGAAC-3' R: 5'-TTAAATTGTGCATTTTGTGC-3'	(AT) ₁₄	50°C	HEX	120-122	2
Spx18	F: 5'-GTGGAGCTGTTGTTTTCTGG-3' R: 5'-CTGTGGGTGTTATACACATG-3'	(GT) ₁₁	52°C	TET	127-129	2
Spx19	F: 5'-TAGTGATCAGACACGTGGGA-3' R: 5'-GGAAGAACTTCCTCCTAAGG-3'	(GT) ₁₆	n.i.	FAM	122*	n.i.
Spx20	F: 5'-GAGGAATATCTTACCCCTTG-3' R: 5'-ACACAGGGTGAGAGAATTGC-3'	(TG) ₁₁	54°C	HEX	116-120	4
Spx21	F: 5'-CAAGTGGAGAAGCAGGACTG-3' R: 5'-AGTCAGTGGAGCAGGACTAG-3'	(ATCC) ₁₇	54°C	TET	154-170	5
Spx22	F: 5'-GGATGCTGTGGGAAAACACG-3' R: 5'-AATGGGTCTTCAGAGGAGGC-3'	(TCCA) ₁₁	58°C	FAM	149-169	4
Spx23	F: 5'-TTAATGTTGGTGGTCTCAGC-3' R: 5'-TTAAGAGTCTCTGTTTAGCC-3'	(ATCT) ₁₉	52°C	TET	192-204	4
Spx24	F: 5'-TTCACCACGCAGCAGAAGTG-3' R: 5'-GGACTCAAAGTACTTCTGGG-3'	(GGAT) ₁₂	56°C	TET	208- 220	4
Spx25	F: 5'-TGGTACCTCAAACAGAAAGC-3' R: 5'-TCCAGCTCAGTGGTTTTTCAG-3'	(AAAT) ₁₄	n.i.	FAM	152*	n.i.

n.i. Não padronizado; *tamanho esperado

6.2. Genotipagem de microssatélites específicos e heterólogos

Pela análise do número de homozigotos esperados e encontrados entre as 85 ararinhas-azuis, foram encontrados indícios de erros de genotipagem (alelos nulos, amplificação preferencial de alelos menores ou erros devido a *stuttering*) para o microssatélite Spx22 e com desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg o Spx22 e Spx13 (após a correção de Bonferroni, $P < 0,05$). O microssatélite Spx13 apresentou também alelos com tamanho menor que o esperado e dificuldades na visualização e determinação dos alelos. Ambos microssatélites foram excluídos das análises seguintes. Cinco microssatélites mostraram-se em desequilíbrio de ligação e foram excluídos (Spx03, Spx09, Spx24, CT74). Restaram, portanto, nove microssatélites específicos e três heterólogos polimórficos.

Tabela 5. Microssatélites polimórficos (Spx) testados em 12 indivíduos representativos da diversidade da espécie. Os tamanhos dos alelos estão em pb.
 #Stb: número do *Studbook*.

# Stb	Spx03	Spx07	Spx09	Spx10	Spx11	Spx12	Spx13	Spx17	Spx18	Spx20	Spx21	Spx22	Spx23	Spx24
2	129 137	124 126	109 109	118 120	136 144	122 124	101 101	120 122	127 129	116 116	170 170	161 161	192 200	212 216
3	133 137	124 126	109 109	118 118	132 144	122 124	101 103	120 122	127 129	118 118	170 170	149 169	192 192	212 216
5	129 129	124 124	115 115	118 118	132 136	122 124	101 103	120 122	127 129	118 118	154 170	149 157	192 200	216 216
6	129 129	124 124	109 115	118 120	132 136	122 122	101 103	120 122	127 129	118 118	166 170	157 161	192 200	208 216
7	129 129	124 124	115 115	118 118	132 132	122 122	101 103	120 122	127 129	118 118	154 166	157 157	200 204	208 216
10	133 133	124 124	109 115	118 120	136 144	122 122	101 103	120 122	127 129	116 118	154 166	157 161	188 192	208 212
20	129 129	124 124	115 115	118 118	132 136	122 122	101 103	120 120	127 127	116 120	166 166	157 161	192 200	216 216
22	129 135	124 124	109 115	118 118	136 136	122 122	101 103	120 120	129 129	116 118	158 170	157 157	192 200	212 216
32	129 135	124 124	109 115	118 120	132 136	122 122	101 103	120 122	127 129	118 120	154 170	161 161	200 204	208 212
34	129 135	124 124	109 109	118 120	132 136	122 122	101 103	120 122	127 129	118 118	154 166	161 161	200 204	208 212
43	133 135	124 124	115 115	118 120	136 136	122 122	101 103	120 120	127 129	116 118	166 170	161 161	192 200	208 208
74	129 135	124 124	115 115	118 118	132 136	122 122	101 103	120 122	127 129	118 118	166 170	157 157	200 200	208 208
76	133133	124 124	109 115	118 120	132 132	122 122	101 101	120 122	127 127	114 116	162 162	161 165	188 192	208 212

O número de alelos para os 85 indivíduos variou de dois a cinco, sendo a riqueza alélica média de 2,49 alelos (Tabela 6). A probabilidade de identidade média foi de 0,00000793 e a heterozigosidade esperada média foi de 0,4330 (Tabela 6). Alguns alelos eram exclusivos dos indivíduos que vieram da natureza (fundadores; Tabela 2), sendo que a maioria morreu sem deixar descendentes (Tabela 7). No caso dos microssatélites Spx07 e Spx12, os únicos indivíduos que possuíam alelos diferentes já morreram e, portanto, no plantel vivo esses microssatélites são monomórficos. Ou seja, documentamos a perda de diversidade genética em cativeiro.

Tabela 6. Número de alelos (Na), heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada microssatélite e média geral para 85 ararinhas-azuis

Microssatélite	Na	Ho	He	PIC
Spx07	2	0,024	0,023	0,023
Spx10	2	0,0624	0,499	0,373
Spx11	4	0,459	0,397	0,334
Spx12	2	0,012	0,012	0,012
Spx17	2	0,612	0,491	0,369
Spx18	2	0,541	0,502	0,375
Spx20	4	0,612	0,589	0,512
Spx21	5	0,788	0,699	0,637
Spx23	4	0,741	0,651	0,577
CT21	5	0,659	0,639	0,564
CT32	2	0,471	0,495	0,371
GT55	2	0,148	0,199	0,178
Média	3	0,427	0,433	0,361

Tabela 7. Alelos raros de indivíduos fundadores que foram perdidos

Microssatélite	Tamanho (pb)	# <i>Studbook</i>
Spx07	126	2 e 3
Spx12	124	2 e 3
Spx11	155	2, 3 e 10
Spx20	114	76
Spx21	162	76
Spx23	188	10 e 76

A probabilidade de exclusão de paternidade baseada nos 12 microssatélites foi razoável: 94,8% quando um dos parentais é conhecido, 79,9% se nenhum parental é conhecido e 99,2% se ambos os parentais são conhecidos. Se os cinco microssatélites em desequilíbrio de ligação (Spx03, Spx09, Spx24, CT74) e os dois que apresentaram desvio no equilíbrio e Hardy-Weinberg (Spx22 e Spx13) são incluídos, as probabilidades de exclusão de paternidade aumentaram: 99,2% quando um dos parentais é conhecido, 92,3% quando nenhum parental é conhecido e 99,96% quando os dois parentais são conhecidos.

6.3. Análises de parentesco

O estimador de parentesco TrioML foi o que apresentou menor variância média (Tabela 8). O valor médio do valor de parentesco baseado nesse estimador foi de 0,19245. Assumindo que $r = 0,5$, 0,25 e 0,125 seriam valores esperados entre pais e filhos ou irmãos completos, meio-irmãos e primos de primeiro grau, respectivamente, essa média é próxima ao valor de primos de primeiro grau ou meio-irmãos. Porém, ao considerar presença de endogamia, os valores de r teóricos passam a ser: 0,5 para gêmeos monozigóticos, 0,25 para irmãos completos ou pais/filhos, 0,125 para meio-irmãos e 0,0625 para primos de primeiro grau (e tios-sobrinhos e avós-netos). Nesse cenário, o parentesco médio das ararinhas-azuis estaria entre meio-irmãos e irmãos completos ou pais/filhos. Esse estimador apresentou alta correlação com o DyadML (Tabela 9). Resultado semelhante foi encontrado considerando os 18 microssatélites e presença de endogamia, com o TrioML apresentando menor variância e valor médio de 0,17261. Quando não foi considerada a endogamia para os 12 microssatélites, o TrioML continuou sendo o estimador com menor variância (0,03880), mas com um valor médio de parentesco menor ($r =$

0,14690) entre primos de primeiro grau e meio-irmãos. Optou-se por considerar o índice r considerando a endogamia devido ao histórico da espécie e pequeno tamanho populacional.

Tabela 8. Média e variância de valor de parentesco entre 85 ararinhas-azuis calculadas com sete estimadores

	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Média	0,19245	0,05961	0,05527	-0,01189	-0,01173	-0,00713	0,21894
Variância	0,05236	0,13580	0,13836	0,08898	0,06254	0,09703	0,06351

Tabela 9. Valores do coeficiente de correlação entre os sete estimadores de parentesco

	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1,00000						
Wang	0,71451	1,00000					
LynchLi	0,72705	0,98852	1,00000				
LynchRd	0,85247	0,77817	0,77919	1,00000			
Ritland	0,61405	0,57172	0,60378	0,72658	1,00000		
QuellerGt	0,81157	0,82212	0,84263	0,91066	0,73146	1,00000	
DyadML	0,97764	0,71579	0,72776	0,85588	0,60779	0,81105	1,00000

De 12 casais de ararinha-azuis que já tiveram filhotes e possuímos o índice de parentesco estimado, apenas quatro eram parentes de primeiro grau. Dentre os 22 casais que estão pareados atualmente, a maioria (14 casais) possui $r = 0$, ou seja, não são proximamente aparentados. Alguns novos potenciais bons casais podem ser formados no futuro quando os indivíduos chegarem à maturidade sexual (exemplo indivíduos #116 e #118; Anexo 2). Também observamos que a maioria dos pares de fundadores deve possuir parentesco de primeiro grau (Tabela 10, Anexo 2).

Tabela 10. Valores de parentesco entre os indivíduos fundadores estudados (F: fêmea; M: macho).

	2F	3M	5M	6M	7F	10M	20M	76M
3M	0,4815							
5M	0,3149	0,5519						
6M	0,0224	0,1997	0,4411					
7F	0	0,0717	0,3885	0,5				
10M	0,1957	0,0714	0	0	0			
20M	0,0642	0,1449	0,2279	0,461	0,2886	0		
76M	0,168	0,0375	0,0402	0	0,1358	0,2167	0,3321	

As relações de parentesco entre possíveis fundadores (Tabela 11) indicam que a maioria dos pares não era aparentada. A maioria das relações de parentesco nas famílias que apresentaram pais e filhotes (relações do heredograma) com genótipos incongruentes indica relações que não são entre pais e filhos (Tabela 12).

Tabela 11. Relação de parentesco entre indivíduos fundadores. U: não aparentados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos-completos; PO: pai/filho

#Studbook	10	2	3	5	6	7	20	76
2	HS	-						
3	HS	FS	-					
5	U	FS	PO	-				
6	U	U	HS	PO	-			
7	U	U	U	HS	PO	-		
20	U	U	U	U	U	U	-	
76	HS	U	U	U	U	U	HS	-

Tabela 12. Relações de parentesco com incongruência entre dados moleculares e heredograma (relações entre parênteses). U: não aparentados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos-completos; PO: pai/filho

#filhote	#15 (pai)	#16 (mãe)	#filhote	#20 (pai)	#17 (mãe)	#filhote	#32 (pai)	#46 (mãe)
*68	U	HS	*50	U	U	*110	FS	U
*69	U	U	*51	U	PO			
*80	U	U	*53	PO	HS			
			*54	U	HS			
			*55	PO	U			
			*59	PO	HS			

O coeficiente de endogamia dos indivíduos variou entre 0 e 0,4765 (Tabela 13). A média do coeficiente de endogamia geral foi $F = 0,085$, e entre os fundadores foi $F = 0,06$. Dos seis fundadores efetivos (que deixaram descendentes; #6, #20, #8, #9, #11 e #12), temos amostras do #6 com $F = 0,0007$ e #20, $F = 0,1189$.

Tabela 13. Coeficiente de endogamia das 85 ararinhas-azuis estudadas (em ordem decrescente)

<i>#Studbook</i>	Coeficiente de Endogamia	<i>#Studbook</i>	Coeficiente de Endogamia
078	0,4765	061	0,0273
113	0,4167	152	0,0264
064	0,4038	017	0,0205
095	0,3613	055	0,0202
087	0,3601	071	0,0202
088	0,3485	026	0,0189
081	0,2625	079	0,0164
076	0,2535	070	0,0134
083	0,2301	007	0,0127
072	0,2243	063	0,0106
086	0,222	016	0,0104
094	0,197	066	0,0103
069	0,1955	060	0,0102
068	0,1936	073	0,0072
084	0,1904	018	0,007
003	0,1553	062	0,0045
085	0,1553	046	0,0043
151	0,1467	114	0,0042
035	0,139	116	0,0041
040	0,1384	096	0,0034
067	0,1335	118	0,0026
074	0,1297	044	0,0012
092	0,1257	065	0,0012
080	0,1195	059	0,001
127	0,1193	006	0,0007
020	0,1189	130	0,0004
110	0,1065	034	0,0002
082	0,0985	010	0
075	0,098	005	0
120	0,0973	015	0
109	0,0947	043	0
089	0,0894	045	0
039	0,067	050	0
077	0,0603	051	0
131	0,047	053	0
00E	0,0422	054	0
002	0,0409	057	0
022	0,0397	090	0
119	0,0367	112	0
091	0,0344	115	0
111	0,0325	117	0
093	0,0292		

A comparação entre o heredograma (Anexo 1) e os genótipos de pais e filhos revelou algumas incongruências. Dezoito filhos tiveram um alelo de um microsatélite não compatível com os genótipos dos pais (*Stb* #15, #57, #81, #82, #85, #91, #95, #109, #111, #113, #116, #117, #119, #127, #130, #131, #151, #152). Consideramos que essas incongruências poderiam ser frutos de erro de genotipagem. Assim, só foi considerado como incongruência se um indivíduo possuísse algum alelo ausente em seus pais para mais de um microsatélite. Dez indivíduos (*Stb* # 68, #69 e #70 da família 3; #50, #51, #53, #54, #55 e #59 da família 4; e #110 da família 5, dados de Flávia Presti; Anexo 3) apresentaram incongruências em dois ou mais microsatélites em relação aos seus pais, segundo o heredograma.

7. Discussão

A estratégia de utilizar o sequenciamento de nova geração (454 FLX Roche) para isolar microsatélites para organismos não-modelos foi publicada pela primeira vez em 2009 (ABDELKRIM *et al.*, 2009). Nesse trabalho o organismo alvo também era uma ave ameaçada, o pato-azul (*Hymenolaimus malacorhynchos*). De acordo com a revisão feita por Gardner e colaboradores (2011) ao analisar o mesmo procedimento para 54 espécies não modelos, o número de sequências obtidas pelo sequenciamento de nova geração variou muito, tendo uma cobertura média de 0,014x, com fragmentos médios de 145 a 379 pb. Mas a utilização de 1/8 a 1/10 de uma placa é suficiente para encontrar microsatélites. O número de microsatélites encontrados varia também de acordo com os critérios utilizados para buscá-los. Por exemplo, se restringir muito o número mínimo e máximo de repetições ou buscar apenas

alguns tipos de microssatélites, o número total de microssatélites encontrados pode ser menor.

Alguns critérios na escolha dos microssatélites aumentam a probabilidade de se encontrar polimorfismo. Alguns fatores que influenciam as taxas de mutação e nível de polimorfismo dos microssatélites são: número de repetições (mais repetições, maior variabilidade até certo número), unidade de repetição, estrutura da repetição (di- e tetranucleotídeos, maior variabilidade), composição de bases, sequências flanqueadoras, dentre outros (FAN & CHU, 2008). As classes de di- e tetranucleotídeos são consideradas as mais polimórficas, mas os dinucleotídeos são, em geral, mais difíceis de serem analisados devido à maior ocorrência de *stuttering* (GARDNER *et al.*, 2011). O rendimento (número de microssatélites polimórficos/testados) não varia tanto entre o método tradicional com a construção de biblioteca enriquecida para o que utiliza sequenciamento de nova geração, mas a última é mais barata e rápida (ABDELKRIM *et al.*, 2009).

Abdelkrim e seus colaboradores (2009) obtiveram 17.215 sequências após o sequenciamento de nova geração. Foram encontrados 73 dinucleotídeos, 107 trinucleotídeos e 51 tetranucleotídeos. Foram testados 24 pares de *primers* e encontrados 13 microssatélites polimórficos (oito di-, quatro tri- e um tetranucleotídeo). A amplitude do número de alelos encontrados foi semelhante ao encontrado aqui para a ararinha-azul, de dois a quatro alelos por microssatélite. Já para uma espécie de ave ameaçada e endêmica da Nova Caledônia, *Rhynochetos jubatus*, com apenas 1/16 da placa de sequenciamento, foram obtidas 52.583 sequências com 349 microssatélites. Dos 30 microssatélites testados, 12 foram polimórficos, com média de 4,2 alelos por microssatélite (STOECKLE *et al.*, 2012). Para uma ave canora, 1.450 tetra-, 989 tri- e 2.625 dinucleotídeos foram encontrados. Dos 37 tetranucleotídeos testados, 24 puderam ser analisados e 10 foram polimórficos

(COWEN *et al.*, 2013). Foi possível também, a partir dessa técnica, isolar microsatélite para uma espécie de ave já extinta, *Pachyornis elephantopus* (ALLENDRAFT *et al.*, 2009).

Há várias questões bem trabalhadas no manejo da ararinha-azul, mas a variabilidade genética limitada é o maior desafio para o futuro da espécie (HAMMER & WATSON, 2012). A perda de alelos dos fundadores que não se reproduziram indica o efeito da deriva genética nessa população. Apesar dessa limitação, existem algumas espécies que também passaram por severos gargalos populacionais com perda de diversidade genética, mas que atualmente, se recuperaram. Por exemplo, o periquito de Maurício (*Psittacula echo*), que após o gargalo chegou a apenas 20 indivíduos e atualmente existem cerca de 500 indivíduos na natureza (RICHARDS *et al.*, 2010). Apesar da baixa diversidade genética da ararinha-azul, os microsatélites foram relativamente informativos (probabilidade de exclusão de paternidade, identidade genética, conteúdo de informação polimórfica) podendo ser utilizados nas análises de parentesco. Os nove microsatélites isolados para a ararinha-azul podem ser testados também para outros psitacídeos, principalmente os filogeneticamente mais próximos.

Woolaver e colaboradores (2013) também tiveram como resultado muitos locos em desequilíbrio de ligação e utilizaram esses dados para as análises de parentesco. Dentre as hipóteses (estruturação genética, hibridização ou deriva em pequenas populações), assumiram que pode ser consequência do pequeno tamanho populacional e da deriva. Isso pode ser válido também para o que foi encontrado para a ararinha-azul, porém, resolvemos não utilizar tais microsatélites por complicar as análises de parentesco e por não haver um método que comporte também desequilíbrio de ligação.

O estimador de parentesco que apresentou menor variância foi o TrioML (Tabela 8) e seus valores apresentaram alta correlação com os do estimador

DyadML (Tabela 9). Esses dois estimadores são, dentre os testados, os únicos que consideram a endogamia nos cálculos. A diferença dos dois é que o DyadML geralmente superestima o parentesco, o que é corrigido pelo TrioML pela comparação da díade com um terceiro indivíduo da população. Outra vantagem desses estimadores é que não são de “momento” e não possuem valores negativos, o que facilita a comparação com valores teóricos. Antes do presente trabalho, as análises de parentesco entre ararinhas-azuis estavam sendo feitas baseadas no índice r descrito por Queller e Goodnight (1989), mas esse mostrou uma variância maior 0,0973 (Tabela 9) e, assim como outros estimadores de momento, pode subestimar o parentesco entre os indivíduos (HENKEL *et al.*, 2012).

O parentesco médio da população de ararinhas-azuis baseado no TrioML ($r = 0,19245$, Tabela 8) foi semelhante ao calculado a partir do heredograma (0,185; Anexo 1; ICMBIO, 2011). Isso indica que, em média, essas aves apresentam parentesco de primos de primeiro grau a irmãos completos ou pais-filhos (considerando valores teóricos de r sob endogamia ou não).

Alguns estudos tem demonstrado que analisar o heredograma considerando também dados moleculares pode melhorar o manejo genético das espécies (HENKEL *et al.*, 2012; MARSDEN *et al.*, 2013). Os problemas das análises isoladas de heredograma são assumir que os fundadores não são aparentados (o que nem sempre ocorre, subestimando as análises de parentesco e superestimando o número de fundadores), o resultado é uma probabilidade esperada de identidade por descendência geral do genoma (que pode ser diferente em algumas regiões do genoma) e sofrer com os efeitos de baixa amostragem. Já os problemas de utilizar apenas marcadores moleculares são efeito da variância no índice r e analisar apenas alguns microssatélites específicos e não o genoma completo. Assim, é importante usar ambos os dados quando possível (HENKEL *et al.*, 2012; MARSDEN *et al.*, 2013).

Os fundadores de uma população de cativeiro são os indivíduos sem informação dos seus ancestrais. São geralmente indivíduos capturados da natureza e assumidos como não aparentados e não endogâmicos (BALLOU, 1983). Caparroz e colaboradores (2001) estimaram a similaridade genética entre alguns poucos pares de ararinhas-azuis, principalmente fundadores, baseado em minissatélites. Os valores observados foram semelhantes aos observados entre irmãos em outras espécies de aves. Considerando a endogamia, nossos dados corroboram essa hipótese.

Segundo Rudnick e Lacy (2008), conhecendo o parentesco dos fundadores é possível evitar que até 2% da diversidade genética se perca e minimizar até 2% de endogamia se os fundadores forem poucos e muito aparentados, e a estratégia utilizada deve ser a de minimizar o parentesco médio da população. Porém, a longo prazo, a determinação do relacionamento entre os fundadores não é tão importante. Para o controle da endogamia, através dessa estratégia, a ancestralidade recente tem mais influência no acúmulo de endogamia do que a ancestralidade mais profunda.

Apesar de o Plano de Ação Nacional para a Conservação da Ararinha-azul considerar que o heredograma está completo, não havia informação sobre o parentesco dos fundadores. Acreditava-se que a fêmea #7 poderia ser mãe de alguns indivíduos que vieram da natureza (fundadores) e que #5 e #6 poderiam ser irmãos (dados do *Studbook*). Nossos dados indicam que ela é proximamente aparentada dos indivíduos #5 e #6 (meio-irmão e pai/filho, respectivamente) e mais distante dos outros indivíduos fundadores. Devido a essa proximidade desses indivíduos, e como #5 não deixou descendentes, apenas o indivíduo #6 deve ser considerado um fundador efetivo.

O *Studbook* da ararinha-azul, assim como qualquer *Studbook*, conta com um *Studbook keeper* certificado e suas informações devem estar corretas. A dificuldade principal era saber o parentesco dos indivíduos provenientes da

natureza. Quanto as incoerências dentro de três famílias (Tabela 14, Anexo 3), pode ter ocorrido algum erro de registro no *Studbook* ou a genotipagem tem erros. O casal #17 e #20 pode não ser os pais dos filhotes #50, #51, #53, #54, #55, #59. Apesar de, segundo o *Studbook*, haver dúvida se #17 é a mãe desses indivíduos, a maioria das incongruências da análise mendeliana foram para a confirmação da paternidade de #20. Por outro lado, nas análises máxima verossimilhança (Tabela 12), o macho #20 obteve mais relações pai/filho do que a fêmea #17. São necessárias, portanto, mais investigações revisando o *Studbook* e repetir as genotipagens.

Algumas aves ameaçadas que ocorrem no Brasil e que possuem programa de reprodução em cativeiro também tem sido manejadas baseando-se em dados genéticos a fim de reduzir a perda de diversidade genética: mutum-do-sudeste *Crax blumenbachii* (DIEGUES, 2011), mutum-de-Alagoas *Pauxi mitu* (Davanço, 2012) e jacutinga *Aburria jacutinga* (OLIVEIRA-JUNIOR, 2012), o que mostra a importância desses estudos para as aves brasileiras.

Apesar de a população estar no estágio de crescimento em taxa maior que a esperada (acrécimo de seis indivíduos/ano) e estar sendo manejada considerando algumas recomendações genéticas, o baixo sucesso reprodutivo com a baixa taxa de eclosão e baixa fertilidade (HAMMER & WATSON, 2012) podem ainda ter relação com a redução na diversidade genética e depressão endogâmica. Assim, dentro do possível, seria importante diminuir a endogamia no plantel de ararinha-azul. A estratégia de minimizar o parentesco médio da população é considerada uma das mais eficientes. Seria interessante avaliar e monitorar como a genética tem ajudado a minimizar a endogamia e a perda de diversidade genética. Os novos casais a serem formados baseados nos valores de parentesco, bem como nas condições clínicas e compatibilidade comportamental poderão contribuir com um maior sucesso reprodutivo. É importante promover a reprodução da maior

quantidade de indivíduos possível ao invés de ter apenas alguns casais com muito filhotes. Aliado a todas essas ações, a inseminação artificial planejada também é muito importante.

8. Conclusões

O presente trabalho permitiu concluir que:

1. O sequenciamento de nova geração é uma técnica que permite o isolamento de microssatélites com sucesso.
2. A ararinha-azul possui baixa diversidade genética.
3. A diversidade alélica da espécie foi perdida devido à perda de alelos raros em indivíduos que não deixaram descendentes.
4. O nível de parentesco médio da espécie é semelhante a de primos ou meio-irmãos.
5. Alguns fundadores são muito aparentados.
6. Alguns potenciais casais com índice de parentesco $r = 0$ podem vir a ser importantes para o programa de reprodução em cativeiro.

9. Referências bibliográficas

Abdelkrim, J.; Robertson, B. C.; Stanton, J. L.; Gemmell, N. J. (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46: 185-192.

Abramson, J.; Speer, B. L.; Thomsen J. B. (eds.) (1995) *The Large Macaws: their Care, Breeding and Conservation*. Raintree Publications, Fort Bragg, California.

Aguiar, J.; Lacher Jr. T. E.; da Silva, J. M. C. (2002) The Caatinga. *In*: Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Robles Gil, P.; Pilgrim, J.; da Fonseca, G. A. B.; Brooks, T.; Konstant, W. R. (ed.). *Wilderness: Earth's Last Wild Places*. CEMEX, Agrupaci on Serra Madre.

Asa, C. S.; Traylor-Holzer, K.; Lacy, R. C. (2011) Can conservation-breeding programmes be improved by incorporating mate choice? *International Zoo Yearbook* 45: 203-212.

Awise, J. C. (1994) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.

Ballou, J (1983) Calculating inbreeding coefficients from pedigrees. *In*: Schonewald-Cox, C. M.; Chambers, S. M.; MacyBryde, B.; Thomas, W. L (eds) *Genetics and Conservation: a Reference for Managing Wild Animals and Plant Population*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park.

Ballou, J. D.; Lacy, R. C. (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigree populations. *In*: Ballou J. D.; Gilpin, M.; Foose, T. J (eds). *Population Management for Survival and Recovery. Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation*. Columbia University Press, New York.

Barnett, M. J.; da Silva, C.; L.; G.; de Araujo, H. F. P.; Roos, A. L.; Machado, C. G.; Uejima, A. M. K.; Naka, L. N. The avifauna of Curaçá (Bahia): the last stronghold of Spix's macaw. *Revista Brasileira de Ornitologia* 22: 121-137.

BirdLife International. (2000) *Threatened Birds of the World*. Lynx Edicions and BirdLife International, Barcelona.

BirdLife International (2014) The BirdLife checklist of the birds of the world: Version 7. Disponível em:

http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/Species/Taxonomy/BirdLife_Checklist_Version_70.zip. Acessado em abril de 2015.

Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 503-511.

Boakes, E. H.; Wang, J. L.; Amos, W. (2007) An investigation of inbreeding depression and purging in captive pedigreed population. *Heredity* 98: 172-182.

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.

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.

Caparroz, R.; Miyaki, C. Y.; Bampi, M. I.; Wajntal, A. (2001) 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.; Miyaki, C. Y.; Baker, A. J. (2003) Characterization of microsatellite loci in the blue-and-gold macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes* 3: 441-443.

CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011) *Listas das Aves do Brasil. 10ª Edição*. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>.

Collar, N., L. Gonzaga, N. Krabbe, L. Naranjo, A. Madroño Nieto. 1992. *Threatened Birds of the Americas*. Smithsonian Institution Press, Washington.

Dakin, E. E.; Avise, J. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504–509.

Davanço, P. V. (2012) *Utilização de Loci de Microssatélites para a Identificação de Híbridos e Manejo Genético de uma Espécie de Ave Brasileira Extinta na Natureza: o Mutum-de-Alagoas Paux mitu (Aves, Cracidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba.

Diegues, S. (2011) *Variação Genética de uma População Cativeira de Mutum-do-Sudeste (Crax blumenbachii, Spix 1825) (Cracidae) como Subsídio para Manejo e Conservação*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos.

Ellegren, H (2000) Heterogeneous mutation process in human microsatellites DNA sequences. *Nature Genetics* 24: 400-402.

Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. (1996) *Introduction to Quantative Genetics*. Longman, Essex.

Fisch, K. M.; Petersen, J. L.; Baerwald, M. R.; Pedroia, J. K.; May, B. (2013) Characterization of 24 microsatellite loci in delta smelt, *Hypomesus transpacificus*, and their cross-species amplification in two other smelt species of the Osmeridae family. *Molecular Ecology Resources* 9: 405–408.

Foudnauer, U; Borjal, R. J.; Deb, A.; Arif, A.; Taha, A. S.; Watson, R. W.; Steiinmetz, H (2007) Hematologic and Plasma Biochemical Values of Spix's Macaws (*Cyanopsitta spixii*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 4: 275-282.

Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. (2008) *Fundamentos de Genética da Conservação*. Editora SBG, Ribeirão Preto.

Fu, Y. B.; Namkoong, G.; Carlson, J. E. (1998) Comparison of breeding strategies for purging inbreeding depression via simulation. *Conservation Biology* 12: 856–864.

Gardner, M. G.; Fitch, A. J.; Bertozzi, T.; Lowe, A. J. (2011) Rise of the machines – recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources* 11: 1093–1101.

Goerck, J. M. (2001) Programa de áreas importantes para a conservação das aves (IBAs) - uma estratégia global da BirdLife International *In.*: Albuquerque, J. L. B.; Cândido Jr., J. F.; Straube, F C; Roos, A. L. *Ornitologia e Conservação: da Ciência às Estratégias*. Editora Unisul, Tubarão.

Hall, T. A. (1999) *BioEdit*: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Hammer, S.; Watson, R. (2012) The challenge of managing Spix's macaws (*Cyanopsitta spixii*) at Qatar - an eleven-year retrospection. *Der Zoologische Garten* 81: 81–95.

Hedrick, P w.; Kalinowski, S. T. (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review Ecology Systems* 31: 139-162.

Hemmings, N.; West, N.; Birkhead, T. R. (2012) Causes of hatching failure in endangered birds. *Biology Letters* 8: 964–967.

Henkel, J. R.; Jones, K. L.; Hereford, S. G.; Savoie, M. L.; Leibo, S. P.; Howard, J. J. (2012) Integrating microsatellite and pedigree analysis to facilitate the captive management of the endangered Mississippi sandhill crane (*Grus canadensis pulla*). *Zoo Biology* 31: 322-335.

Hugues, A. L. (1991) MHC polymorphism and the design of captive breeding programs. *Conservation Biology* 5: 249-251

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2011) *Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Recuperação da Ararinha-azul*. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-ararainhaazul/sumario_ararinha_azul.pdf. Acessado em fevereiro de 2012.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2012). *Plano de Ação Nacional para a Recuperação da Ararinha-azul: Cyanopsitta spixii*. Organizadores Barros *et al.* Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília.

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza (2015). Disponível em: <www.iucnredlists.org>. Acessado em abril de 2015.

Ivy, J. A.; Lacy, R. C. (2012) A comparison of strategies for selecting breeding pairs to maximize genetic diversity retention in managed populations. *Journal of Heredity* 103: 186–196.

Jarne, P.; Lagoda, P. J. L. (1996) Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 2: 424-429.

Juniper, T.; Yamashita, C. (1990) The conservation of Spix's macaw. *Oryx* 24: 224-228.

Kalinowski, S. T.; Wagner, A. P.; Taper, M. L. (2006) ML-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship (2006) *Molecular Ecology Notes* 6: 576–579.

Kuulasmaa, T.; Javed, A. A.; Muthusamy, A. (2004) Oligo Explorer 1.2. Genelink, Hawthorne, New York.

Lacy, R.C.; Ballou, J.D. (1998) Effectiveness of selection in reducing the genetic load in populations of *Peromyscus polionotus* during generations of inbreeding. *Evolution* 52: 900– 909.

Leal, I. R.; Da Silva, J. M. C.; Tabarelli, M.; Lacher Jr. T. E. (2005) Changing the course of biodiversity conservation in the caatinga of northeastern Brazil. *Conservation Biology* 19: 701 706.

Leberg, P. L.; Firmin, B. D. (2008) Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Molecular Ecology* 17: 334–343.

Lerner, H. R. L.; Fleischer, R. C. (2010) Prospects for the use of next-generation sequencing methods in ornithology. *The Auk* 127: 4-15.

Lynch, M. (1988) Estimator of Relatedness by DNA Fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* 5: 584-599.

Lynch, M.; Ritland, K.. (1999) Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753–1766.

Marsden, C. D.; Verberkmoes, H.; Thomas, R.; Wayne, R. K.; Mable, B. K (2013) Pedigrees, MHC and microsatellites: an integrated approach for genetic management of captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Conservation Genetics* 1: 171-183.

Marshall, T. C.; Slate, J.; Kruuk, L. E. B.; Pemberton, J. M (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Milligan, B. G. (2003) Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163: 1153–1167.

Miyaki, C. Y.; Faria, P. J.; Griffiths, R.; Araújo, J. C. C.; Barros, Y. M (2001) The last wild Spix's Macaw and an Illiger's Macaw produced a hybrid. *Conservation Genetics* 2: 53–55, 2001.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2008). *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção*. Biodiversidade 19, Brasília.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2014). *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Portaria N° 444, de 17 de dezembro de 2014.

Montgomery, M. E.; Ballou, J. D.; Nurthen, R. K.; England, P. R.; Briscoe, D. A.; Frankham, R. (1997) Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biology* 16: 377–389.

Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

Neumann D.; Kaleta E. F.; Lierz, M. W. (2013). Semen collection and artificial insemination in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) - a potential model for Psittacines. *Tierarztl Prax* 41:101–105.

Oliveira-Junior, P. R. R. (2012) *Monitoramento Genético da População ex situ de Jacutinga (Aburria jacutinga, Aves, Cracidae) como Subsídio para a Conservação da Espécie*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.

Pemberton, J. (2004) Measuring inbreeding depression in the wild: the old ways are then best. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 613-615.

Pimm, S.; Raven, P.; Peterson, A.; Sekercioglu, C. H.; Ehrlich, P. R. (2006) Human impacts on the rates of recent, present, and future bird extinctions *Proceedings of National Academy of Sciences* 29: 10941–10946.

Presti, F. T.; Oliveira-Marques, A. R.; Caparroz, R.; Biondo, C.; Miyaki C. Y (2011) Comparative analysis of microsatellite variability in five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): Application for conservation. *Genetics and Molecular Biology* 34: 348-352.

Presti, F. T.; Wasko, A. P (2014) A review of microsatellite markers and their application on genetic diversity studies in parrots. *Open Journal of Genetics* 4: 69-77.

Primmer, C. R.; Raudsepp, T.; Chowdhary, B. P.; Moller, A. P.; Ellegren, H. (1997) Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7: 471-482.

Queller, D. C.; Goodnight, K. F. (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.

Queller, D. C.; Strassmann, J. E.; Hugues, C. R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 285-288.

Ralls, K.; Ballou, J. D (2004) Genetic status and management of California condors. *The Condor* 106: 215–228

Raymond, M.; Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Richards, H.; Chowrimootoo, A.; Garrett, M.; Bednarczuk, E.; Smith, D.; Tollington, S.; Skinner, A. (2010) *Management of The Echo Parakeet in The Wild 2009/10*. Mauritian Wildlife Foundation, Vacoas.

Ridgely, R.S. (1981) The current distribution and status of mainland Neotropical parrots. In: Pasquier, R. F. (ed.) *Conservation of New World Parrots*. Smithsonian Institution Press for the International Council for Bird Preservation (Techn. Publ. 1), Washington .

Ritland, K. (1996) Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research* 67: 175–185.

Rudnick, J. A.; Lacy, R. C (2008) The impact of assumptions about founder relationships on effectiveness of the captive breeding strategies. *Conservation Genetics* 9: 1439-1450.

Ruiz-Lopes, M.; Roldan, E. R. S.; Espeso, G.; Gomendio, M. (2009) Pedigrees and microsatellites among endangered ungulates: what do they tell us? *Molecular Ecology* 18: 1352–1364.

Schlotterer, C. (1998) Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology* 8: 132-134.

Sekercioglu, C. H.; Daily, G. C. & Bhrlach, P. R. 2004. Ecosystem consequences of bird declines. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 101: 18042–18047.

Selkoe, K. A.; Toonen, R. J (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.

Seutin, G; White, B. N.; Boag, P. T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.

Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

Silva, T. (1994) Breeding the Spix's macaw *Cyanopsitta spixii* at Loro Parque, Tenerife. *International Zoo Yearbook* 33: 176–180.

Sodhi, N S.; Sekercioglu, C. H.; Barlow, J.; Robinson, S, J. (2011). *Conservation of Tropical Birds*. Wiley-Blackwell, Oxford.

Stoeckle, B. C.; Theuerkauf, J.; Rouys, S.; Gula, R; Lorenzo, A.; Lambert, C.; Kaeser, T.; Kuehn, R. (2012) Identification of polymorphic microsatellite loci for the endangered kagu (*Rhynochetos jubatus*) by high-throughput sequencing. *Journal of Ornithology* 153: 249–253.

Van de Castele, T.; Galbusera, P.; Matthysen, E. (2001) A comparison of microsatellite based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology* 10: 1539–1549.

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

Wang, J. (2000). Effects of population structures and selection strategies on the purging of inbreeding depression due to deleterious mutations. *Genetical Research* 76:75–86.

Wang, J. (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203–1215.

Wang, J. (2011) COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11: 141–145.

Weir, B. S. (1996) *Genetic Data Analysis II – Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Sunderland.

Wright, T. F.; Toft, C. A.; Enkerlin-Hoeflich, E.; Gonzalez-Elizondo, J.; Albornoz, M.; Rodríguez-Ferraro, A.; Rojas-Suárez, F.; Sanz, V.; Trujillo, A.; Beissinger, S. R.; Berovides A., V.; Gálvez A., V.; Brice, A. T.; Joyner, K.; Eberhard, J.; Gilardi, J.; Koenig, S. E.; Stoleson, S.; Martuscelli, P.; Meyers, J. M.; Renton, K.; M. Rodríguez, A. M.; Sosa-Asanza, A. C. (2001) Nest Poaching in Neotropical Parrots. *Conservation Biology*: 3: 710-720.

Windig, J. J.; Kall, L. (2008) An effective rotational mating scheme for inbreeding reduction in captive populations illustrated by the rare sheep breed Kempisch Heideschaap. *Animal* 2: 1733-1741.

Witzenberger, K. A.; Hochkirch, A. (2011) *Ex situ* conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding

programmes for endangered animal species. *Biodiversity Conservation* 20: 1843-1861.

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

Zar, J. H (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Anexo 1. Heredograma dos indivíduos registrados no *Studbook* (ICMBIO, 2012)

Anexo 1. Heredograma das ararinhas-azuis em cativeiro. Compilado por R. Watson, S. B. Jensen e Y. de Soye em 05/2008 (Não está atualizado; alguns indivíduos morreram, outros mudaram de localização e novos nasceram). Legenda: Moldura azul: ave fundadora. Quadrado: macho, Círculo: fêmea. Cinza: morto. Colorido (de acordo com instituições mantenedoras): vivos. Localização atual ou última localização conhecida: AI = Criadouro Arco Iris (Brasil), AW = AWWP (Qatar), BII = Birds International Inc. (Filipinas), CS = Santoli, Häm = Hämmerli (Suíça), Inder = Indermauer, LPF = Fundação Loro Parque (Espanha), LY = Fundação Lymington (Brasil), Mess = Messer (Alemanha), ACTP = Association for the Conservation of Threatened Parrots (Alemanha), Rel = fêmea reintroduzida, SA = Santos Carvalho (Brasil), SPZ = Zoológico de São Paulo (Brasil). Os números com três e quatro dígitos são números de registro das aves na AWWP. Número total de aves registradas: 114 (54.58.2). Informações sobre o *status* das aves *Studbook* #23, 41 e 52 não disponíveis. Publicado em ICMBio (2012).

Anexo 2. Valores do índice r (TrioML, assumindo endogamia) de todos indivíduos vivos estudados. Números do *Studbook* dos machos na horizontal (M, em azul) e das fêmeas na vertical (F, em rosa).

F/M	6	15	20	32	34	35	44	45	57	59	63	65	66	69	75	78	79	81	82	83	88	89	110	116	118	130	151
22	0,5	0,212	0,351	0	0	0,111	0	0,011	0,239	0,51	0	0	0	0,015	0,785	0,35	0	0	0,35	0,607	0	0,057	0,129	0,52	0,078	0,23	0,076
26	0,267	0	0,168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,226	0	0,26	0	0,174	0	0,142	0,159	0	0,523	0,223	0,457	0	0,262
43	0,316	0,274	0,48	0	0	0	0	0	0,477	0,398	0	0	0	0	0,514	0,75	0	0,028	0,53	0,585	0	0	0,547	0,5	0	0,019	0,195
46	0	0,289	0	0,506	0,687	0,444	0,679	0,775	0	0	0,51	0,679	0,689	0,18	0	0	0,555	0,42	0	0	0,674	0,524	0	0,096	0,113	0	0,27
48	0,114	0,146	0,441	0	0,328	0,364	0,247	0,3	0	0	0,269	0,247	0	0,245	0,231	0	0	0,424	0	0,075	0,719	0,08	0,252	0,126	0,668	0	0,656
50	0,27	0,15	0,1	0	0	0	0	0	0,153	0,315	0	0	0	0	0	0,428	0	0,122	0,26	0,357	0,042	0,082	0,36	0,187	0	0	0
53	0,055	0	0,113	0,026	0	0	0,188	0,026	0,868	0,51	0	0,188	0	0	0,317	0,047	0,01	0,474	0,53	0,585	0,273	0	0	0	0,104	0	0
54	0	0,332	0,14	0,054	0,089	0,454	0,119	0,007	0,51	0,379	0,081	0,119	0,147	0	0	0,306	0	0,218	0,21	0,388	0,669	0	0,092	0,052	0,263	0,226	0
55	0,078	0	0,149	0	0	0	0	0	0,592	0,534	0	0	0	0,016	0,544	0,201	0,035	0,06	0,2	0,167	0,517	0,203	0,414	0	0	0	0
60	0	0,1	0	0,559	0,522	0	0,58	0,643	0	0	0,492	0,58	0,78	0	0	0,126	0,582	0,121	0	0	0,669	0,6	0	0,022	0,027	0	0
61	0	0,634	0,328	0	0,507	0,542	0,5	0,516	0,247	0,017	0,246	0,5	0,5	0,04	0,04	0,029	0,176	0	0	0	0,304	0,042	0	0,002	0,208	0	0,6
62	0,101	0,423	0,144	0,5	0,449	0,395	0,644	0,623	0,258	0	0,613	0,644	0,685	0,2	0,21	0,036	0,508	0	0	0	0	0,525	0	0,116	0,006	0	0,112
67	0,529	0,029	0,017	0,426	0,379	0,233	0,425	0,445	0	0	0,16	0,425	0,238	0,732	0,039	0	0	0	0,09	0,102	0	0,327	0,049	0,03	0	0,359	0,193
68	0,628	0	0,204	0,25	0,615	0,679	0,582	0,582	0	0	0,588	0,582	0,241	0,874	0	0	0,091	0,516	0	0	0	0,413	0,236	3E-04	0,295	0,102	0,578
71	0,207	0,165	0	0,571	0,776	0,382	0,51	0,447	0,146	0	0,668	0,51	0,714	0	0	0	0,243	0,507	0,22	0	0	0,313	0,524	0,187	0	0,107	0
72	0	0,6	0	0,574	0,788	0,236	0,605	0,364	0	0	0,6	0,605	0,716	0	0	0,032	0,139	0,633	0	0	0	0,244	0,109	0	0,108	0	0,085
73	0,556	0	0,305	0	0,02	0,447	0	0	0	0	0,045	0	0	0,583	0,069	0,191	0	0,352	0	0,273	0	0	0,328	0,5	0,296	0,069	0,704
74	0,892	0,156	0,413	0,178	0,386	0,282	0	0,403	0,481	0	0,253	0	0,09	0,516	0,487	0,274	0,133	0	0,02	0	0	0,419	0,358	0,337	0,067	0,011	0,383
77	0,059	0,06	0,535	0	0	0	0	0	0,287	0,529	0	0	0	0,227	0,72	0,289	0	0,153	0,57	0,494	0	0	0,21	0,333	0,19	0,117	0
85	0	0,563	0,049	0,093	0,283	0,413	0,603	0,534	0,144	0,5	0,185	0,603	0,532	0	0,357	0,071	0,556	0,301	0,01	0,142	0,78	0,062	0	0,105	0,264	0,469	0
86	0,071	0	0	0,715	0,433	0,288	0,777	0,595	0	0,115	0,596	0,777	0,746	0,072	0	0,298	0,583	0	0	0	0,574	0,436	0	0	0	0	0
87	0	0	0	0,104	0,357	0,037	0,401	0,357	0,042	0	0,027	0,401	0,02	0,273	0,15	0	0	0,449	0	0	0,769	0,103	0,111	0	0,419	0,032	0,328
90	0	0,203	0	0,309	0,245	0,438	0,247	0,294	0,008	0,074	0	0,247	0,118	0,018	0,514	0,182	0,669	0,185	0	0	0,876	0,622	0,214	0	0,006	0,313	0,138
91	0	0,083	0,075	0	0,115	0	0,235	0,333	0,008	0	0	0,235	0	0,3	0,033	0,075	0,137	0,232	0	0,104	0,35	0,239	0,158	0	0,05	0,5	0,534
92	0	0,164	0	0,155	0,065	0,048	0,332	0,065	0	0,545	0,018	0,332	0	0,016	0,23	0,135	0,167	0,053	0	0	11.098	0,215	0,278	0	0,164	0	0

Continuação do anexo 2.

F/M	6	15	20	32	34	35	44	45	57	59	63	65	66	69	75	78	79	81	82	83	88	89	110	116	118	130	151
93	0	0,386	0,085	0,169	0,492	0	0,5	0,504	0,008	0,062	0	0,5	0	0	0,213	0,329	0,611	0	0	0,098	0,966	0,239	0,014	0	0,31	0,118	0,515
94	0	0,285	0,325	0,193	0,308	0	0,58	0,469	0,082	0,057	0	0,58	0,143	0,284	0	0,074	0	0,053	0	0,272	0,589	0	0	0,084	0,529	0	0,272
95	0	0,355	0	0	0,599	0,567	0,553	0,669	0	0,144	0,447	0,553	0,064	0	0,147	0	0,386	0,571	0	0	0,895	0	0	0	0,717	0,049	0,29
96	0,1	0,308	0,517	0,196	0,353	0	0,302	0,341	0,142	0	0,142	0,302	0,28	0	0,057	0,192	0,15	0	0	0,139	0,149	0	0,148	0,302	0	0	0,481
109	0	0,156	0,151	0	0,101	0,088	0	0	0,002	0,085	0,101	0	0,083	0	0,053	0,202	0,076	0,194	0	0,294	0,682	0	0,4	0,079	0,519	0,134	0,426
111	0,251	0	0	1	0,341	0,156	0,317	0,376	0	0	0,306	0,318	0,8	0,255	0,019	0,065	0,254	0	0	0	0,306	0,524	0,356	0	0	0,094	0
112	0	0,438	0,08	0,587	0,79	0,339	1	0,79	0,024	0	0,789	1	0,883	0,302	0	0,049	0,544	0,318	0	0	0,487	0,524	0,029	0,106	0,225	0,101	0,112
113	0	0,302	0	0,721	0,226	0	0,182	0,272	0	0	0	0,182	0,292	0,343	0	0	0,193	0,101	0	0,084	0,283	0,383	0,242	0	0	0,314	0,111
114	0	0,114	0,005	0,5	0,451	0	0,558	0,563	0,204	0,057	0,022	0,558	0,5	0,298	0	0,036	0	0,072	0,09	0,303	0	0,042	0	0	0	0,257	0,178
115	0,313	0,312	0,372	0,052	0	0,122	0	0,051	0,105	0,432	0	0	0	0	0,35	0,557	0	0	0,3	0,019	0	0	0,558	0,327	0	0,119	0
119	0,204	0,246	0,394	0	0,006	0,545	0,027	0,137	0,303	0,298	0,5	0,027	0	0,147	0,767	0,219	0	0,219	0,29	0,27	0	0	0,006	0,603	0,406	0,067	0,059
120	0	0,033	0	0,45	0,533	0,459	0,372	0	0	0	0,533	0,373	0,51	0,074	0	0,19	0,51	0,436	0	0	0,53	0	0,54	0	0,533	0,162	0,113
127	0,15	0,129	0,085	0,113	0	0,204	0	0	0,118	0,416	0	0	0	0,126	0,226	0,01	0	0,537	0,32	0,438	0	0,053	0	0,099	0,42	0,58	0,138
131	0	0,018	0,206	0	0	0,06	0,058	0,058	0	0,64	0	0,058	0	0,112	0,568	0	0,059	0,003	0,62	0,781	0,071	0,062	0	0,174	0,003	0,197	0
152	0,5	0	0,303	0	0,077	0,538	0	0	0	0,086	0,5	0	0	0,571	0	0	0	0,282	0	0,07	0,155	0	0,141	0,024	0,51	0	0,689

Anexo 3. Genótipos de famílias com incongruências em mais de dois microssatélites (alelos com asteriscos) entre os genótipos dos pais e de alguns filhos (P: pai; M: mãe)

Família 3												
#Stb	Spx07	Spx10	Spx11	Spx12	Spx17	Spx18	Spx20	Spx21	Spx23	CT21	CT32	CT74
15 P	124 124	118 120	136 136	122 122	120 120	127 129	116 118	154 166	200 204	261 263	285 287	209 209
16 M	124 124	120 120	132 136	122 122	120 122	127 129	118 120	154 166	200 204	263 263	287 287	209 209
68	124 124	118 120	132 136	122 122	*122 122	127 127	118 118	*166 170	200 204	263 263	*285 285	209 209
69	124 124	*118 118	132 136	122 122	*122 122	127 127	118 120	*166 170	192 204	263 263	*285 285	209 209
80	124 124	*118 118	132 136	122 122	120 122	129 129	118 118	*154 170	204 204	261 263	287 287	209 209
Família 4												
17 M	124 124	118 120	136 136	122 122	120 120	129 129	118 120	154 170	200 204	261 261	285 287	209 209
20 P	124 124	118 118	132 136	122 122	120 120	127 127	116 120	166 166	192 200	257 261	285 285	207 209
43	124 124	118 120	136 136	122 122	120 120	127 129	116 118	166 170	192 200	257 261	285 287	207 209
50	124 124	118 120	136 136	122 122	*120 122	127 129	116 118	*158 170	192 200	*261 263	*287 287	207 209
51	124 124	118 120	136 136	122 122	*120 122	127 129	116 120	166 170	192 200	*261 263	285 287	209 209
53	124 124	118 120	136 136	122 122	*120 122	127 129	118 120	*154 158	192 200	257 261	285 287	209 209
54	124 124	118 120	136 136	122 122	*120 122	127 129	116 120	154 166	192 204	257 261	*287 287	209 209
55	124 124	118 120	136 136	122 122	120 120	*129 129	118 120	166 170	192 200	257 261	*287 287	209 209
Família 5												
32 P	124 124	118 120	132 136	122 122	120 122	127 129	118 120	154 170	200 204	261 263	285 287	209 209
46 M	124 124	120 120	132 136	122 122	122 122	127 129	118 120	154 166	200 204	263 263	287 287	209 209
110	124 124	118 120	136 136	122 122	120 122	127 129	118 118	166 170	200 204	*257 263	287 287	*207207