

Beatriz Nunes de Lyra Raicoski

Análise do sistema reprodutivo de arara-  
canindé (*Ara ararauna*) no município de  
Campo Grande, Mato Grosso do Sul,  
Brasil

Analysis of the reproductive system of  
blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) in  
the city of Campo Grande, Mato Grosso  
do Sul, Brazil

SÃO PAULO

2023

Beatriz Nunes de Lyra Raicoski

Análise do sistema reprodutivo de arara-  
canindé (*Ara ararauna*) no município de  
Campo Grande, Mato Grosso do Sul,  
Brasil

Analysis of the reproductive system of  
blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) in  
the city of Campo Grande, Mato Grosso  
do Sul, Brazil

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de  
mestre em Biologia/ Genética.

Orientadora: Dra. Cristina Yumi  
Miyaki

SÃO PAULO

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Nunes de Lyra Raicoski, Beatriz

Análise do sistema reprodutivo de arara-canindé (*Ara ararauna*) no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 88 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Genética).

1. Sistemas de acasalamento genético. 2. Estratégias reprodutivas. 3. Paternidade extra-par. 4. Parasitismo de ninho intraespecífico. 5. Fidelidade ao ninho.

I. Miyaki, Cristina Yumi, orient. Dra.

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dra. Cristina Yumi Miyaki

Orientadora

## Dedicatória

---

A minha amada tia Sueli (*in memoriam*), que sempre torceu (e acredito que ainda torce) pelo meu sucesso. Aos meus pais e irmã, com todo meu amor e gratidão, sem vocês nada disso seria possível.

“Isso de querer ser  
exatamente aquilo  
que a gente é  
ainda vai  
nos levar além”.

Paulo Leminski  
(Toda Poesia – Incenso fosse música)

## Agradecimentos

---

À *família* - Não vou conseguir agradecer o suficiente aos meus pais, Maurício e Denise, que me apoiaram incondicionalmente durante essa jornada, mas principalmente a minha irmã, Bruna, que além de irmã, foi minha melhor amiga, *roomate* e às vezes patrocinadora. Vocês foram uma parte essencial para que eu chegasse aqui. Amo vocês!

Agradeço aos meus amados tios, Sueli (*in memoriam*) e Enildo, e primo, Guilherme Zandoná, que foram um pedaço da minha família em São Paulo e me receberam assim que eu entrei na pós-graduação, obrigada por tanto.

Aos *amigos* - Camila Freitas, minha *roomate* publicitária que assistia todas as minhas apresentações de artigos de genética. Obrigada pela companhia, amizade, conversas com vinho e por ter me emprestado a sua família, que agora é minha - Tia Rita, Tio Sérgio e Bruno, obrigada por tudo, amo vocês!

À minha amiga de longuíssima data Camila Farago, que além de amiga também é minha professora de inglês 100% gratuita, se não fosse por você eu nem teria começado. Obrigada pelas aulas, amizade e apoio durante esses anos, te amo.

Ao Alessandro Godoy por ser esse amigo tão presente mesmo distante e por todo apoio e colo desses anos.

À Debora, Carol e Maíra, pela amizade e por poder dividir a *rep* com vocês no fim dessa jornada.

Às minhas amigas Camila Ferreira, Catherine Gomes, Glauciele Ribeiro, Mariana Acorse, Maria Luiza e Nádia Ito, por toda a amizade, festas, conversas, apoio, Arcas de Noé, sambas e fofocas. Vocês são demais, amo vocês.

Às minhas amigas *uspianas* Juliana Figueiredo e Juliana Naomi, que estavam sempre presentes para um almoço com desabafo, vocês foram as melhores companhias de almoço, café e volta pra casa.

*Acadêmicos* - À professora Dra. Cristina Miyaki pela oportunidade, orientação, acolhimento, compreensão e ajuda nesses anos!

Aos amigos que dividem ou dividiram o LGEMA: Andressa Nuss, Carla Sardeli, Isabela Munhoz, Paulo Silva Neto, Renata Soares, Lia Kajiki, e especialmente à Rafaela Monteiro que me recebeu no laboratório e ensinou todas as técnicas, obrigada pelo apoio e amizade!

À toda equipe do Instituto Arara Azul, especialmente a Dra. Neiva Guedes e Dra. Larissa Barbosa que me receberam e ensinaram toda a metodologia de campo, além de fornecer valiosas informações desses anos de monitoramento da arara-canindé em Campo Grande. Esse período foi essencial para este trabalho e fez com que eu me apaixonasse (ainda mais) pelo meu projeto e pelo ITA.

À professora Dra. Cibele Biondo pela ajuda com a genotipagem!

À Lucilene Silva, sempre gentil e com uma solução rápida para qualquer problema.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Biociências pela infraestrutura.

Ao CNPq pela bolsa de estudos (processo 130197/2019-0) e apoio financeiro que possibilitou a dedicação integral a esse estudo, e a FAPESP (processo 2013/50297-0) pelo financiamento.

E a todas as mulheres que vieram antes, abriram espaço e conquistaram direitos, os quais exerço hoje, como mulher e cientista, e a todas as que virão depois.

## Resumo

---

Cerca de 90% das espécies de aves já foram consideradas monogâmicas. No entanto, o uso de metodologias moleculares tem revelado que algumas dessas espécies não são geneticamente monogâmicas, com a ocorrência de paternidade extra-par (PEP), em diferentes frequências. Além da paternidade extra-par outras estratégias reprodutivas como parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) e fidelidade ao sítio de nidificação podem ser detectadas por meio de análises de similaridade genética e de parentesco entre pares de potenciais irmãos. Assim, no presente estudo foram utilizados treze pares de *primers* de microssatélites heterólogos para avaliar o parentesco entre filhotes de arara-canindé (*Ara ararauna*) amostrados em Campo Grande, MS, de seis estações reprodutivas. A diferença dos valores médios de coeficiente de parentesco entre pares de filhotes amostrados no mesmo ninho e em ninhos diferentes mostrou forte evidência de diferença de nível de parentesco. Dentre os 133 pares de filhotes do mesmo ninho classificados com relação ao parentesco, foram observados 75,18% de pares de irmãos-completos (83,64% dos ninhos), 18,04% de pares que compartilham apenas um progenitor (9,82% dos ninhos) sugerindo PEP, e 6,76% não-aparentados (4,01% dos ninhos) apontando para possível PNI. Isso indica que a maioria dos casais deve apresentar monogamia genética e cerca de 25% não. Tanto a PEP como o PNI podem ser impulsionadas se houver diferença entre o número de machos e fêmeas disponíveis para reprodução, pois alguns indivíduos podem não encontrar parceiros. Portanto, realizamos sexagem molecular de 437 indivíduos e não encontramos desvio da razão sexual 1:1. Assim, como não há viés na razão sexual, a presença de PEP não pode ser explicada por esse fator. A análise de 371 pares de filhotes amostrados em 57 ninhos ao longo de seis estações reprodutivas (2013 a 2018) possibilitou inferir a reocupação da cavidade pelo mesmo casal em 46,29% dos ninhos amostrados, sendo 72% dos retornos em estações reprodutivas consecutivas. Assim, concluímos que a análise de parentesco revelou frequências de PEP e PNI maiores do que o esperado para espécies de aves socialmente monogâmicas, com grande longevidade e cuidado biparental, e sugere que os benefícios dessas estratégias podem ser maiores do que os custos. Quanto à reocupação dos ninhos pelo mesmo casal, parece que ela pode ser influenciada pela queda ou retirada dos ninhos, que têm apenas sete anos de vida útil, além da proximidade a outros ninhos e competição por cavidades.

## Abstract

---

Approximately 90% of bird species have been considered monogamous. However, the use of molecular methodologies has revealed that some of these species are not genetically monogamous, showing extra-pair paternity (EPP) at different frequencies. Besides extra-pair paternity, other reproductive strategies such as intra-specific nest parasitism (INP) and nest-site fidelity can be detected using genetic similarity and kinship analyses among potential siblings. In this study, thirteen pairs of heterologous microsatellite primers were used to assess the relatedness among chicks of the blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) sampled in Campo Grande, MS, from six breeding seasons. The difference of the mean values of the coefficient of relatedness among pairs of nestlings sampled in the same nest and in different nests showed strong evidence of differing levels of relatedness. Among the 133 pairs of nestlings from the same nest, 75.18% were identified as full siblings (83.64% of the nests), 18.04% were pairs sharing only one parent (9.82% of the nests) suggesting EPP, and 6.76% were unrelated (4.01% of the nests) indicating possible INP. This indicates that most couples exhibit genetic monogamy, while approximately 25% do not. Both EPP and INP can be driven if there is a difference in the number of males and females available for reproduction, because some individuals may fail to find mates. Therefore, we conducted molecular sexing of 437 individuals and found no deviation from the 1:1 sex ratio. Thus, as there is no bias in the sex ratio, the presence of EPP cannot be explained by this factor. The analysis of 371 pairs of nestlings sampled in 57 nests over six breeding seasons (2013 to 2018) allowed us to infer the reoccupation of cavities by the same couple in 46.29% of the nests sampled, with 72% of the returns occurring in consecutive breeding seasons. Therefore, we conclude that the relatedness analysis revealed higher frequencies of EPP and INP than expected for a socially monogamous bird species with high longevity and biparental care, suggesting that the benefits of these strategies may outweigh the costs. Regarding nest reoccupation by the same couple, it seems that it may be influenced by nest fall or removal, as the nests have a lifespan of only seven years, as well as by cavity proximity and competition.

## Lista de figuras

---

- Figura 1.** Quatro indivíduos de *Ara ararauna* (arara-canindé) dentro de um ninho natural em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Três filhotes (olhos escuros) e um adulto no centro, possivelmente a fêmea (olhos claros). Fonte: arquivo Instituto Arara Azul.....06
- Figura 2.** Localização dos 135 ninhos de *Ara ararauna* (pontos vermelhos) analisados no presente estudo na área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (área amarela).....09
- Figura 3.** Metodologia de coleta de amostras. A) Colaborador do Instituto Arara Azul acessando a borda do ninho com escada e peia (cordas); B) Equipe de campo fazendo a contenção do filhote e posicionamento da asa para coleta de sangue; C) Contenção do filhote para fechamento da anilha.....10
- Figura 4.** Representação do padrão de identidade por descendência e da probabilidade de que  $\frac{1}{4}$  dos alelos herdados (*a, b, c e d*) pela prole X e Y sejam IBD aos alelos (*e, f, g ou h*) do mesmo progenitor A ou B.....17
- Figura 5.** Nove configurações de alelos idênticos por descendência (IBD), o par de pontos superior representa os dois alelos do indivíduo X e o par inferior representa os dois alelos do indivíduo Y. Alelos conectados por linhas são IBD.....18
- Figura 6.** Distribuições de valores de parentesco *r* simulados para duas categorias de parentesco: meios-irmãos e irmãos-completos. Notar as áreas de sobreposição das distribuições de valores e os tipos de erros associados.....19
- Figura 7.** Diagrama de fluxo do procedimento usado para classificar pares de filhotes em categorias de parentesco, com base nos genótipos.....23
- Figura 8.** Diagrama de fluxo do procedimento usado para inferir a existência de fidelidade dos casais ao ninho. FS: *full sibs*, irmãos-completos; HS: *half sibs*, meio-irmãos; U: *unrelated*, não-aparentados.....26
- Figura 9.** Percentual de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho que foram categorizados como irmãos-completos (*full siblings*: FS), meio-irmãos (*half siblings*: HS) e não-aparentados (*unrelated*: U) em relação ao número de pares .....31
- Figura 10.** Percentual de pares de filhotes de estações reprodutivas diferentes por ninho analisado classificados como irmãos-completos (*full sibs*: FS), meios-irmãos (*half-sibs*: HS) e não-aparentados (*unrelated*: U), além dos pares que não puderam ser categorizados quanto ao parentesco (não categorizados).....38

**Figura 11.** Percentuais encontrados na análise de fidelidade ao ninho e o número de ninhos entre parênteses. **A.** porcentagem e número de ninhos nos quais foi inferido: nenhum parental retornou e/ou presença PNI (0); um parental retornou e/ou presença de PEP (1/2); o mesmo casal retornou uma (1), duas (2) ou três (3) vezes; **B.** porcentagem de retornos de casais que ocorreram em estações reprodutivas consecutivas e não consecutivas; **C.** porcentagem de retornos em todas ou e em parte das estações reprodutivas amostradas.....43

## Lista de tabelas

---

- Tabela 1.** Número de ninhos e de filhotes de *Ara ararauna* amostrados, sexados (sexad.) e genotipados (genot.)\* em diferentes estações reprodutivas (2012 a 2020) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.....11
- Tabela 2.** Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* heterólogos testados em *Ara ararauna* e desenvolvidos baseados no genoma de *Ara macao* e a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) usada no presente estudo.....13
- Tabela 3.** Coeficientes  $k$  para quatro categorias de parentesco,  $k_0$ ,  $2k_1$  e  $k_2$  são as probabilidades de dois indivíduos compartilharem 0, 1 ou 2 alelos idênticos por descendência de acordo com cada categoria.  $\theta$  representa o coeficiente de consanguinidade.....17
- Tabela 4.** Percentuais de atribuição de uma determinada categoria de parentesco a diferentes categorias de parentesco baseado simulações de valores de parentesco  $r$  para 3.000 pares de genótipos. Em negrito estão as probabilidades percentuais mínimas e máximas esperadas de que cada categoria de parentesco (irmãos-completos, *full siblings*, FS; meio-irmãos, *half siblings*, HS e não aparentados, *unrelated*, U) seja corretamente categorizada.....20
- Tabela 5.** Número de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho e em ninhos diferentes utilizados na análise de parentesco por estação reprodutiva.....20
- Tabela 6.** Ano da primeira reprodução (Ativo desde), ano de perda do ninho (Queda/Remoção) número total de filhotes amostrados e número de pares analisados por ninho em diferentes anos (estações reprodutivas) amostrados.....24
- Tabela 7.** Exemplo hipotético de categorias de parentesco entre pares de filhotes (Indivíduo) de um determinado ninho onde cinco filhotes (A a E) foram amostrados ao longo de três estações reprodutivas (Ano).....27
- Tabela 8.** Número de indivíduos amostrados e sexados por estação reprodutiva.....28
- Tabela 9.** Parâmetros de variabilidade genética da população de *Ara ararauna* em Campo Grande por microsatélite. Para cada loco são apresentados: o número de indivíduos analisados ( $N$ ), o número de alelos ( $N_a$ ), as heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), a probabilidade do teste exato para avaliar desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P_{EHW}$ ), a probabilidade de identidade ( $PI$ ) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).....29
- Tabela 10.** Médias dos valores de coeficiente de parentesco  $r$  entre pares de filhotes ( $r$  médio ninho) amostrados no mesmo ninho (=) e pares de filhos amostrados em ninhos diferentes ( $\neq$ ) em seis estações reprodutivas.  $N$  - número de pares de filhotes analisados, valor da estatística do teste  $t$  e o  $p$ -valor. Para o teste foi utilizado  $\alpha = 0,05$ .....29

**Tabela 11.** Número de pares de filhotes de seis estações reprodutivas amostrados no mesmo ninho (Pares anal.), número de pares que puderam ser atribuídos a alguma categoria de parentesco (pares categ.), número de pares classificados por categoria (FS - *full siblings*, irmãos-completos; HS - *half siblings*, meio-irmãos; U – *unrelated*, não-aparentados), número de ninhos por estação reprodutiva e números de ninhos com evidência de paternidade extra-par (PEP) e parasitismo de ninho intraespecífico (PNI).....30

**Tabela 12.** Estações reprodutivas na quais foram encontradas evidências de paternidade extra-par (PEP) e parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) por ninho. \*entre parênteses se encontra o número de pares de filhotes.....31

**Tabela 13.** Percentual e ano de amostragem de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho mas em estações reprodutivas diferentes categorizados como irmãos-completos (*full sibs*: FS), meios-irmãos (*half-sibs*: HS), não-aparentados (*unrelated*: U) e não categorizados (Nc).....34

**Tabela 14.** Ano de retorno ao ninho do mesmo casal (em estações reprodutivas consecutivas ou não), retorno de um dos parentais (em estações reprodutivas consecutivas ou não) ou paternidade extra-par (PEP), e nenhum parental retornando ao mesmo ninho em estações reprodutivas diferentes. Número de pares de filhotes analisados entre parênteses após a numeração do ninho. Não avaliado- número de pares de filhotes cuja categoria de parentesco não pôde ser inferida.....39

## Lista de apêndices

---

<b>Apêndice 1.</b> Número de filhotes amostrados em cada ninho por estação reprodutiva.....	66
<b>Apêndice 2.</b> Valor médio do coeficiente de parentesco $r$ , seus valores de variância e RMSE ( <i>root mean squared error</i> ) obtidos com cada um dos sete estimadores e o valor obtido dos 3.000 pares de genótipos simulados (Valor esperado).....	69
<b>Apêndice 3.</b> Valores de correlação dos coeficientes de parentesco obtidos por pares de estimadores e de cada estimador com o valor esperado dos 3.000 pares de genótipos simulados.....	69
<b>Apêndice 4.</b> Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2013. <b>Ind 1 e Ind 2:</b> Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; <b><math>r</math>:</b> coeficiente de parentesco; <b>Cat.:</b> categoria de parentesco com maior probabilidade; $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; <b><math>p</math>- value:</b> $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; <b>Agr. familiar:</b> teste de agrupamento familiar.....	70
<b>Apêndice 5.</b> Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2014. <b>Ind 1 e Ind 2:</b> Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; <b><math>r</math>:</b> coeficiente de parentesco; <b>Cat.:</b> categoria de parentesco com maior probabilidade; $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; <b><math>p</math>- value:</b> $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; <b>Agr. familiar:</b> teste de agrupamento familiar.....	71
<b>Apêndice 6.</b> Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2015. <b>Ind 1 e Ind 2:</b> Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; <b><math>r</math>:</b> coeficiente de parentesco; <b>Cat.:</b> categoria de parentesco com maior probabilidade; $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; <b><math>p</math>- value:</b> $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; <b>Agr. familiar:</b> teste de agrupamento familiar.....	72
<b>Apêndice 7.</b> Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2016. <b>Ind 1 e Ind 2:</b> Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; <b><math>r</math>:</b> coeficiente de parentesco; <b>Cat.:</b> categoria de parentesco com maior probabilidade; $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; <b><math>p</math>- value:</b> $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; <b>Agr. familiar:</b> teste de agrupamento familiar.....	73
<b>Apêndice 8.</b> Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2017. <b>Ind 1 e Ind 2:</b> Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; <b><math>r</math>:</b> coeficiente de parentesco; <b>Cat.:</b> categoria de parentesco com maior probabilidade; $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; <b><math>p</math>- value:</b> $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; <b>Agr. familiar:</b> teste de agrupamento familiar.....	75
<b>Apêndice 9.</b> Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2018. <b>Ind 1 e Ind 2:</b> Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; <b><math>r</math>:</b> coeficiente	

de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:**  $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.....76

**Apêndice 10.** Resultados das análises de paternidade para dois pares de progenitor-prole sugeridos pelas observações de campo. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **Ano 1 Ano 2:** Ano em que o indivíduo 1 e 2 foram amostrados; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa e **p-value:**  $p$ -valor associado ao teste de hipóteses.....78

**Apêndice 11.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho mas em diferentes estações reprodutivas de 2013 a 2019. **Ninho:** identificação de campo do ninho onde as amostras foram coletadas; **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **Ano:** dois últimos dígitos do ano de início da estação reprodutiva dos indivíduos 1 e 2 respectivamente; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:**  $p$ -valor associado ao teste de hipóteses.....79

**Apêndice 12.** Resultados das análises de parentesco de três possíveis trocas de ninho sugeridos pelas observações de campo. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **Ninho 1 e Ninho 2:** ninhos onde os indivíduos 1 e 2 foram amostrados com o ano correspondente entre parênteses; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa e **p-value:**  $p$ -valor associado ao teste de hipóteses.....88

## Sumário

---

<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
1.1 Sistemas de acasalamento.....	01
1.1.1 Vantagens e desvantagens das diferentes estratégias reprodutivas.....	03
1.2. Análise de parentesco baseado em microssatélites.....	04
1.3 <i>Ara ararauna</i> ou <i>Arara-canindé</i> .....	06
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>08</b>
<b>3. Material e métodos.....</b>	<b>09</b>
3.1 Área de estudo.....	09
3.2 Procedimento de coleta do material biológico.....	10
3.3 Material biológico.....	10
3.4 Procedimentos laboratoriais.....	11
3.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	11
3.4.2 Sexagem molecular.....	12
3.4.3 Avaliação da razão sexual.....	12
3.4.4 Amplificação dos locos de microssatélites.....	13
3.4.5 Identificação dos genótipos de microssatélites.....	15
3.5 Análise estatística dos dados.....	15
3.5.1 Estimativas dos parâmetros genético-populacionais.....	15
3.5.2 Estimativas de parentesco genético.....	16
3.5.2.1. Análise de parentesco de filhotes do mesmo ninho e mesma estação reprodutiva e de filhotes de diferentes ninhos.....	17
3.5.2.2. Análise de parentesco de filhotes do mesmo ninho em diferentes estações reprodutivas.....	23
<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
4.1 Razão sexual e equilíbrio de Fisher.....	28
4.2 Parâmetros genético-populacionais.....	28

4.3 Parentesco genético de filhotes do mesmo ninho e de ninhos diferentes.....	29
4.4 Parentesco genético de filhotes do mesmo ninho em diferentes estações reprodutivas.....	33
<b>5. Discussão.....</b>	<b>45</b>
5.1 Parentesco genético de filhotes do mesmo ninho e mesma estação reprodutiva e sistema de acasalamento genético: fatores que influenciam na frequência de paternidade extra-par e suas implicações.....	47
5.2 Fidelidade ao ninho: fatores que influenciam e suas implicações.....	52
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>56</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>57</b>
<b>8. Apêndices.....</b>	<b>66</b>

# 1. Introdução

---

## 1.1 Sistemas de acasalamento

O conceito de sistema de acasalamento foi proposto por Trivers (1972) como uma forma de descrever como os indivíduos de espécies e populações se relacionam entre si durante a reprodução. Esses sistemas envolvem diferentes aspectos, como a forma como os indivíduos encontram parceiros, o número de parceiros com os quais interagem ao longo de uma estação reprodutiva, a duração dos relacionamentos reprodutivos e o nível de envolvimento de cada sexo no cuidado dos filhotes (SMITH, 1977; DAVIES, 1991; REYNOLDS, 1996). As aves possuem três principais sistemas de acasalamento: 1) monogâmico, no qual indivíduos de sexos diferentes formam casais e permanecem juntos por toda a estação reprodutiva ou até mesmo por toda a vida; 2) poligâmico, no qual um macho acasala com várias fêmeas (poliginia) ou uma fêmea acasala com vários machos (poliandria) e 3) promíscuo, no qual machos e fêmeas podem acasalar com vários outros indivíduos durante o mesmo período reprodutivo (ALCOCK, 2005). Por muito tempo se acreditou que 90% das espécies de aves eram monogâmicas, com um macho e uma fêmea associando-se para reprodução e criação de filhotes (LACK, 1968). Assim, acreditou-se que as aves socialmente monogâmicas também apresentavam um sistema genético de acasalamento baseado na exclusividade sexual, devido ao vínculo social estabelecido entre machos e fêmeas.

Uma das primeiras evidências de que o comportamento social de acasalamento poderia não corresponder às escolhas sexuais foi baseada na descoberta de paternidade extra-par (PEP), ou seja, a produção de progênie com mais de um parceiro, incluindo indivíduos fora do par social. Essas evidências foram obtidas por meio da análise de caracteres morfológicos (como por exemplo, o tamanho do tarso) que não coincidiam com as expectativas de herdabilidade do par social (ALATALO et al., 1984). Logo, com o avanço do uso de metodologias moleculares no estudo da paternidade, uma pesquisa revelou que, entre 150 espécies de aves de diferentes grupos taxonômicos, a maioria das espécies socialmente monogâmicas apresenta um sistema sexualmente poligâmico (GRIFFITH et al., 2002). As análises moleculares detectaram paternidade extra-par (PEP) em 86% das espécies estudadas, com frequências médias de 11,1% dos descendentes e 18,7% das ninhadas geradas a partir de cópulas fora do par social, mudando completamente o entendimento dos sistemas de acasalamento das aves (GRIFFITH et al., 2002). Essa descoberta destaca a importância das análises genéticas para compreender a verdadeira natureza dos padrões de reprodução. Esses resultados trouxeram implicações significativas para a compreensão dos mecanismos evolutivos da seleção sexual em espécies de aves socialmente monogâmicas.

Foi observado que há grande variação inter e intraespecífica nas frequências de PEP entre famílias e ordens de aves e que isso deve ser relacionado a fatores como história de vida, taxa de mortalidade dos adultos e tipo de cuidado parental (BENNET & OWENS, 2002; GRIFFITH et al., 2002). Enquanto fatores como densidade de ninhos e sincronia reprodutiva parecem explicar variações entre espécies filogeneticamente próximas, entre populações e indivíduos de uma espécie (MOLLER & BIRKHEAD, 1993; STUTCHBURY et al. 1998; PETRIE & KEMPENAERS, 1998).

Na monogamia social, um indivíduo se associa a um único parceiro durante pelo menos uma estação reprodutiva. Já a monogamia sexual se refere à ausência de cópulas com indivíduos fora do seu par social (cópulas extra-par; CEP). Ainda, a monogamia genética se refere à associação de um macho e uma fêmea para reprodução resultando na filiação exclusiva do par reprodutor. É possível haver monogamia social com poligamia genética. Essa última situação refere-se a um macho e uma fêmea procriarem e criarem filhotes juntos, mas alguns ou todos os filhotes no ninho são gerados por indivíduos fora do par social (PEP) como resultado de uma estratégia reprodutiva mista dos pais sociais. Sendo assim, o sistema de acasalamento social e sexual podem ser inferidos por meio de observações comportamentais, mas o padrão genético de acasalamento só pode ser estimado por meio de análises genéticas de parentesco (REICHARD & BOESCH, 2003; REBOREDA et al., 2019).

Além da PEP, o parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) é outra estratégia reprodutiva e que é cada vez mais documentada em aves (LEŽALOVÁ-PIÁLKOVÁ, 2011; SOUZA, et al., 2013; MARTÍNEZ, et al., 2013, MENDONÇA DANTAS et al., 2020; BOLOPO et al., 2020). A PNI se refere à quando uma fêmea coloca seus ovos em ninhos de outras fêmeas da mesma espécie. Esse fenômeno é descrito como parasitário porque a carga energética necessária para o cuidado parental é colocada sobre o hospedeiro (ZINK, 2000; LYON & EADIE, 2008). Esta carga energética é mais pronunciada em aves altriciais nas quais a prole requer cuidados adicionais através da alimentação e incubação (YOMTOV, 2001).

Ainda em relação ao sistema de acasalamento, a monogamia tende a prevalecer quando a chance de encontrar um parceiro e produzir descendentes são distribuídos de maneira uniforme entre os indivíduos e os sexos (TRIVERS, 1972). Dessa forma, o princípio de Fisher (1930) prediz que, em organismos com reprodução sexuada a razão sexual esperada é de 1:1, isso porque metade dos genes é herdada do macho e metade da fêmea, e se considerarmos o agregado de toda uma geração de descendentes vemos que o valor reprodutivo total de machos e fêmeas é igual, porque cada sexo deve fornecer metade da ancestralidade das futuras gerações da espécie. A partir disso, acredita-se que a proporção entre os sexos será ajustada de tal forma que o custo do cuidado parental total dos progenitores em relação aos descendentes de cada sexo deverá seja igual.

Caso o custo incorrido no cuidado dos machos fosse menor que o gasto total incorrido no cuidado das fêmeas, cujos valores reprodutivos são iguais, os casais cujas tendências inatas os leva m a produzir machos em excesso com o mesmo gasto, teriam maior valor reprodutivo (número de descendentes) e, em consequência, seriam os progenitores de uma fração maior nas gerações futuras do que casais cuja tendência é a produção de fêmeas. Aliado a isso, a teoria da alocação sexual prevê que os progenitores devem ajustar seu nível de investimento e cuidado parental com os descendentes em relação aos benefícios de aptidão específicos de cada sexo (FISHER, 1930; TRIVERS, 1972; FRANK, 1990). Usando o exemplo anterior, os progenitores investiriam o cuidado parental sobre os machos, que resultariam em maior valor reprodutivo com menor custo energético e com isso, aumentaria a mortalidade das fêmeas, mas com investimento contínuo das próximas gerações, a proporção de machos e fêmeas chegaria ao equilíbrio (FISHER, 1930).

Para espécies monogâmicas a disparidade na razão sexual entre machos e fêmeas resultaria em indivíduos sem um parceiro, de forma que o sexo raro teria maior sucesso reprodutivo, e os casais que investem o esforço sobre o sexo raro tendem a ser melhor representados no *pool* genético das próximas gerações (FISHER, 1930; TRIVERS, 1972).

### **1.1.1 Vantagens e desvantagens das diferentes estratégias reprodutivas**

Darwin (1871) propôs uma conexão direta entre o sistema de acasalamento e a seleção sexual, sendo a monopolização do parceiro de um sexo sobre o outro o que determina o sistema de acasalamento devido a assimetrias entre os sexos, com evidências de que os traços sexuais regulam as chances dos portadores de deixar descendentes nas próximas gerações. É a maneira como os sexos tentam maximizar seu sucesso reprodutivo e, conseqüentemente, o nível de pressão da seleção sexual, que influencia o sistema de acasalamento.

A compreensão dos sistemas de acasalamento e dos comportamentos associados a cópulas extra-par (CEP) nas aves, têm sido fundamentais para reavaliar o entendimento sobre os mecanismos evolutivos da seleção sexual. Estudos têm explorado os custos e benefícios associados às múltiplas cópulas, tanto para as fêmeas quanto para os machos, e têm esclarecido a influência desses comportamentos na aptidão reprodutiva e na manutenção dos sistemas de acasalamento (EMLEN & ORING, 1977).

Os custos da CEP para as fêmeas incluem o aumento da possibilidade de aquisição de ectoparasitas, infecção por doenças sexualmente transmissíveis (SHELDON, 1993) e até mesmo retaliação do parceiro social (ARNQVIST & KIRKPATRICK, 2005). Ainda, o acasalamento múltiplo pode desencadear competição espermática dentro do trato reprodutivo da fêmea, o que pode resultar em monogamia genética, mesmo sem monogamia sexual (FORSTMEIER et al., 2014). Por outro lado, pode haver mecanismos de controle da paternidade no trato reprodutivo da fêmea, o que permitiria a escolha de parceiros reprodutivos de melhor qualidade e que poderiam aumentar a atratividade ou qualidade dos filhotes através da herança de "bons genes" (hipótese Fisher-Zahavi, ESHEL et al., 2000; GRIFFITH, 2002; ARNQVIST & KIRKPATRICK, 2005). Os machos que buscam cópulas extra-par também enfrentam riscos, como a depleção de esperma, a aquisição de doenças e a retaliação das fêmeas, e a principal vantagem é o aumento do sucesso reprodutivo (SHELDON, 1993; PETRIE & KEMPENAERS, 1998).

Outra possibilidade é que, copulando com machos geneticamente mais atrativos e compatíveis do que o seu parceiro social, ela encontra uma alternativa à sua escolha por um parceiro de pior qualidade (GOWATY, 1996; NEFF & PITCHER, 2005). Adicionalmente, as fêmeas podem se beneficiar de cópulas com múltiplos parceiros pela expansão da sua área de forrageio e/ou por receber mais auxílio na defesa do ninho e no cuidado parental com a ajuda adicional pelo macho extra-par (BURKE et al., 1989; BIRKHEAD & MØLLER, 1993; BIRKHEAD, 1998).

Do ponto de vista da fêmea que pode praticar parasitismo de ninho intraespecífico (PNI), além dessa estratégia reprodutiva, ela pode não reproduzir-se, nidificar ou nidificar e parasitar (LYON & EADIE, 2008). Essas estratégias estão relacionadas à disponibilidade de recursos e ao esforço reprodutivo por parte das fêmeas parasitas, formando um espectro que varia desde a ausência de reprodução ao outro extremo, só parasitar (LYON & EADIE, 2008). Além do evidente benefício para a fêmea parasita e o custo para a fêmea hospedeira, estudos sugerem que também pode haver um benefício potencial para a fêmea hospedeira. Há evidências de aumento da taxa de eclosão em algumas espécies nas quais o aumento do tamanho da ninhada com a adição dos ovos da fêmea parasita, sem exceder o limite intermediário do tamanho da ninhada, aumenta o sucesso de eclosão tanto dos ovos do hospedeiro quanto dos ovos do parasita (LYON, 1998; ANDERSSON, 2017). Ainda, o PNI deve ser mantido devido a um possível baixo custo para a fêmea hospedeira (principalmente em espécies com baixo cuidado parental) e/ou algum mecanismo que considere o parentesco próximo entre o hospedeiro e os parasitas, ou seja, se o parasitismo for realizado por indivíduos aparentados (SEPULCRE & KOKKO, 2002; RYMESOVA et al., 2017) ou pela propensão a fidelidade ao local de nidificação, dessa forma, se as fêmeas parasitas tendem a nidificar no mesmo local entre estações reprodutivas, naturalmente poderá haver certo agrupamento social de parentesco (ANDERSSON & ERIKSSON, 1982; ANDERSSON, 2017).

## **1.2. Análise de parentesco baseado em microssatélites**

Os marcadores moleculares do tipo microssatélite ou *Short Tandem Repeats* (STR) são segmentos em *tandem* de um a seis nucleotídeos com cerca de 100 pb de comprimento total (SCHLOTTERER, 1998; CHAMBERS & MACAVOY, 2000). Sua ampla utilização se deve às altas taxas de mutação observadas e do padrão de herança biparental e codominante que permite a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (SCHLOTTERER, 1998). São essas características que tornam os microssatélites uma ferramenta quase perfeita na identificação das relações genéticas entre indivíduos e entre populações (SCRIBNER & PEARCE, 2000). Sua descoberta (TAUTZ, 1989) levou a uma ampla revisão das análises de parentesco, em grande parte, por conta de sua hipervariabilidade (AVISE, 2004). As análises de parentesco, baseadas em microssatélites, podem ser realizadas de seis maneiras:

1. Exclusão de parentesco: a análise parte da comparação dos genótipos da prole e possível progenitor. Assim, marcadores com herança mendeliana de progenitor e prole diploides devem compartilhar ao menos um alelo por loco, caso em dois ou mais locos não haja compartilhamento de alelos, não deve ser progenitor (CHAKRABORTY et al. 1974). Algumas limitações do método incluem mutações (originando um alelo que não está presente no progenitor), além de alelos nulos (resultando em progenitor detectado como homozigotos em diferentes alelos; CALLEN et al., 1993).

2. Alocação categórica: requer o genótipo da prole e do conjunto de possíveis progenitores para avaliar o mais provável, ou seja, diferentes conjuntos de potenciais genótipos parentais podem diferir na probabilidade de produzir o genótipo observado na prole (MEAGHER & THOMPSON, 1986).

3. Alocação fracionária: difere da alocação categórica pois não atribui toda a prole ao progenitor mais provável, mas sim uma fração da prole ao progenitor mais provável que não pode ser excluído, com base na probabilidade relativa de produzir o genótipo da prole (HADFIELD et al. 2006). Neste método, um progenitor pode ser atribuído a número não inteiro de filhos (por exemplo, 75% da ninhada, se for uma ninhada de 2 filhotes, corresponderia a 1,5 filhotes), apesar de obviamente, cada progenitor deixar um número inteiro de descendentes (no caso do exemplo anterior, 1 ou 2). Apesar de permitir considerar frações, comparado aos demais métodos, este possui melhores propriedades estatísticas para muitos problemas que envolvem a estimativa de variáveis a nível populacional, como por exemplo variações no sucesso reprodutivo (NIELSEN et al., 2001).

4. Probabilidade total: essa análise parte do princípio que a análise de parentesco é uma ferramenta para inferir um processo em nível populacional, estimando os parâmetros de interesse ao nível populacional simultaneamente às relações progenitor-prole em uma única modelagem (NIELSEN et al., 2001; HADFIELD et al., 2006). A principal limitação é que o modelo pode exigir suposições não documentadas sobre as relações entre variáveis específicas e o sucesso do acasalamento, se as suposições feitas estiverem incorretas, a atribuição de parentesco pode ser comprometida (HADFIELD et al., 2006).

5. Reconstrução parental: é baseada no conhecimento prévio de que grupos de indivíduos tem a mesma origem familiar, ou seja, os mesmos progenitores. Quando a categoria de parentesco da prole é bem estabelecida, os genótipos parentais podem ser reconstruídos a partir do genótipo da prole (DEWOODY et al., 2000). Se um dos progenitores for conhecido, o genótipo do progenitor desconhecido é determinado através da subtração dos alelos do progenitor conhecido do genótipo da prole (JONES, 2003).

6. Reconstrução de irmãos: é utilizada quando um grupo de descendentes pode ser coletado na população, mas os grupos familiares não são conhecidos, mesmo que haja indícios de irmãos-completos e meio-irmãos (ASHLEY et al., 2008). A reconstrução de irmãos pode ser feita sem implicar a reconstrução da estrutura genealógica completa, através da similaridade genotípica e/ou abordagens de probabilidade que classificam pares de indivíduos em diferentes categorias de parentesco com base nas informações do marcador (BUTLER et al., 2004).

O parentesco genético desempenha um papel crucial na compreensão dos comportamentos e dos processos evolutivos em espécies sociais e estimá-lo permite inferir informações sobre biologia reprodutiva (JONES et al., 2010). A depender da natureza da amostra, com os possíveis progenitores ou apenas a prole, diferentes estimativas podem ser feitas (JONES et al., 2010). Essas estimativas são, por exemplo, usadas para responder perguntas relacionadas ao reconhecimento entre parentes, sistemas de acasalamento e procurar evidências de acasalamentos múltiplos dentro dos grupos familiares (AVISE, 2004). Essas inferências nos concedem dados valiosos para compreender o sistema

reprodutivo de diferentes organismos, sistema de acasalamento genético e as possíveis estratégias reprodutivas como paternidade extra-par e parasitismo de ninho intraespecífico (JONES et al., 2010).

### 1.3 *Ara ararauna* ou Arara-canindé

A espécie *Ara ararauna*, pertence à ordem Psittaciformes, família Psittacidae, é popularmente conhecida como arara canindé, arara de barriga amarela ou arara azul e amarela devido à coloração azul na parte superior do corpo e amarelas nas partes inferiores; na garganta as penas são negras e na frente são verdes, na face branca há fileiras de penas negras (SICK, 1997; Fig. 1). Os indivíduos medem entre 81 e 86 cm da cabeça à ponta da cauda e podem pesar até 1380 g (COLLAR et al., 2019). A espécie apresenta a distribuição geográfica mais ampla entre as espécies de psitacídeos do continente americano, ocorrendo em várzeas e matas ciliares com palmeirais de buriti, babaçu e de outras espécies de palmeiras desde o leste do Panamá, passando pelo sul da Colômbia, leste do Equador, norte do Peru, por quase toda região norte do Brasil, chegando até os estados de São Paulo e do Rio de Janeiro (FORSHAW, 1989). Atualmente encontra-se extinta na Ilha de Trinidad, Tobago e até mesmo praticamente extinta em algumas regiões do Brasil (ex. no estado de São Paulo; SÃO PAULO, 1998; BERGALLO et al., 1999; COLLAR et al., 2019).



**Figura 1.** Quatro indivíduos de *Ara ararauna* (arara-canindé) dentro de um ninho natural em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Três filhotes (olhos escuros) e um adulto no centro, possivelmente a fêmea (olhos claros). Fonte: arquivo Instituto Arara Azul.

É considerada generalista, alimenta-se em grande parte de frutos de palmeiras, sementes, folhas, brotos, flores e néctar de diversas espécies da flora silvestre e exótica (MONTAÑO et al., 2009; GUEDES, 2012). Os indivíduos podem ser encontrados solitários, em casais ou em famílias, poucas vezes são encontradas em grandes grupos (SICK, 1997).

Em Campo Grande, capital de Mato Grosso do Sul, a arara-canindé vem sendo avistada desde o final da década de 1999, após queimadas e desmatamentos nas áreas próximas à cidade e se estabeleceu devido à vegetação diversificada na cidade que fornece alimento e locais para reprodução (MONTAÑO et al., 2009; GUEDES, 2012; BARBOSA et al., 2015). Desde 2009 a espécie tem sido objeto de estudo na região. Inicialmente, foram analisados os comportamentos alimentares e reprodutivos. Em 2012, o Projeto Aves Urbanas - Araras da Cidade foi estabelecido com o objetivo de investigar a biologia da espécie e suas interações com o ambiente urbano (BARBOSA et al., 2012).

Na natureza nidificam exclusivamente em ocos localizados no tronco principal de palmeiras mortas (FORSHAW, 1989). Na área urbana de Campo Grande utilizam cinco espécies de palmeiras para nidificar: babaçu (*Attalea speciosa*), bocaiúva (*Acrocomia aculeata*), buriti (*Mauritia flexuosa*), palmeira-rabo-de-peixe (*Caryota urens*) e palmeira-imperial (*Roystonea oleracea*; BARBOSA; 2018). Ainda em Campo Grande, reproduz-se anualmente, entre junho e março com pico de posturas em agosto, nascimentos em setembro e primeiro voo dos juvenis em dezembro (BARBOSA, 2018). Colocam de um a oito ovos, com média  $2,9 \pm 0,8$  ovos/casal, com período de incubação de aproximadamente 26 dias (BIANCHI & MACEDO, 1998; GUEDES, 2012). Os juvenis costumam deixar os ninhos para o primeiro voo com idade entre 77 a 85 dias, podem permanecer junto aos pais por cerca de um ano, quando atingem a idade adulta (GUEDES, 2012; PEREIRA et al., 2012).

*A. ararauna* é considerada socialmente monogâmica e possui características como grande longevidade e alto investimento parental por parte do macho, o que favorece a manutenção da monogamia social e genética (BIANCHI & MACEDO, 1998; MASELLO & QUILLFELDT, 2002). No entanto, um único estudo revelou que um dos onze pares de filhotes de arara-canindé amostrados no mesmo ninho apresentou índices de similaridade genética abaixo do esperado entre irmãos. Esse estudo se baseou na análise de um minissatélite multilocus e indicou que pelo menos 9% dos pares de filhotes pode ser resultado de PNI ou PEP (CAPARROZ et al., 2011). Ainda, um estudo sobre a razão sexual de uma população de arara-canindé no Parque Nacional das Emas, estado de Goiás, não encontrou desvio da proporção de 1:1 de machos e fêmeas (CAPARROZ et al., 2001), como esperado segundo o princípio de Fisher. Assim, como o número amostral desses estudos com *A. ararauna* é relativamente baixo (31 aves de 4 localidades), o presente estudo propõe caracterizar as relações de parentesco entre filhotes de *Ara ararauna*, em diferentes estações reprodutivas consecutivas no município de Campo Grande, onde a população de *A. ararauna* vem sendo estudada desde 2009, com monitoramento constante dos ninhos e filhotes, aliando dados observacionais às análises genéticas.

## 2. Objetivos

---

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar o sistema reprodutivo de *Ara ararauna* em Campo Grande, MS, baseado em dados obtidos da análise de filhotes.

Os objetivos específicos foram:

- ❖ Estimar a frequência (caso ocorra) de paternidade extra-par (PEP);
- ❖ Estimar a frequência (caso ocorra) de parasitismo de ninho intraespecífico (PNI);
- ❖ Estimar a frequência (caso ocorra) de fidelidade dos casais ao sítio de nidificação;
- ❖ Investigar se o princípio de Fisher (razão sexual de 1:1) é refutado em filhotes.

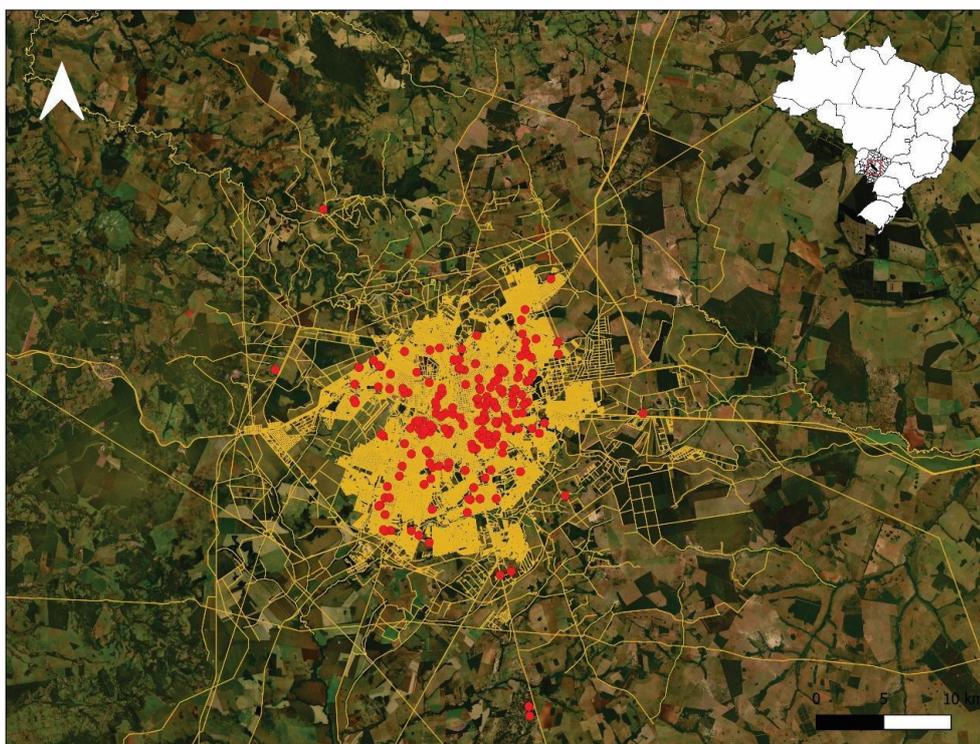
### 3. Material e métodos

---

#### 3.1 Área de estudo

A coleta foi conduzida na área urbana de Campo Grande, capital do Estado do Mato Grosso do Sul, localizada na mesorregião Centro-Norte do Estado e na região Centro-Oeste do Brasil. As coordenadas geográficas dos 135 ninhos de *A. ararauna* (dados do Instituto Arara-azul) onde as 443 amostras de sangue foram coletadas foram plotados em um mapa utilizando o QGIS versão 3.28 ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)), o *shapefile* do município de Campo Grande (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE) e a sobreposição da malha urbana (camada OSM; *OpenStreetMap Data*; <http://ww12.openstreetmapdata.com/>; Fig. 2). Segundo dados do IBGE, a área da unidade territorial apresenta 8.082,978 km<sup>2</sup> (dados de 2022) e a área urbanizada corresponde a 252,63 km<sup>2</sup> (dados de 2019). O censo mais recente de 2022 indica que o município possui 897.938 habitantes, com densidade demográfica de 111,09 habitantes/km<sup>2</sup>.

Campo Grande é arborizada com cerca de 160 espécies e 74 m<sup>2</sup> de área verde por habitante (SEMADUR, 2010). Segundo os dados do IBGE (2010), a cidade apresenta 96.3% de domicílios urbanos em vias públicas com arborização. Além disso, possui diversos parques, reservas e áreas de preservação, totalizando mais de 600 hectares de vegetação, sendo uma das capitais com maior conjunto de área verde pelo total de área do Brasil (SEMADUR, 2010; PLANURB, 2017).



**Figura 2.** Localização dos 135 ninhos de *Ara ararauna* (pontos vermelhos) analisados no presente estudo na área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (área amarela). Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2 Procedimento de coleta do material biológico

As amostras de *Ara ararauna* foram coletadas pelo Projeto Aves Urbanas – Araras na Cidade, do Instituto Arara Azul, na área urbana de Campo Grande (Fig. 2). O acesso aos ninhos foi realizado com escada ou peia (cordas) amarrada ao redor da palmeira e alguns equipamentos de rape (Fig. 3A).

A coleta de material biológico foi realizada com licença das autoridades ambientais brasileiras (IBAMA). Os filhotes foram recolhidos manualmente e colocados em sacos especiais confeccionados com tecido claro, colocados em baldes fundos e descidos utilizando corda, roldana e mosquetões até o pesquisador que se encontrava no solo para a coleta de cerca de 0,1 ml de sangue da veia braquial da asa com seringa descartável (Fig. 3B) e preservação em etanol absoluto. Os filhotes foram anilhados (anilha aberta de inox; Fig. 3C) e um *microchip* foi inserido na musculatura peitoral com a finalidade de marcar os indivíduos. Assim que a coleta de amostra foi finalizada, o filhote foi devolvido ao seu ninho

No momento da coleta, os filhotes tinham aproximadamente 60 dias, nessa idade os filhotes ainda não se deslocam para fora do ninho, garantindo que aqueles encontrados dentro de um ninho, certamente pertenciam ao mesmo. As amostras de sangue estão estocadas no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (em etanol absoluto a -20°C).



**Figura 3.** Metodologia de coleta de amostras. A) Colaborador do Instituto Arara Azul acessando a borda do ninho com escada e peia (cordas); B) Equipe de campo fazendo a contenção do filhote e posicionamento da asa para coleta de sangue; C) Contenção do filhote para fechamento da anilha. Fonte fotos B e C: Everson Freitas (Instituto Arara Azul).

### 3.3 Material biológico

Análises de parentesco aplicadas ao estudo de sistemas reprodutivos comumente utilizam amostras de possíveis progenitores e seus filhotes (NEFF et al., 2008; JONES et al., 2010). No presente estudo, as relações de parentesco foram inferidas somente entre filhotes, em razão da dificuldade em

amostrar indivíduos adultos, além de ser um procedimento estressante para o animal. Na seção 3.5.2.1. explicamos como os dados de parentesco entre filhotes foram utilizados como aproximações para inferir o sistema reprodutivo da espécie.

Neste estudo foram utilizadas 443 amostras de sangue de filhotes de *Ara ararauna* coletadas ao longo de oito estações reprodutivas (2012 a 2020) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Tabela 1; Apêndice 1).

**Tabela 1.** Número de ninhos e de filhotes de *Ara ararauna* amostrados, sexados (sexad.) e genotipados (genot.)\* em diferentes estações reprodutivas (2012 a 2020) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Est. reprodutiva	Nº de ninhos	Nº de filhotes	Nº ninhos sexad.	Nº filhotes sexad.	Nº ninhos genot.	Nº filhotes genot.
2012	15	20	15	20	0	0
2013	17	33	17	33	15	29
2014	23	38	23	38	23	34
2015	36	63	36	63	36	63
2016	37	61	36	59	35	59
2017	52	80	51	77	48	69
2018	67	124	67	123	67	114
2019**	13	24	13	24	0	0
Total	260	443	258	437	224	368

\*número de indivíduos genotipados que foram usados nas análises de parentesco subsequentes.

\*\*2019 somente uma parte das amostras coletadas foram analisadas (no total havia 70 ninhos e 116 filhotes amostrados) e somente a sexagem foi realizada nas amostras de 2012 e 2019 (sem genotipagem).

### 3.4 Procedimentos laboratoriais

#### 3.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA foi isolado de acordo com o protocolo de extração utilizando proteinase k e fenol-clorofórmio segundo Bruford et al. (1992) com algumas modificações. Foram misturados 300 µl de TNE (50mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de EDTA, pH 7,5), 30 µl de Tris HCl 1M pH7,5, 10 µl de SDS 25% e 25 µl de proteinase K (20mg/ml) e acrescentado cerca de 2 mm<sup>2</sup> de sangue de cada ave. O material foi incubado a 37°C durante a noite ou a 55°C por 4 horas.

Após a incubação, foi acrescentado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturado e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. A fase superior foi retirada com micropipeta e

transferida para um tubo novo. A esse tubo novo foram adicionados dois volumes de etanol absoluto, o tubo foi invertido para precipitar o DNA e centrifugado por dez minutos a 12000 rpm. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 300 µl de etanol a 70% e centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm. Após descartado o sobrenadante, o precipitado foi seco em bomba de vácuo por cerca de 30 minutos a 45°C e ressuspensão em 75 µl de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM).

A integridade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% examinado sob luz ultravioleta em transiluminador UV. A estimativa do peso molecular do DNA extraído foi realizada por meio da comparação da intensidade da banda do DNA com a banda correspondente do marcador de peso molecular. A partir do “DNA estoque” (DNA não diluído) foi feita uma “solução de trabalho” com concentração em torno de 20 ng/µl. O DNA estoque e a solução de trabalho foram armazenados em geladeira entre 4°C e 8°C.

### 3.4.2 Sexagem molecular

Para a determinação do sexo dos filhotes amostrados foi realizada a sexagem molecular, uma vez que a espécie não apresenta dimorfismo sexual externo. A sexagem das amostras foi realizada por meio da amplificação do gene CDH-1 presente nos cromossomos sexuais Z e W seguindo o protocolo de Griffiths e colaboradores (1998) com modificações.

As reações de amplificação foram realizadas com os *primers* P2 (5' TCTGCATCGCTAAATCCTTT 3') e P8 (5' CTCCCAAGGATGAGRAAYTG 3'; GRIFFITHS *et al.*, 1998) em volume final de 10 µl, sendo 4,9 µl de água MilliQ, 1,0 µl de tampão (10X), 1,0 µl de dNTPs (2 mM), 1 µl do *primer* P2 (10µM), 1 µl do *primer* P8 (10µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl, Pharmacia) e 1 µl de DNA (20-50 ng). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, hibridação a 46 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 7 min, por fim, mantido a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador. Os produtos foram fracionados em gel de agarose 3% e todas as reações foram acompanhadas de controle positivo, ou seja, uma amostra de fêmea anteriormente sexada. As amostras que não amplificaram seguindo essas condições foram amplificadas com mais *Taq* polimerase (0,14 µl, 5 U/µl, Pharmacia) e um pouco mais de DNA (1,5 µl).

### 3.4.3 Avaliação da razão sexual

Uma vez determinados os sexos dos filhotes, foi avaliado se a razão observada de machos e fêmeas mostra evidência de desvio do valor esperado, segundo o princípio de Fisher (1:1), por meio do teste do qui-quadrado, um teste de hipóteses e não paramétrico para comparar proporções (BEIGUELMAN, 1996).

$$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{e}$$

Onde  $d$  é o desvio entre a proporção observada e esperada,  $e$  é a frequência esperada (BEIGUELMAN, 1996). A regra para estimar a força da evidência de desvio da frequência observada da esperada (terminologia proposta por Muff (2022) é baseada no nível descritivo ou valor  $p$ , neste caso:

$$p = p(\chi \geq \chi_{obs}^2)$$

Em que  $\chi_{obs}^2$  é o valor calculado a partir dos dados, usando a expressão apresentada para  $\chi^2$ .

### 3.4.4 Amplificação dos locos de microssatélites

Foram utilizados *primers* heterólogos desenhados a partir do genoma de *Ara macao* (LIMA-REZENDE et al., 2019; Tabela 2), uma espécie filogeneticamente próxima. Em um estudo anterior esses *primers* foram testados em *Ara ararauna* e os produtos amplificados foram sequenciados para confirmar a presença de microssatélites (LIMA-REZENDE et al., 2019). Para a caracterização dos genótipos dos filhotes de *A. ararauna* foram escolhidos 20 desses *primers* com base em características como tamanho da unidade de repetição, número de alelos e probabilidade de exclusão de paternidade (Tabela 2).

Cada reação continha 0,1  $\mu$ l de *Taq* polimerase (5 U/  $\mu$ l, Pharmacia), 0,1  $\mu$ l de *primer forward* com sequência adicional de M13 na extremidade 5' (10  $\mu$ M; 5' - CACGACGTTGTAACGAC, Boutin-Ganache et al., 2001), 0,3  $\mu$ l de *primer reverse* (10  $\mu$ M), 0,4  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (25 mM), 1  $\mu$ l de dNTPs (4 mM), 1,2  $\mu$ l de tampão (10x), 1  $\mu$ l de DNA (20-40 ng) e 7,7  $\mu$ l de água MilliQ para completar 12  $\mu$ l. A reação de amplificação apresentava as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 7 min, 10 ciclos a 94°C por 1 min, temperatura de anelamento específica por par de *primers* (ver tabela 2) por 1 min e 72°C por 45 seg, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 45 seg e extensão final de 72°C por 10 min. Aproximadamente 2  $\mu$ l do produto amplificado foi carregado em gel de agarose de 1% a 1,5% para avaliar a qualidade e estimar a quantidade do produto. Os testes iniciais de amplificação e avaliação de nível de polimorfismo dos microssatélites foram realizados com 10 filhotes de ninhos diferentes (potencialmente não-aparentados). Os *primers* amac-12, amac-13, amac-15, amac-17 e amac-20 amplificaram após o aumento da quantidade de DNA (1,5  $\mu$ l).

**Tabela 2.** Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* heterólogos testados em *Ara ararauna* e desenvolvidos baseados no genoma de *Ara macao* e a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) usada no presente estudo.

Loco	Primers (5' – 3')	$T_a$ (°C)
Amac-03	F: AGAATGAGTCCCAGGCTTAC R: ACAAGGCAGATAGCACAAGA	na
Amac-04	F: CCTGAACCAATGTGCTCTAC R: GACAGGGAAGTGGGACAGAT	na
Amac-05	F: TGCAGCTAGTTTGGTCTTGT	na

Continuação Tabela 2

Loco	Primers (5' – 3')	Ta (°C)
	R: AGTTACCTAAAGCCTGCCTG	
Amac-06	F: AGGGACATGCAGGAAAGTAT R: TTAAGTTCCAGGGGGAAGTA	56°C
Amac-07	F: GTCCAAATCCATCTGTTTCA R: CCTTTAGCCTCCTCTCACAT	56°C
Amac-08	F: CGAGAAGTTTGAAGTTGCAG R: CCAAGCACTATCTTCCCTCT	56°C
Amac-09	F: TCAAACCCAAATCACTGTTC R: AAGAAGTGGTGTTCCTGAT	56°C
Amac-10	F: TTTCTTCCTCAAAGGGACAT R: TTTGTATAAGGGCACAGGAA	na
Amac-11	F: CAGCAGGAGAATTTAAGCAA R: CACTTTGTTGGAGGTGGTAA	56°C
Amac-12	F: GCAGTGCTCAGAAAGTAAGC R: TTCCTTCCCTCTGATATGGT	55°C
Amac-13	F: GCTTCAGTTGGTCATCAAAG R: AGCTGCAAATTAGGGAECTT	56°C
Amac-15	F: AGCAGGACAGTAAAGGAAGG R: AGGAATCAGCTCCAGACTTC	57°C
Amac-17	R: AGCTGCAAATTAGGGAECTT R: CAGGTCTCAGAACCCTTCTT	55°C
Amac-18	F: GAGCTCAGAGTGTGGACAAC R: GCAGTTCAGGCAATTAACAC	56°C
Amac-19	F: CATCATTTCCCTCTTCTCCT R: ACATGAGTACAGCGTCCATC	56°C
Amac-20	F: CACCCACCCAACAGTTAAT R: TGCCTTTATAGACCCTTTCC	56°C
Amac-21	F: AGCAAAACCACATTACATC R: AAGTGGAGACCCTGACTGAT	na
Amac-22	F: CTCAGCTGACAGAGAGGAAA R: TCCAACAGAAGGCTTACAAA	na
Amac-23	F: GCACAGAGTGAGAAAGCAAG R: TAGTGTGGGGAECTCAAATG	na
Amac-26	F: TAGCTTCGTGCTCTGCTAGT R: TCCTCCTACTTTGCTTCCTT	56°C

na = não amplificou.

Treze locos que apresentaram uma banda única no gel de agarose foram utilizados com todas as amostras de filhotes. As condições foram as mesmas já descritas, exceto pela adição de 0,2 µl de primer M13 (10 µM) marcado com fluorescência (FAM, VIC ou NED, *Applied Biosystems*). Depois de amplificados, 1,5 µl dos produtos foram carregados em gel de agarose 1% a 1,5% para confirmação da amplificação e avaliação da quantidade do produto. Em caso positivo, as amostras foram diluídas seguindo a proporção de 1:8, 1:10 ou 1:15 de acordo com a sua concentração e centrifugadas por 1 min a 2200 rpm. A placa de injeção para genotipagem foi preparada com 2,0 µl de cada um dos produtos amplificados e diluídos e misturados com 0,08 µl do marcador molecular *GeneScan™ - 500 ROX™ STANDARD (Applied Biosystem; 2 fmol)* e 12,92 µl de Formamida *Hi-Di™ (Thermo Fisher)*. Cerca de 10,0 µl dessa mistura foi analisada em sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystems*).

Como em cada placa de injeção há 96 poços, as amostras foram organizadas em cinco lotes de no máximo 95 amostras (sendo que um poço foi mantido vazio como controle negativo), seguindo uma ordem de prioridade, da estação reprodutiva com mais filhotes até a com menos. Infelizmente o quinto lote referente às estações reprodutivas 2012 e 2020 (Tabela 1) não foi genotipado por falta de tempo. Além dessas 44 amostras, 31 amostras genotipadas foram retiradas das análises seguintes devido a problemas na amplificação (Tabela 1). Assim, foram genotipados 368 filhotes de *Ara ararauna* de 135 ninhos diferentes (Tabela 1) amostrados ao longo de seis estações reprodutivas (2013-2019) e estes foram utilizados nas análises subsequentes.

#### **3.4.5 Identificação dos genótipos de microssatélites**

A identificação do tamanho dos alelos foi feita com auxílio do programa *Genemarker* ([www.softgenetics.com](http://www.softgenetics.com)). Foi realizada a análise com o programa *Micro-Checker* (VAN OSTERHOUT et al., 2004) para detectar possíveis erros na determinação dos genótipos, como a amplificação preferencial de alelo (*allele dropout*), a ocorrência de alelos nulos (ausência de amplificação de um dos alelos) e de picos *stutter* (artefatos resultantes da PCR) e possível excesso de homozigotos.

### **3.5 Análise estatística dos dados**

#### **3.5.1 Estimativas dos parâmetros genético-populacionais**

Após determinados os genótipos, foram estimados para cada loco: frequências alélicas, número de alelos por loco, heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), desequilíbrio de ligação (LD) e equilíbrio de Hardy Weinberg (pela comparação das frequências de heterozigotos esperada e observada). Todas as estimativas e testes desses parâmetros foram realizados no programa *Genepop* 4.7.5 (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

As estimativas dos parâmetros genético-populacionais foram realizadas com base em amostras de apenas um filhote por ninho, evitando a sobre representação de determinados alelos devido à possibilidade de filhotes do mesmo ninho serem proximamente aparentados. Além disso, com a possibilidade de haver fidelidade do casal ao ninho, ou seja, o mesmo casal se reproduz no mesmo ninho durante várias estações reprodutivas, optamos por utilizar apenas a estação reprodutiva com o maior número de ninhos amostrados. Assim, foram utilizadas 67 amostras (do total de 114) de 67 ninhos diferentes amostrados de 2018

Foi feita a correção de Bonferroni (ZAR, 1999) para as análises desequilíbrio de ligação e equilíbrio de Hardy Weinberg 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, esse cálculo é realizado para alterar o nível de significância ( $P$ ), com a finalidade de evitar erros derivados de comparações múltiplas..

A probabilidade de identidade é a probabilidade média de que dois indivíduos escolhidos ao acaso em uma população apresentem genótipos idênticos, essa estimativa foi calculada no *Coancestry* (WANG, 2011), de acordo com a seguinte fórmula:

$$P_{(ID)} = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j>i} (2p_i p_j)^2$$

Onde  $p_i$  e  $p_j$  são as frequências do alelo  $i$ -ésimo e  $j$ -ésimo.

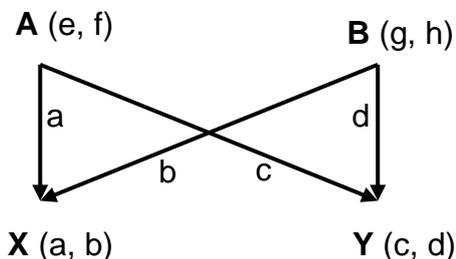
### 3.5.2 Estimativas de parentesco genético

As relações de parentesco são definidas em termos de probabilidades de que conjuntos de alelos tenham descendido de um único alelo ancestral, dessa forma, idênticos por descendência (*Identical by Descent*, IBD). Dois indivíduos são considerados relacionados compartilham alelos idênticos por descendência (IBD). Em contraposição, alelos que parecem ser os mesmos por conta do estado alélico são conhecidos como "idênticos por estado". Para os microsatélites isso significa que possuem o mesmo número de unidades de repetição, mas não necessariamente são idênticos por descendência. Alelos passados dos pais para a prole são idênticos por descendência e progenitor-prole compartilham alelos IBD. Porém, dois irmãos podem receber alelos idênticos por estado, sendo um materno e outro paterno, ou seja, podem não compartilhar alelos IBD (WEIR, 2006). Sabendo que progenitor-prole compartilham um alelo por loco, a probabilidade de haver um par de alelos IBD é um. Dessa forma, dois indivíduos que não possuem alelos em comum não podem ser progenitores e prole. Partindo desse ponto, duas maneiras de inferir a categoria de parentesco entre indivíduos podem ser adotadas usando os genótipos observados nos indivíduos: 1) avaliação de quais dentre as categorias de parentesco possui maior probabilidade e 2) testar entre duas categorias de parentesco alternativas e a que apresentar maior probabilidade é aceita (WEIR, 2006).

A similaridade genética ( $r$ ) entre 2 indivíduos pode variar de zero a um, dependendo da coancestralidade entre eles (LYNCH & RITLAND, 1999). Na Figura 4, os indivíduos X e Y representam irmãos completos e seus progenitores são os indivíduos A e B. Um alelo do indivíduo X ( $a$  ou  $b$ ) e um alelo do seu irmão Y ( $c$  ou  $d$ ) tem a probabilidade de  $\frac{1}{4}$  de ter descendido do mesmo alelo de um dos progenitores ( $e$ ,  $f$ ,  $g$  ou  $h$ ) e seria IBD. Logo, o coeficiente de coancestralidade entre irmãos-completos é de  $\frac{1}{4}$ . Ainda, dois indivíduos podem possuir 0, 1, ou 2 alelos IBD e suas probabilidades podem ser representadas por  $k_0$ ,  $k_1$  e  $k_2$ , respectivamente. No exemplo dos irmãos X e Y (Fig. 4) essas probabilidades são de  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  respectivamente (Tabela 3).

As categorias de parentesco progenitor-prole e irmãos-completos são de 1º grau (compartilham em média 50% dos alelos); as categorias avós-netos, meios-irmãos e tios-sobrinhos são classificadas como de 2º grau (compartilham em média 25% dos alelos); as categorias primos em 1º grau e bisavós-bisnetos são consideradas como de 3º grau (compartilham em média 12.5% dos alelos; BLOUIN, 2003). Do mesmo modo, esses valores podem ser traduzidos em coeficientes de similaridade genética. Para indivíduos não-aparentados cujos genótipos não contêm alelos IBD o valor de parentesco  $r_{xy} = 0$ .

Inversamente, espera-se  $r_{xy} = 1,0$  apenas entre clones ou gêmeos idênticos,  $r_{xy} = 0,5$  entre parentes de primeiro grau (por exemplo, progenitor-prole ou irmãos completos) e  $r_{xy} = 0,25$  entre parentes de segundo grau (por exemplo, meios-irmãos; LYNCH & RITLAND, 1999).



**Figura 4.** Representação do padrão de identidade por descendência e da probabilidade de que  $\frac{1}{4}$  dos alelos herdados ( $a, b, c$  e  $d$ ) pela prole X e Y sejam IBD aos alelos ( $e, f, g$  ou  $h$ ) do mesmo progenitor A ou B.

**Tabela 3.** Coeficientes  $k$  para quatro categorias de parentesco,  $k_0, 2k_1$  e  $k_2$  são as probabilidades de dois indivíduos compartilharem 0, 1 ou 2 alelos idênticos por descendência de acordo com cada categoria.  $\theta$  representa o coeficiente de consanguinidade (LYNCH & WALSH, 1998).

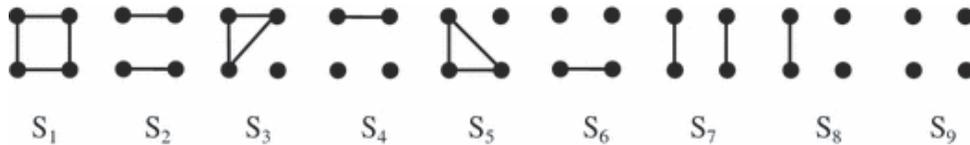
Parentesco	$k_0$	$k_1$	$k_2$	$\theta = \frac{k_1}{4} + \frac{k_2}{2}$
Progenitor-prole	0	1	0	1/4
Irmãos-completos	0,25	0,5	0,25	1/4
Meios-irmãos	0,5	0,5	0	1/8
Não-aparentados	1	0	0	0

A análise de parentesco dos 368 indivíduos com base nos treze microssatélites heterólogos (Tabelas 1 e 2) foram realizadas entre pares de indivíduos. Ou seja, foram comparados os genótipos de dois filhotes para estimar o coeficiente de parentesco ( $r$ ) entre eles.

### 3.5.2.1. Análise de parentesco de filhotes do mesmo ninho e mesma estação reprodutiva e de filhotes de diferentes ninhos

O coeficiente de parentesco ( $r$ ) entre pares de indivíduos foi calculado no *Coancestry*, um programa que utiliza sete estimadores de parentesco para estimar o valor de  $r$ , além de três estimadores de coeficiente de endogamia (FIS). Todos os estimadores presumem que o par de indivíduos não é endogâmico, dessa forma, podem compartilhar 2, 1 ou 0 alelos IBD ( $S_7, S_8$  e  $S_9$ ; Fig. 5). O *Coancestry* (WANG, 2011) denomina as probabilidades de  $S_7, S_8$  e  $S_9$  como  $\Delta_7, \Delta_8$  e  $\Delta_9$  respectivamente e expressa o coeficiente de coancestralidade entre os indivíduos X e Y como:

$$\theta_{XY} = \frac{1}{2} \Delta_7 + \frac{1}{4} \Delta_8$$



**Figura 5.** Nove configurações de alelos idênticos por descendência (IBD), o par de pontos superior representa os dois alelos do indivíduo X e o par inferior representa os dois alelos do indivíduo Y. Alelos conectados por linhas são IBD (WANG, 2007).

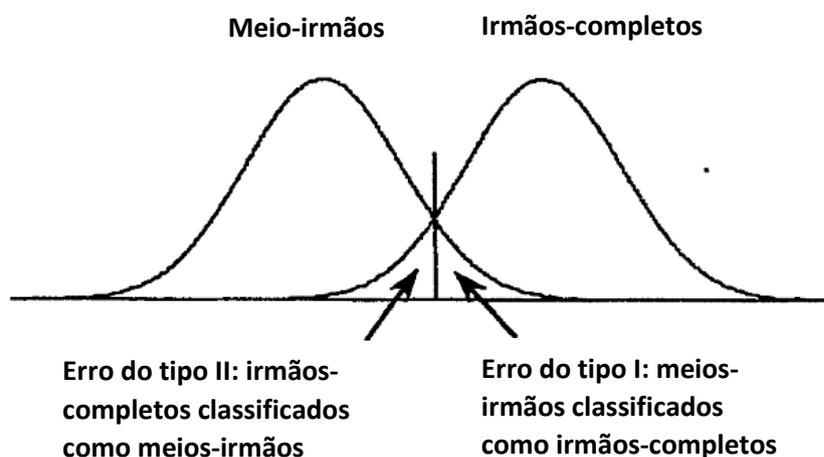
Os estimadores implementados subdividem-se em duas principais categorias. A primeira representa os “*métodos de momentum*” (MM) que calculam as estimativas de grau de parentesco a partir de um conjunto de estatísticas que descrevem parâmetros populacionais que influenciam na probabilidade de alelos IBD, como a frequência alélica média, a variância das frequências alélicas, a assimetria na distribuição das frequências alélicas e a curtose que indica a presença de alelos raros. Como é um método baseado em estimativas estatísticas contínuas para representar as características genéticas da amostra, a comparação dos genótipos de dois indivíduos gera um valor contínuo de probabilidade de alelos IBD, por exemplo, os estimadores desenvolvidos por Queller e Goodnight (1989), Ritland (1996), Lynch e Ritland (1999), e Wang (2002). A segunda categoria engloba os estimadores de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML), que utilizam uma abordagem de verossimilhança para determinar, a partir dos genótipos, a probabilidade de um par de indivíduos se relacionarem de uma determinada forma (irmãos completos, meio-irmãos, etc.; (THOMPSON, 1975; MOUSSEAU et al., 1998; GOODNIGHT & QUELLER, 1999; THOMAS & HILL, 2000).

Estudos mostram que nenhum estimador é superior aos demais em todos os cenários possíveis (tamanho da amostra e quantidade de marcadores) quando se considera seu desempenho avaliado por viés de estimativa, ou seja, o quanto um estimador pode superestimar ou subestimar os coeficientes de parentesco de acordo com o alto ou baixo parentesco real e a sua variância, de acordo com o desvio padrão em relação à média de  $r$  para cada categoria de parentesco (VAN DE CASTEELE et al., 2001; WANG, 2002; MILLIGAN, 2003). A classificação dos estimadores com base no seu desempenho, depende do real valor de parentesco, do quão informativos são os marcadores e do tamanho da amostra (WANG, 2007). Os estimadores podem não ser tendenciosos para relações de parentesco como progenitor-prole, irmãos-completos e meios-irmãos, mas podem superestimar o parentesco de díades (pares) não-relacionadas, esse viés, em alguns casos, pode ser corrigido com o aumento de locos (WANG, 2007).

Para determinar o estimador para o qual o nosso conjunto de dados melhor se adequou, os estimadores foram analisados quanto à precisão e à variância por meio de simulações de genótipos multilocos de indivíduos com parentesco pré-definido (MILLIGAN, 2003). Assim, mil pares de genótipos foram simulados no *Coancestry* para cada uma das categorias de parentesco (progenitor-prole, irmãos-

completos, meios-irmãos e não-aparentados) utilizando a frequência alélica do nosso conjunto de amostras. Com base nas estatísticas sumárias calculadas pelo *Coancestry* (Apêndice 2 e 3), foi observado que o estimador de verossimilhança triádica, TrioML, obteve melhor desempenho levando em consideração a *root mean squared error* (RMSE; que indica a qualidade das estimativas de  $r$ ) que leva em conta tanto o viés quanto a variância amostral (Apêndice 2). Apesar de o TrioML ter apresentado a menor média, o valor não é significativamente diferente da média dos valores esperados e ainda, resultou na menor variância (a dispersão dos dados em torno da média) e a segunda melhor correlação com o valor esperado (WANG, 2007; Apêndice 3). Assim, o TrioML foi utilizado para estimar os coeficientes de parentesco ( $r$ ) entre os pares de indivíduos.

Ainda, o desempenho do estimador TrioML foi avaliado por meio da probabilidade de que uma díade que pertence a uma determinada categoria de parentesco seja classificada de forma equivocada em outra categoria (erros do tipo I e II), dado que há sobreposição das distribuições dos valores de  $r$  simulados para meios-irmãos e irmãos-completos (Fig. 6; Tabela 4). Dessa análise resultou que 20,3% dos meio-irmãos e 17,2% dos irmãos-completos apresentaram valores de  $r$  que resultariam em categorizações incorretas. Em outras palavras, 20,3% dos meio-irmãos seriam classificados como irmãos-completos segundo o valor de  $r$  e 17,2% dos irmãos-completos seriam classificados como meio-irmãos (Tabela 4).



**Figura 6.** Distribuições de valores de parentesco  $r$  simulados para duas categorias de parentesco: meios-irmãos e irmãos-completos. Notar as áreas de sobreposição das distribuições de valores e os tipos de erros associados. Fonte: Blouin (1996).

**Tabela 4.** Percentuais de atribuição de uma determinada categoria de parentesco a diferentes categorias de parentesco baseado simulações de valores de parentesco  $r$  para 3.000 pares de

genótipos. Em negrito estão as probabilidades percentuais mínimas e máximas esperadas de que cada categoria de parentesco (irmãos-completos, *full siblings*, FS; meio-irmãos, *half siblings*, HS e não aparentados, *unrelated*, U) seja corretamente categorizada.

<b>Verdadeiro/Falso</b>	FS	HS	U
FS	<b>82,8 - 94,1</b>	17,2	5,9
HS	20,3	<b>74 - 79,7</b>	26
U	1	8,9	<b>91,9 - 99</b>

Consideramos no presente estudo que pares de filhotes amostrados no mesmo ninho e que compartilham os progenitores devem apresentar valor de  $r$  próximo a 0,5 (irmãos-completos). Da mesma forma, pares de indivíduos amostrados no mesmo ninho que apresentam valor de  $r = 0,25$  sugerem que devem compartilhar apenas um progenitor (meio-irmãos), ou seja, seria uma inferência indireta de presença de paternidade extra-par (PEP). Ainda, valores de  $r = 0$  indicariam que o par de filhotes não compartilha nenhum progenitor, sugerindo indiretamente que possa ser um caso de parasitismo de ninho intraespecífico (PNI). Assim, foi calculada a média do valor de  $r$  para as díades de filhotes amostrados no mesmo ninho e também para as díades de filhotes amostrados em ninhos diferentes (Tabela 5), para averiguar se existe diferença significativa entre os dois grupos. Isso confirmaria a suposição inicial que filhotes de mesmo ninho devem ser proximamente aparentados. Para verificar se havia evidência de desvio entre as médias, foi feito um teste *t Student*.

**Tabela 5.** Número de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho e em ninhos diferentes utilizados na análise de parentesco por estação reprodutiva.

<b>Est. reprodutiva</b>	<b>N° de ninhos</b>	<b>Pares mesmo ninho</b>	<b>Pares ninhos diferentes</b>
2013	15	17	389
2014	23	12	549
2015	36	31	1.922
2016	35	24	1.688
2017	48	23	2.324
2018	67	52	6.390
Total	135*	159	13.262

\* o número de ninhos total se refere aos ninhos diferentes que foram amostrados e não à soma do número de ninhos amostrados em diferentes estações reprodutivas.

A estatística do teste *t* foi calculada da seguinte forma:

$$t_c = \frac{\hat{Y} - A}{\sqrt{\hat{V}(\hat{Y})}} = \frac{\hat{Y} - A}{s(\hat{Y})}$$

Onde,  $\hat{Y}$  é a diferença,  $s(\hat{Y})$  é o erro padrão da diferença, que é a raiz quadrada da estimativa da variância da diferença ( $V(\hat{Y})$ ) (BEIGUELMAN, 1996).

Para as díades de filhotes do mesmo ninho, utilizamos o programa *ML-Relate* para estimar as probabilidades para cada categoria de parentesco entre dois indivíduos (i.e. irmãos completos, meio irmãos, não-aparentados). O *ML-Relate* utiliza coeficientes  $k$  (Tabela 3) para descrever as relações genealógicas entre os indivíduos (KALINOWSKI et al., 2006). Se os indivíduos não forem endogâmicos, a relação entre os coeficientes  $k$  e seu parentesco genético ( $r$ ) é expressa como:

$$r = \frac{1}{2}k_1 + k_2$$

Onde  $k_1$  e  $k_2$  correspondem à probabilidade de compartilhar um ou dois alelos IBD, respectivamente.

Uma ferramenta implementada no *ML-Relate* pode ser usada como prova de hipóteses da seguinte forma: um par de indivíduos pode ser testado estatisticamente quanto a duas possíveis categorias de parentesco, chamadas de nula ( $H_0$ ) e alternativa ( $H_1$ ) e é selecionada a categoria que estiver mais de acordo com os genótipos observados nos indivíduos e considerando os intervalos de confiança. Por exemplo, se a análise de probabilidade de parentesco do *ML-Relate* indicar que dois indivíduos amostrados no mesmo ninho têm maiores chances de serem meio-irmãos, no entanto, a probabilidade dos mesmos indivíduos serem irmãos-completos é próxima, a prova de hipóteses permitirá, através do valor de  $p$  associado, inferir qual categoria de parentesco possui maior probabilidade estatística de ser correta. A prova de hipóteses foi feita da seguinte maneira: foi utilizado como categoria de parentesco nula ( $H_0$ ) aquela com maior probabilidade segundo a análise inicial do *ML-Relate* e como categoria de parentesco alternativa ( $H_1$ ) foram testados: 1) a categoria com a segunda maior probabilidade ou 2) a categoria presumida (no caso de filhotes do mesmo ninho, irmãos-completos). Todas as provas de hipóteses foram executadas com 10.000 permutações de genótipos.

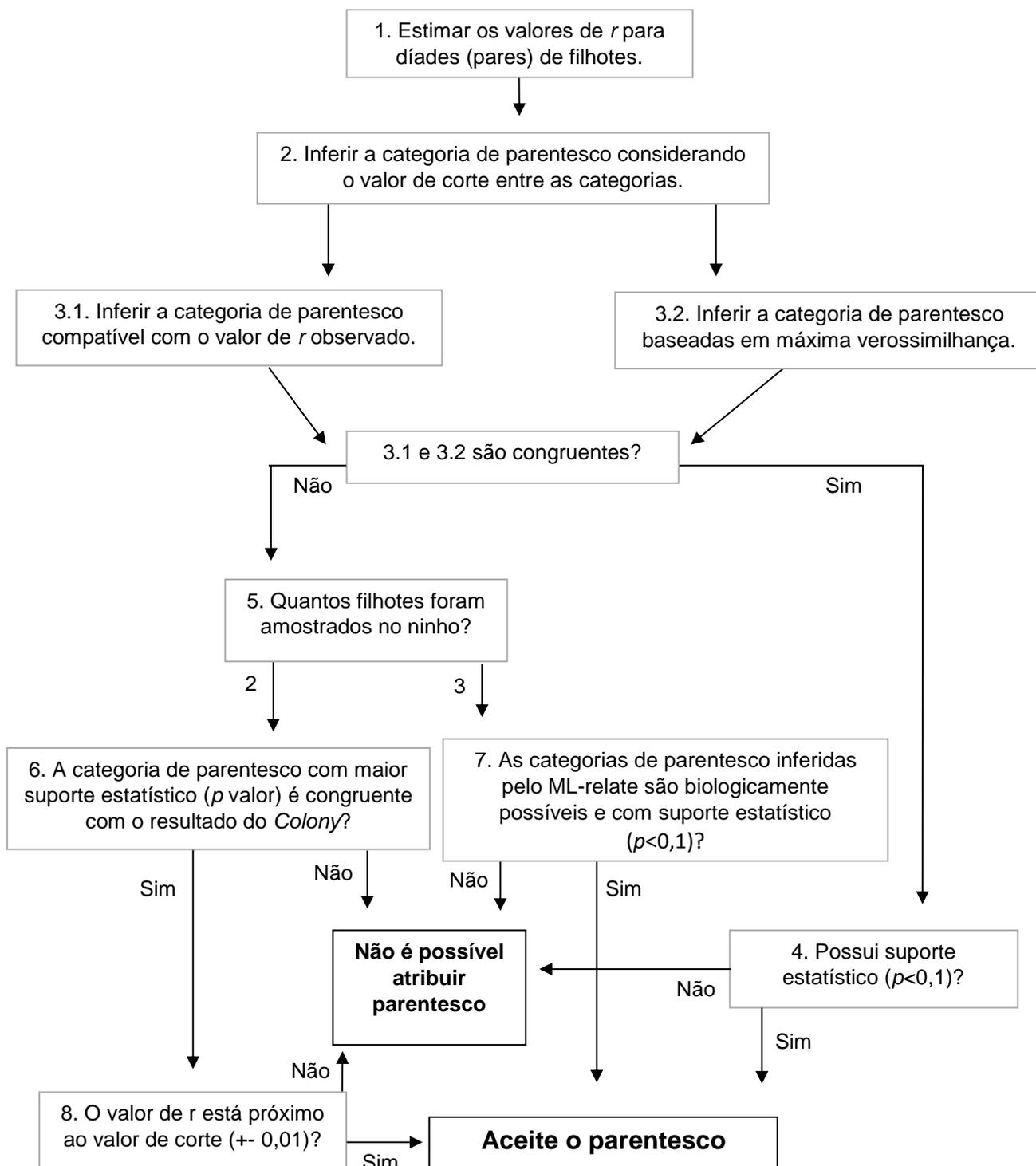
Em alguns casos nos quais os resultados de valor de parentesco e categoria de parentesco não foram congruentes, foi utilizado o *Colony* (JONES & WANG, 2009). Por exemplo, os indivíduos 19659 e 19660 amostrados no ninho 60 (Apêndice 5), apresentaram valor de  $r$  abaixo do valor de corte para irmãos-completos ( $r < 0,343$ ), porém a categoria de parentesco com maior probabilidade e suporte estatístico ( $p$ -valor = 0,03) foi de irmãos completos; a análise do *Colony* indicou que eram irmãos-completos (Apêndice 5). O *Colony* agrupa os indivíduos de acordo com seu coeficiente de parentesco (sem conhecer os genótipos dos potenciais progenitores), e estima quais possuem maior probabilidade de compor um grupo familiar de irmãos-completos, de meio-irmãos, ou de progenitor-prole, a partir de um cenário inicial no qual indivíduos são assumidos como não-aparentados. A verossimilhança de cada um dos possíveis grupos familiares é calculada e o melhor valor é aceito. O programa foi executado

assumindo monogamia do macho e da fêmea e utilizando as frequências alélicas observadas (JONES & WANG, 2010).

A classificação das categorias de parentesco entre as díades de filhotes amostrados no mesmo ninho e mesma estação reprodutiva foi realizada com base na concordância entre as análises de parentesco descritas acima e no suporte estatístico para a categoria de parentesco proposta. O fluxograma de decisão adotado (Fig. 7) foi adaptado de Miño (2010) e Turjeman (2016). Primeiro foram estimados os valores do coeficiente de parentesco ( $r$ ) para as díades (pares) de filhotes (Fig. 7, item 1), amostradas no mesmo ninho. Cada valor de  $r$  foi comparado com os valores de corte gerados a partir da média de  $r$  para os pares de genótipos simulados seguindo a metodologia proposta por Blouin (1996; Fig. 7, item 2). Brevemente, essa metodologia propõe simular o valor de  $r$  de 1.000 pares de genótipos para cada categoria de parentesco pré-definido (irmãos-completos, meio-irmãos e não-aparentados) com base na frequência alélica obtida para o conjunto de dados, em seguida é calculada a média de  $r$  para cada uma dessas categorias e o valor médio entre essas duas médias é utilizado para delimitar as categorias. Por exemplo, se o  $r$  médio entre irmãos-completos é 0,5 e entre meio-irmãos é 0,25, o valor que delimita a relação de irmãos-completos e meios-irmãos é 0,375. Assim, esse valor é usado para delimitar essas duas categorias de parentesco (Fig. 7, item 3.1). No exemplo, irmãos-completos devem possuir  $r > 0,375$  e meio-irmãos apresentariam  $r < 0,375$ . Em paralelo, são obtidas as relações de parentesco baseadas em análises de verossimilhança e suas respectivas probabilidades (Fig. 7, item 3.2). Se esses dois resultados de categoria de parentesco forem concordantes e a prova de hipóteses de parentesco indicar que o parentesco sugerido na etapa anterior possui suporte estatístico com  $p$ -valor  $< 0,1$  (Fig. 7, item 4), a categoria de parentesco é aceita. Se os resultados não forem congruentes, a classificação prossegue de duas maneiras:

1. Em ninhos com dois filhotes amostrados, a categoria de parentesco que possui maior suporte estatístico segundo o *ML-Relate* e que foi corroborada pelo agrupamento no *Colony* (Fig. 7, item 6) e cujo valor de  $r$  for próximo ao valor de corte até 0,01, (considerando erro do tipo I na classificação da categoria determinada pelo valor de corte; Fig. 7, item 8) a categoria de parentesco é aceita. Nos casos em que em alguma dessas etapas (Fig. 7, itens 6 e 8) não haja congruência, foi considerado que a díade não pode ser atribuída a nenhuma categoria de parentesco.

2. Em ninhos com três filhotes amostrado são consideradas as comparações entre os três pares de indivíduos (A-B; A-C e B-C). Se houver divergência entre as categorias de parentesco propostas (ex. A-B e A-C são irmãos completos e B-C são meio-irmãos), as três díades são analisadas em conjunto, realizando o teste de hipóteses para os relacionamentos biologicamente possíveis. No caso exemplificado, seria feita a prova de hipóteses de que B ou C são meios-irmãos de A e que B-C sejam irmãos-completos (Fig. 7, item 7). A categoria de parentesco com maior suporte estatístico (desde que  $p < 0,1$ ) é aceita. Caso não seja encontrada nenhuma categoria de parentesco com suporte estatístico, o parentesco da díade não pode ser atribuído a nenhuma categoria.



**Figura 7.** Diagrama de fluxo do procedimento usado para classificar pares de filhotes em categorias de parentesco, com base nos genótipos. Adaptado de Miño (2010) e Turjeman (2016).

### 3.5.2.2. Análise de parentesco de filhotes do mesmo ninho em diferentes estações reprodutivas

A análise de parentesco entre pares de filhotes amostrados no mesmo ninho, mas de estações reprodutivas diferentes (Tabela 6) foi usada como uma aproximação para inferir se os casais são fiéis

ao ninho. Assim, espera-se que, se um casal for fiel ao ninho, os filhotes amostrados em anos diferentes apresentem valor de  $r$  próximo a 0,5, condizente com o valor esperado entre irmãos-completos (COTTERMAN, 1940).

**Tabela 6.** Ano da primeira reprodução (Ativo desde), ano de perda do ninho (Queda/Remoção) número total de filhotes amostrados e número de pares analisados por ninho em diferentes anos (estações reprodutivas) amostrados.

Ninho	Ativo desde	Anos amostrados	Queda (Q)/ Remoção (R)	Nº total de filhotes	Nº de pares analisados
2	2013	2013, 2014	2014 (Q)	3	2
8	2013	2013, 2014, 2015 2016	2017 (Q)	8	24
20	2013	2013, 2014, 2016	2017 (R)	5	8
23	2013	2014, 2015	2017 (Q)	3	2
25	2013	2013, 2014, 2015 2016	2017 (R)	6	12
30	2013	2013, 2014	2018 (Q)	5	6
32	2013	2014, 2015	2015 (R)	3	2
33	2013	2013, 2014, 2017	2017 (R)	4	5
35	2013	2013, 2014	2015 (R)	2	1
36	2013	2013, 2014, 2015	2017 (Q)	6	11
41	2013	2014, 2015, 2016	x	3	3
42	2013	2014, 2015	2017 (R)	3	2
45	2014	2014, 2015, 2017	x	3	3
46	2014	2014, 2015, 2016, 2017	2020 (Q)	7	18
47	2014	2014, 2015, 2018	2019 (Q)	6	11
51	2014	2014, 2015, 2017, 2018	2019 (Q)	9	30
52	2014	2014, 2015, 2017	2018 (R)	6	12
55	2014	2014, 2015	2022 (I)	3	2
59	2014	2014, 2015	2022 (I)	3	2
61	2014	2015, 2016, 2017, 2018	2023 (Q)	8	22
62	2014	2014, 2015	2022 (Q)	4	4
63	2014	2014, 2015, 2018	2023 (R)	4	5
66	2015	2015, 2016, 2017, 2018	2022 (Q)	9	29
71	2015	2015, 2016, 2017	2019 (R)	7	16
72	2015	2015, 2016	2017*	2	1
73	2015	2015, 2017, 2018	2019 (Q)	4	6
76	2015	2015, 2016, 2017, 2018	x	6	13
78	2015	2015, 2016, 2017, 2018	2022 (Q)	8	24
79	2015	2015, 2018	2017 (R)	3	2
84	2015	2016, 2017, 2018	2022 (R)	5	8
86	2016	2017, 2018	2021 (Q)	2	1

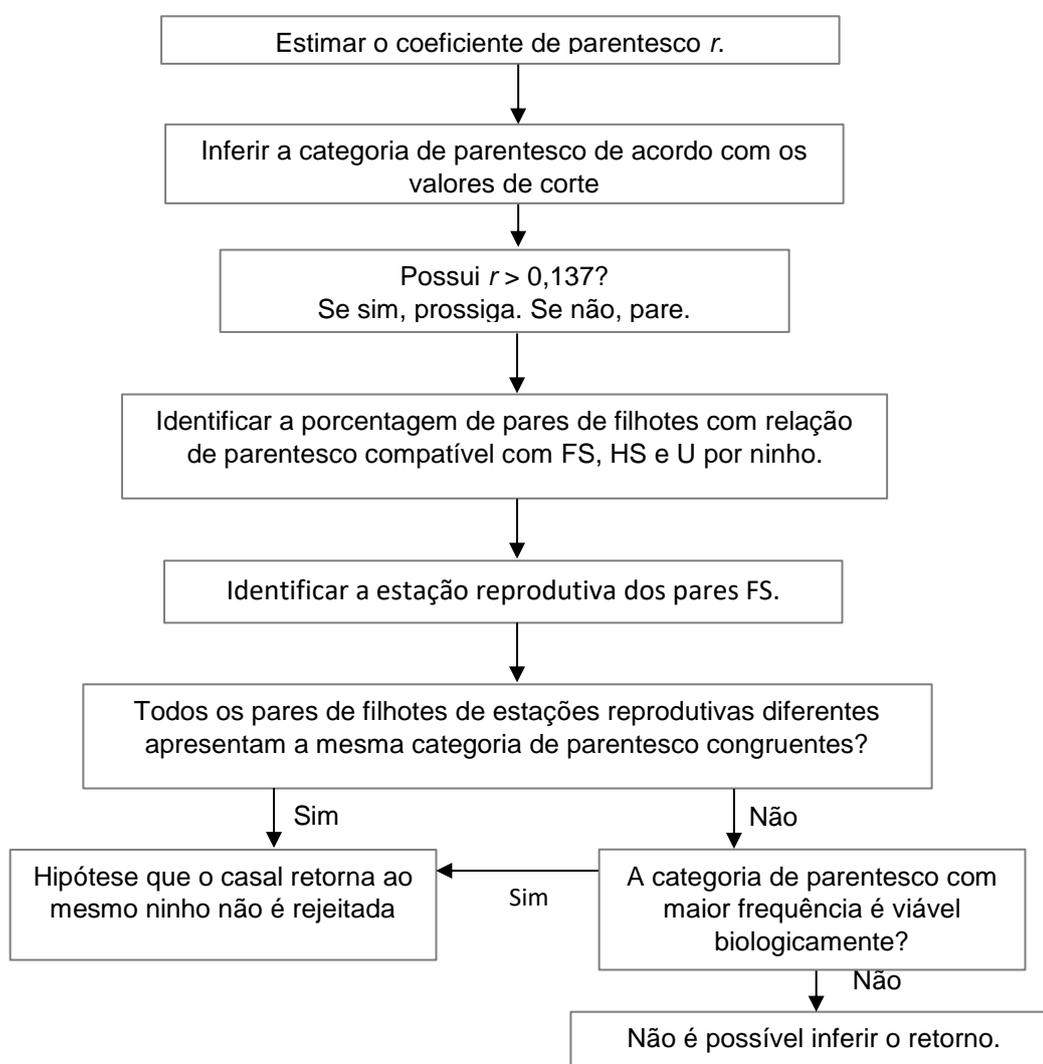
Continuação Tabela 6

Ninho	Ativo desde	Anos amostrados	Queda (Q)/ Remoção (R)	N° total de filhotes	N° de pares analisados
87	2016	2016, 2018	2019 (Q)	3	2
88	2016	2016, 2017, 2018	2023 (R)	5	8
90	2016	2017, 2018	2021 (Q)	4	4
93	2016	2016, 2018	x	3	2
94	2016	2016, 2017	2022 (Q)	2	1
97	2016	2016, 2018	2020 (Q)	2	1
99	2016	2016, 2017, 2018	2021 (Q)	5	8
101	2016	2017, 2018	2021 (R)	2	1
103	2016	2016, 2017, 2018	2021 (Q)	6	12
106	2016	2016, 2018	2020 (Q)	4	4
108	2016	2016, 2018	2019 (Q)	2	1
119	2016	2016, 2017, 2018	x	3	3
125	2016	2016, 2017	2022 (Q)	4	3
126	2017	2017, 2018	2022 (Q)	5	6
130	2017	2017, 2018	2020 (Q)	3	2
131	2017	2017, 2018	2021 (R)	3	2
133	2017	2017, 2018	2023 (R)	3	2
139	2017	2017, 2018	2020 (Q)	4	4
140	2017	2017, 2018	2023 (Q)	2	1
141	2017	2017, 2018	2020 (R)	3	2
142	2017	2017, 2018	2020 (R)	2	1
143	2017	2017, 2018	2020 (R)	2	1
144	2017	2017, 2018	2019 (Q)	3	2
145	2017	2017, 2018	2019 (Q)	4	4
152 A	2017	2017, 2018	2021 (R)	4	4
157	2017	2017, 2018	2021 (C)	3	2

X: ninhos ainda disponíveis

A análise de categoria de parentesco entre os filhotes encontrados no mesmo ninho mas em estações reprodutivas diferentes seguiu o fluxo de decisões ilustrado na figura 8. A análise foi iniciada com a estimativa do coeficiente de parentesco  $r$  entre pares de filhotes de *A. ararauna* amostrados no mesmo ninho, mas em estações reprodutivas diferentes (exemplo hipotético de comparações de pares de filhotes na Tabela 7). As díades que apresentaram  $r > 0,137$  (valor mínimo de corte para meio-irmãos) foram consideradas para seguirem a análise segundo o fluxo de decisões (Fig. 8) e suas categorias de parentesco foram inferidas (irmãos-completos ou *full sibs*, FS; meios-irmãos ou *half sibs*, HS; não-aparentados ou *unrelated*, U). As díades com  $r \leq 0,137$  foram consideradas como não-aparentadas. Para quantificar o número de retornos do casal ao mesmo ninho em estações reprodutivas diferentes foram identificados os pares de filhotes que correspondem à comparação entre duas estações reprodutivas, no exemplo (Tabela 7): nos anos 2010 e 2011 são os pares 1 e 2; 2011 e 2012 são os pares 3, 4, 5 e 6 e, 2010 e 2012 são os pares 7 e 8. A inferência de retorno ou não do casal para o mesmo ninho foi realizada considerando a análise conjunta das categorias de parentesco dos pares de filhotes de todas as estações reprodutivas. A classificação de parentesco entre esses

pares pode não ser congruente, ou seja, no exemplo (Tabela 7), dentre os quatro pares de 2011 e 2012, três são irmãos-completos e um é não-relacionado, consideramos a categoria de parentesco com maior frequência entre os pares para inferir se o casal retorna ao mesmo ninho. Especificamente, B-D, B-E e C-E foram classificados como irmãos-completos, mas C-D como não-aparentados (sendo esperado que seriam irmãos-completos) e foi inferido que o casal que nidificou no ninho 1 na estação reprodutiva de 2011 retornou em 2012. Já a análise da estação reprodutiva de 2010 comparada com 2011 e 2012 não permite inferir que o casal retornou ao mesmo ninho, mas assumindo que A é meio-irmão de D e E, que por sua vez são irmãos-completos de B e C, podemos deduzir que eles compartilham ao menos um dos progenitores.



**Figura 8.** Diagrama de fluxo do procedimento usado para inferir a existência de fidelidade dos casais ao ninho. FS: *full sibs*, irmãos-completos; HS: *half sibs*, meio-irmãos; U: *unrelated*, não-aparentados.

**Tabela 7.** Exemplo hipotético de categorias de parentesco entre pares de filhotes (Indivíduo) de um determinado ninho onde cinco filhotes (A a E) foram amostrados ao longo de três estações reprodutivas (Ano).

Par	Ano 1 – Ano 2	Ninho	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Classific. final
1	2010 – 2011	1	A	B	HS
2	2010 – 2011	1	A	C	X
3	2011 – 2012	1	B	D	FS
4	2011 – 2012	1	B	E	FS
5	2011 – 2012	1	C	D	U
6	2011 – 2012	1	C	E	FS
7	2010 – 2012	1	A	D	HS
8	2010 - 2012	1	A	E	HS

HS: *half sibs*, meio-irmão; X: não pôde ser classificado de acordo com os critérios estabelecidos; FS: *full sibs*, irmãos-completos; U: *unrelated*, não-aparentados.

## 4. Resultados

### 4.1 Razão sexual e equilíbrio de Fisher

A sexagem molecular foi bem-sucedida para 437 (98,64%) dos 443 filhotes de *Ara ararauna* amostrados de 2012 a 2020 (Tabela 8). Foram encontradas 224 fêmeas e 213 machos. O teste de  $\chi^2$  indicou que essa razão sexual observada não difere estatisticamente da razão sexual esperada de 1:1 ( $\chi^2$  calculado de 0,276 e  $p$ -valor = 0,599).

**Tabela 8.** Número de indivíduos amostrados e sexados por estação reprodutiva.

Estação Reprodutiva	Indivíduos amostrados	Indivíduos sexados	Fêmeas	Machos
2012	20	20	10	10
2013	33	33	17	16
2014	38	38	20	18
2015/2016	63	63	32	31
2016/2017	61	59	23	36
2017/2018	80	77	42	35
2018/2019	124	123	65	58
2019/2020	24	24	15	9
Total	443	437	224	213

### 4.2 Parâmetros genético-populacionais

Os 368 indivíduos genotipados apresentaram 119 alelos para os treze locos de microssatélite, variando de 5 a 16 alelos por loco (Tabela 9). A análise no programa *Micro Checker* revelou algumas inconsistências na chamada dos alelos (determinação de tamanhos), que foram corrigidas, e indícios de erros de genotipagem (presença alelos nulos nos locos Amac-06 e Amac-13).

O teste global de probabilidade não encontrou desvios significativos no equilíbrio de Hardy Weinberg para nenhum loco. O teste de déficit de heterozigotos, após a correção de Bonferroni, também não mostrou evidências de desvio. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) por loco variou de 0,650 a 0,912 e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,697 a 0,910 (Tabela 9). A probabilidade de identidade combinada foi de  $1,4^{-16}$ . O valor global de FIS não variou significativamente de zero (Tabela 9). A análise de desequilíbrio de ligação (LD) com a correção de Bonferroni evidenciou possível desequilíbrio de ligação entre o par de locos Amac-06 e Amac-17. Como além disso, Amac-06 apresentou evidências de possível presença de alelos nulos, foi avaliado se este marcador seria mantido ou não nas análises subsequentes. Essa avaliação foi realizada por meio de um teste *t Student* entre as médias do coeficiente de parentesco dos indivíduos amostrados no mesmo ninho e na mesma estação reprodutiva com e sem o Amac-06 considerando os seis anos de amostragem. Como não foi encontrada evidência de diferença entre as médias, o marcador foi mantido nas análises subsequentes.

**Tabela 9.** Parâmetros de variabilidade genética da população de *Ara ararauna* em Campo Grande por microsatélite. Para cada loco são apresentados: o número de indivíduos analisados (N), o número de alelos ( $N_a$ ), as heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), a probabilidade do teste exato para avaliar desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P_{EHW}$ ), a probabilidade de identidade ( $PI$ ) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).

Locos	N	Na	He	Ho	$P_{EHW}$	PI	$F_{IS}$
Amac-06	64	6	0,745	0,708	0.5479	0,40463837	0.0620
Amac-07	57	9	0,744	0,741	0.3382	0,40096492	0.0035
Amac-08	54	10	0,846	0,873	0.5994	0,33768496	-0.0192
Amac-09	58	16	0,912	0,864	0.6039	0,29784494	0.0617
Amac-11	66	12	0,881	0,910	0.3136	0,31565724	-0.0219
Amac-12	63	11	0,791	0,750	0.1183	0,37110368	0.0609
Amac-13	60	15	0,906	0,852	0.2319	0,30110099	0.0691
Amac-15	66	8	0,818	0,776	0.3375	0,35511801	0.0463
Amac-17	66	6	0,734	0,716	0.9753	0,40993507	0.0340
Amac-18	61	5	0,650	0,705	0.4011	0,47328845	-0.0768
Amac-19	65	6	0,728	0,697	0.4737	0,41579616	0.0584
Amac-20	63	7	0,780	0,844	0.3639	0,38005751	-0.0881
Amac-26	66	8	0,788	0,821	0.2456	0,37347148	-0.0439

#### 4.3 Parentesco genético de filhotes do mesmo ninho e de ninhos diferentes

O número de pares de filhotes de *Ara ararauna* amostrados no mesmo ninho em seis estações reprodutivas variou de 12 a 52, enquanto o número de pares amostrados em ninhos diferentes no mesmo período variou de 389 a 6.390 (Tabela 5). As médias do coeficiente de parentesco ( $r$ ) entre pares de filhotes de mesmo ninho e de ninhos diferentes em seis estações reprodutivas variou de 0,33 a 0,50 e de 0,02 a 0,04, respectivamente (Tabela 10). Os testes  $t$  e os  $p$ -valores associados mostraram forte evidência de desvio entre as médias de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho e em ninhos diferentes em todas as estações reprodutivas (Tabela 10).

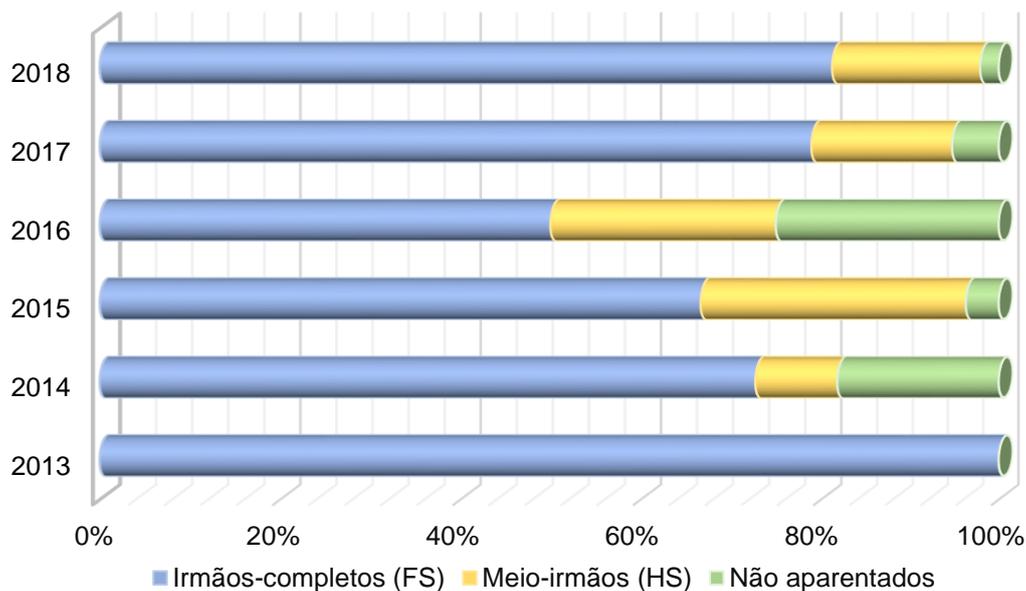
**Tabela 10.** Médias dos valores de coeficiente de parentesco  $r$  entre pares de filhotes ( $r$  médio ninho) amostrados no mesmo ninho (=) e pares de filhos amostrados em ninhos diferentes ( $\neq$ ) em seis estações reprodutivas. N - número de pares de filhotes analisados, valor da estatística do teste  $t$  e o  $p$ -valor. Para o teste foi utilizado  $\alpha = 0,05$ .

Est. Reprodutiva	N =	$r$ médio ninho =	N $\neq$	$r$ médio ninho $\neq$	Estatística $t$	$p$ -valor
2013	17	0,50	389	0,02	-26,581587	0,0000000024
2014	12	0,40	549	0,03	-16,953981	0,0003362719
2015	31	0,48	1.922	0,04	-25,591854	0,0000000000
2016	24	0,33	1.687	0,04	-17,429237	0,0000001454
2017	23	0,45	2.323	0,04	-24,822853	0,0000000119
2018	51	0,47	6.390	0,04	-40,819157	0,0000000000

Os valores do coeficiente de parentesco ( $r$ ), a categoria de parentesco identificada com a de maior probabilidade, o resultado dos testes de hipóteses e o resultado de agrupamento familiar sugerido estão apresentados nos Apêndices 4 ao 9. Esses resultados foram analisados de acordo com o fluxograma de decisões (Fig. 7) para inferir as categorias de parentesco dos pares de filhotes analisados. O número de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho, o número de pares de filhotes que puderam ser categorizados e os números de pares de filhotes por categoria de parentesco nas seis estações reprodutivas são apresentados na Tabela 11. Ao todo foram classificados 83,64% dos 159 pares de filhotes de *A. ararauna* amostrados no mesmo ninho ao longo das seis estações reprodutivas, 75,18% de pares de filhotes foram categorizados como irmãos-completos, 18,04% como meio-irmãos e 6,76% como não-aparentados. Não foi possível determinar a categoria de parentesco de 16,35% (n=26) dos pares de filhotes (Tabela 11 e Fig. 9).

**Tabela 11.** Número de pares de filhotes de seis estações reprodutivas amostrados no mesmo ninho (Pares anal.), número de pares que puderam ser atribuídos a alguma categoria de parentesco (pares categ.), número de pares classificados por categoria (FS - *full siblings*, irmãos-completos; HS - *half siblings*, meio-irmãos; U – *unrelated*, não-aparentados), número de ninhos por estação reprodutiva e números de ninhos com evidência de paternidade extra-par (PEP) e parasitismo de ninho intraespecífico (PNI).

Estação	Pares anal.	Pares categ.	FS	HS	U	Nº ninhos	PEP	PNI
2013	17	12	12	0	0	15	0	0
2014	12	11	8	1	2	23	1	2
2015	31	27	18	8	1	36	7	1
2016	24	16	8	4	4	35	4	4
2017	23	19	15	3	1	48	3	1
2018	52	48	39	8	1	67	7	1
<b>Total</b>	<b>159</b>	<b>133</b>	<b>100</b>	<b>24</b>	<b>9</b>	<b>224</b>	<b>22</b>	<b>9</b>
%	-	<b>83,64</b>	<b>75,18</b>	<b>18,04</b>	<b>6,76</b>	-	<b>9,82</b>	<b>4,01</b>



**Figura 9.** Percentual de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho que foram categorizados como irmãos-completos (*full siblings*; FS), meio-irmãos (*half siblings*; HS) e não-aparentados (*unrelated*; U) em relação ao número de pares categorizados (segundo dados da Tabela 11).

A análise dos pares de filhotes amostrados no mesmo ninho e na mesma estação reprodutiva permitiu inferir quais ninhos apresentaram evidências de paternidade extra-par (PEP) e de parasitismo de ninho intraespecífico (PNI; Tabela 12). Ao todo, foram encontrados 24 pares de meio-irmãos em 22 ninhos e 9 pares de filhotes não-aparentados em 9 ninhos diferentes. Destacamos os ninhos 25 e 52 (Tabela 12) onde foram encontrados filhotes extra-par em mais de uma estação reprodutiva. O ninho 8 apresentou um filhote extra-par na estação reprodutiva de 2015 e um filhote fruto de PNI em 2016. Já no ninho 76 na mesma estação reprodutiva foi encontrado um possível filhote de PEP e outro de PNI.

**Tabela 12.** Estações reprodutivas na quais foram encontradas evidências de paternidade extra-par (PEP) e parasitismo de ninho intraespecífico (PNI) por ninho. \*entre parênteses se encontra o número de pares de filhotes.

Ninho*	PEP	PNI
8 (36)	2015 (2)	2016 (1)
23 (3)	2015 (1)	
25 (15)	2014 (1) 2016 (1)	
33 (6)		2014(1)
51 (36)	2015 (1)	
52 (15)	2015 (1) 2017 (1)	

Continuação Tabela 12

<b>Ninho*</b>	<b>PEP</b>	<b>PNI</b>
54 (1)	2015 (1)	
55 (3)		2014(1)
61 (28)	2018 (2)	
62 (6)	2015 (1)	
71 (21)		2016 (1)
73 (6)		2015 ( 1)
76 (21)	2016 (1)	2018 (1)
79 (3)	2016 (1)	
81 (3)		2016 (1)
85 (1)	2015 (1)	
87 (3)		2016 (1)
90 (6)	2018(1)	
93 (3)	2018 (1)	
117 (1)	2016 (1)	
133 (3)	2018 (1)	
145 (6)	2017 (1)	
150 (3)	2017(1)	
152A (6)		2017 (1)
157 (6)	2018 (1)	
164 (1)	2018 (1)	
192 (1)	2018 (1)	
Total	24	9

Ainda, observações de campo feitas pela equipe do Instituto Arara Azul (BARBOSA, com. pessoal) mostram indícios de que dois indivíduos que foram amostrados enquanto eram filhotes encontraram parceiros e reproduziram-se: 1) 19558 (macho, ninho 02, 2013) se reproduziu no ninho 133, em 2018 (com cinco anos de idade) e 2) 19722 (macho, ninho 87, 2016) se reproduziu no ninho 181, em 2018 (com dois anos de idade). A análise de parentesco entre o 19558 e os seus possíveis dois filhotes amostrados no ninho 133 em 2018 (19859 e 19860; Apêndice 10), não é compatível com o parentesco progenitor-prole, ainda, a análise sugere que a relação mais provável entre eles é de meio-irmãos (com  $p$ -valor<0,2), ou seja, não de progenitor-prole. Já a análise de parentesco entre 19722 e os seus possíveis dois filhotes do ninho 181 em 2018 (19912 e 19913) sugere que sejam não aparentados, mas 19912 e 19913 parecem ser irmãos-completos. Assim, a ausência de parentesco próximo entre 19722 e 19912 e entre 19722 e 19913 pode indicar PEP ou PNI.

Observações de campo para o ninho 87 em 2016 registraram dois eventos de postura, com intervalo de duas semanas, sendo que dois filhotes sobreviveram, um de cada postura. A análise de

parentesco entre os dois filhotes sobreviventes (19721 e 19722; Apêndice 7) indicou que não são aparentados e que umas das duas posturas de ovos foi fruto de PNI.

#### 4.4 Parentesco genético de filhotes do mesmo ninho em diferentes estações reprodutivas

Ao todo, 57 ninhos foram considerados na análise de fidelidade do casal ao mesmo ninho (Tabela 6). O número de estações reprodutivas em que o mesmo ninho foi amostrado variou entre dois e cinco, enquanto o número de filhotes amostrados no mesmo ninho variou de dois a nove (Tabela 6). Os valores do coeficiente de parentesco ( $r$ ), a categoria de parentesco com maior probabilidade, o resultado dos testes de hipóteses e o resultado de agrupamento familiar sugerido (quando necessário) estão apresentados no Apêndice 11.

As porcentagens de pares de filhotes identificados como irmãos-completos (*full sibs*: FS), meio-irmãos (*half-sibs*: HS), não-aparentados (*unrelated*: U) ou não categorizados em cada um dos ninhos são apresentadas na Tabela 13 e na Figura 10. No total dos 371 pares de filhotes analisados, 9,43% (n=35) não puderam ser categorizados. Dos 336 pares cujas categorias de parentesco puderam ser inferidas 84 (25%) eram irmãos-completos, 44 (13,1%) meios-irmãos e 208 (61,9%) não-aparentados. Em 26 ninhos foram encontrados filhotes irmãos-completos em duas estações reprodutivas diferentes, no ninho 66 foram amostrados filhotes irmãos-completos em três estações diferentes, e no ninho 76 foram observados irmãos-completos em quatro estações diferentes (Tabela 13). A análise desses dados permitiu inferir se há indícios ou não de retorno do casal ao mesmo ninho para 54 dos 57 ninhos analisados. Especificamente, assumimos que: 1) a presença de pares de filhotes com parentesco de irmãos completos sugere que o casal retorna para o mesmo ninho em diferentes estações reprodutivas; 2) a presença de pares de filhotes como meio-irmãos sugere que pelo menos um parental pode ter retornado e/ou que pode ter ocorrido paternidade extra-par (PEP); 3) pares de filhotes não-aparentados indicam que nenhum dos parentais retornou ao mesmo ninho e/ou que houve parasitismo de ninho (PNI).

O ano de retorno dos casais aos ninhos foi considerado como aquele da estação reprodutiva posterior à primeira ocupação do ninho pelo casal, assim, um casal que ocupou o ninho pela primeira vez em 2013 e posteriormente em 2014, é descrito como um casal que retornou ao mesmo ninho em 2014. Como a primeira estação reprodutiva amostrada foi 2013, não existem dados de retorno para esse ano. Em 2014 seis casais ocuparam a mesma cavidade ocupada anteriormente, 2015 foram quatro casais, em 2016 foi apenas um, 2017 foram oito e em 2018, 15 casais retornaram ao mesmo ninho (Tabela 14).

**Tabela 13.** Percentual e ano de amostragem de pares de filhotes amostrados no mesmo ninho mas em estações reprodutivas diferentes categorizados como irmãos-completos (*full sibs*: FS), meios-irmãos (*half-sibs*: HS), não-aparentados (*unrelated*: U) e não categorizados (Nc).

<b>Ninho</b>	<b>% FS</b>	<b>Est. reprodutivas (FS)</b>	<b>% HS</b>	<b>Est. reprodutivas (HS)</b>	<b>% U</b>	<b>Est. reprodutivas (U)</b>	<b>% Nc</b>
<b>2</b>	100,00	2013-2014	0,00		0,00		0,00
<b>8</b>	0,00		4,17	2014-2015	91,67	2013-2014, 2013-2015, 2013-2016, 2014-2015, 2014-2016 e 2015-2016	4,17
<b>20</b>	0,00		12,50	2014-2016	75,00	2013-2014 e 2013-2016	12,50
<b>23</b>	50,00	2014-2015	0,00		50,00	2014-2015	0,00
<b>25</b>	0,00		25,00	2014-2016	66,67	2013-2014 e 2013-2016	8,33
<b>30</b>	83,33	2013-2014	0,00		0,00		16,67
<b>32</b>	0,00		100,00	2014-2015	0,00	2014-2015	0,00
<b>33</b>	40,00	2013-2014	0,00		60,00		0,00
<b>35</b>	100,00	2013-2014	0,00		0,00		0,00
<b>36</b>	0,00		9,09	2013-2014	81,82	2013-2014, 2013-2015 e 2014-2015	9,09
<b>41</b>	33,33	2015-2017	0,00		66,67	2014-2017	0,00
<b>42</b>	0,00		100,00	2014-2015	0,00		0,00
<b>45</b>	0,00		0,00		66,67	2014-2015 e 2014-2017	33,33
<b>46</b>	11,11	2014-2015	5,56	2015-2016	83,33	2014-2016, 2014-2018, 2015-2018 e 2016-2018	0,00
<b>47</b>	36,36	2014-2018	0,00		45,45	2014-2015 e 2015-2018	18,18

Continuação Tabela 13

<b>Ninho</b>	<b>% FS</b>	<b>Est. reprodutivas (FS)</b>	<b>% HS</b>	<b>Est. reprodutivas (HS)</b>	<b>% U</b>	<b>Est. reprodutivas (U)</b>	<b>% Nc</b>
<b>51</b>	6,67	2017-2018	13,33	2017-2018	70,00	2014-2015, 2014-2017, 2014-2018, 2015-2017, 2015-2018 e 2017-2018	10,00
<b>52</b>	0,00		8,33	2015-2017	91,67	2014-2015, 2014-2017e 2015-2017	0,00
<b>55</b>	0,00		0,00		100,00	2014-2015	0,00
<b>59</b>	0,00		0,00		100,00	2014-2015	0,00
<b>61</b>	36,36	2015-2018, 2015-2017, 2015-2018, 2016-2018,2017-2018	36,36		4,55		18,18
<b>62</b>	0,00		50,00	2014-2015	50,00	2014-2015	0,00
<b>63</b>	20,00	2015-2018	20,00	2014-2015	60,00	2014-2018 e 2015-2018	0,00
<b>66</b>	65,52	2015-2017, 2015-2018 e 2017-2018	3,45	2015-2016	17,24	2016-2017 e 2017-2018	13,79
<b>71</b>	13,33	2016-2017	13,33	2015-2016	66,67		6,67
<b>72</b>	0,00		0,00		100,00	2015-2016	0,00
<b>73</b>	0,00		0,00		83,33	2015-2017, 2015-2018 e 2017-2018	16,67
<b>76</b>	53,85	2015-2016, 2015-2017, 2015-2018, 2016-2018, 2017-2018	15,38	2016-2018 e 2017-2018	0,00		30,77
<b>78</b>	12,50	2016-2017	4,17	2015-2018	70,83	2015-2016, 2015-2017, 2015-2018, 2016-2018 e 2017-2018	12,50
<b>79</b>	0,00		0,00		100,00	2015-2016	0,00
<b>84</b>	0,00		20,00	2016-2017 e 2017-2018	80,00	2016-2017, 2016-2018 e 2017, 2018	0,00
<b>86</b>	100,00	2017/2018	0,00		0,00		0,00
<b>87</b>	0,00		0,00		100,00	2016-2018	0,00

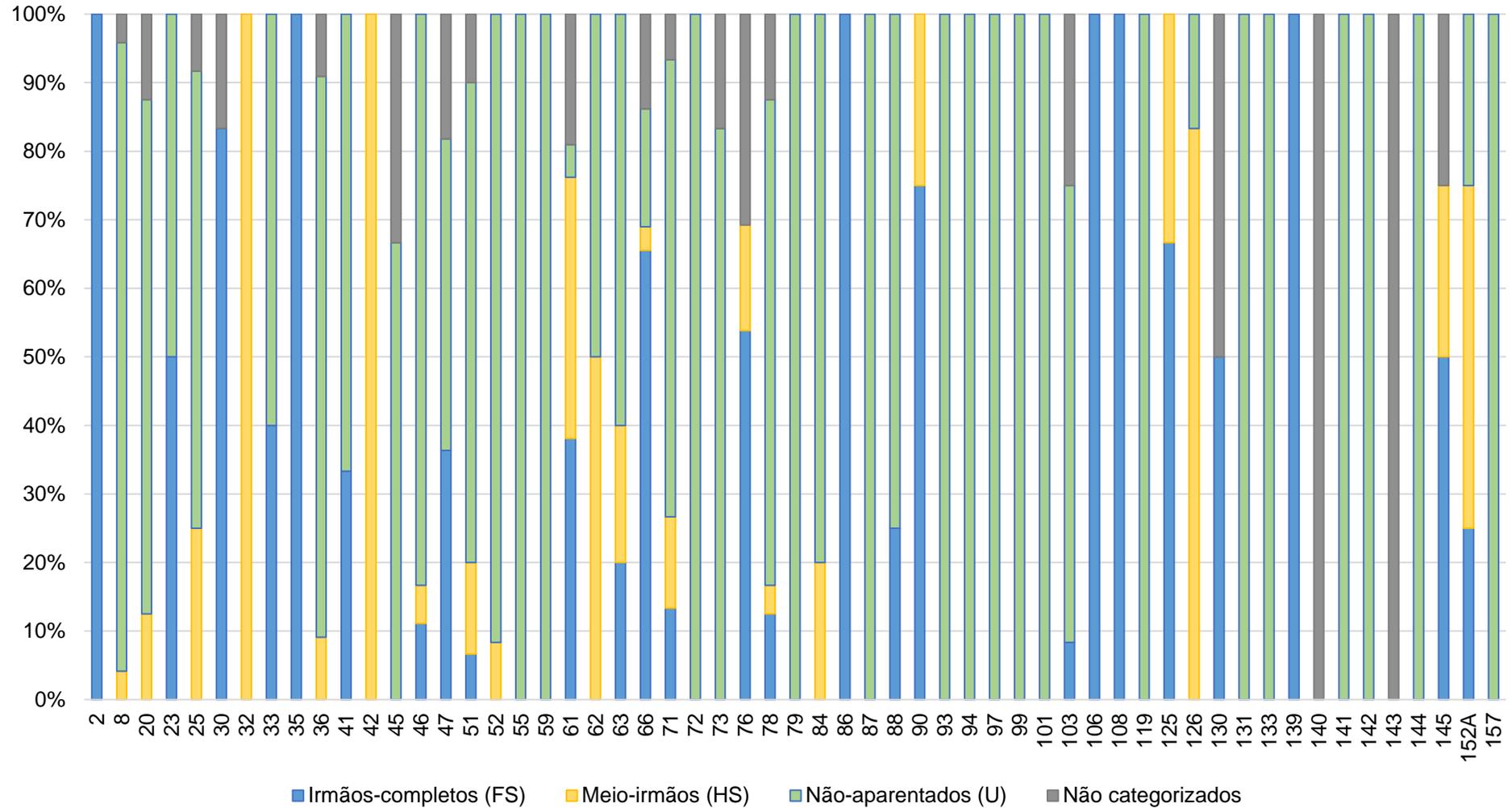
Continuação Tabela 13

<b>Ninho</b>	<b>% FS</b>	<b>Est. reprodutivas (FS)</b>	<b>% HS</b>	<b>Est. reprodutivas (HS)</b>	<b>% U</b>	<b>Est. reprodutivas (U)</b>	<b>% Nc</b>
<b>88</b>	25,00	2017-2018	0,00		75,00	2016-2017 e 2016-2018	0,00
<b>90</b>	75,00	2017-2018	25,00	2017-2018	0,00		0,00
<b>93</b>	0,00		0,00		100,00	2016-2018	0,00
<b>94</b>	0,00		0,00		100,00	2016-2017	0,00
<b>97</b>	0,00		0,00		100,00	2016-2018	0,00
<b>99</b>	0,00		0,00		100,00	2016-2017, 2016-2018 e 2017-2018	0,00
<b>101</b>	0,00		0,00		100,00	2017-2018	0,00
<b>103</b>	8,33	2016-2017	0,00		66,67	2016-2017, 2016-2018 e 2017-2018	25,00
<b>106</b>	100,00	2016-2018	0,00		0,00		0,00
<b>108</b>	100,00	2016-2018	0,00		0,00		0,00
<b>119</b>	0,00		0,00		100,00	2016-2017, 2016-2018 e 2017-2018	0,00
<b>125</b>	66,67	2016-2017	33,33	2016-2017	0,00		0,00
<b>126</b>	0,00		83,33	2017-2018	16,67	2017-2018	0,00
<b>130</b>	50,00	2017-2018	0,00		0,00		50,00
<b>131</b>	0,00		0,00		100,00	2017-2018	0,00
<b>133</b>	0,00		0,00		100,00	2017-2018	0,00
<b>139</b>	100,00	2017-2018	0,00		0,00		0,00

Continuação Tabela 13

<b>Ninho</b>	<b>% FS</b>	<b>Est. reprodutivas (FS)</b>	<b>% HS</b>	<b>Est. reprodutivas (HS)</b>	<b>% U</b>	<b>Est. reprodutivas (U)</b>	<b>% Nc</b>
<b>140</b>	0,00		0,00		0,00		100,00
<b>141</b>	0,00		0,00		100,00		0,00
<b>142</b>	0,00		0,00		100,00	2017-2018	0,00
<b>143</b>	0,00		0,00		0,00		100,00
<b>144</b>	0,00		0,00		100,00	2017-2018	0,00
<b>145</b>	50,00	2017-2018	25,00	2017-2018	0,00		25,00
<b>152A</b>	25,00	2017-18	50,00	2017-2018	25,00	2017-2018	0,00
<b>157</b>	0,00		0,00		100,00	2017-2018	0,00

Continuação Tabela 14



**Figura 10.** Percentual de pares de filhotes de estações reprodutivas diferentes por ninho analisado classificados como irmãos-completos (*full sibs*: FS), meios-irmãos (*half-sibs*: HS) e não-aparentados (*unrelated*: U), além dos pares que não puderam ser categorizados quanto ao parentesco (não categorizados; ver Tabela 13).

**Tabela 14.** Ano de retorno ao ninho do mesmo casal (em estações reprodutivas consecutivas ou não), retorno de um dos parentais (em estações reprodutivas consecutivas ou não) ou paternidade extra-par (PEP), e nenhum parental retornando ao mesmo ninho em estações reprodutivas diferentes. Número de pares de filhotes analisados entre parênteses após a numeração do ninho. Não avaliado- número de pares de filhotes cuja categoria de parentesco não pôde ser inferida.

Ninho	Não avaliado	Casal em estações consecutivas	Casal em estações não consecutivas	Um parental em estações consecutivas ou PEP	Um parental em estações não consecutivas ou PEP	Nenhum parental ou PNI
<b>2 (2)</b>	-	2014 (2)	-	-	-	-
<b>8 (24)</b>	1	-	-	2015 (1)	-	2013, 2016 (22)
<b>20 (8)</b>	1	-	-	-	2016 (1)	2013 (6)
<b>23 (2)</b>	-	2015 (1)	-	-	-	2014, 2015 (1)
<b>25 (12)</b>	1	-	-	-	2016 (3)	2013, 2015 (8)
<b>30 (6)</b>	1	2014 (5)	-	-	-	-
<b>32 (2)</b>	-	-	-	2015 (2)	-	-
<b>33 (5)</b>	-	2014 (2)	-	-	-	2017 (3)
<b>35 (1)</b>	-	2014 (1)	-	-	-	-
<b>36 (11)</b>	1	-	-	2014 (1)	-	2013, 2014, 2015 (9)
<b>41 (3)</b>	-	2016 (1)	-	-	-	2014 (2)
<b>42 (2)</b>	-	-	-	2015 (2)	-	-
<b>45 (3)</b>	1	-	-	-	-	2014, 2015, 2017 (2)
<b>46 (18)</b>	-	2015 (2)	-	2016 (1)	-	2014, 2015, 2016, 2018 (15)
<b>47 (11)</b>	2	-	2018 (4)	-	-	2015 (5)

Continuação Tabela 14

Ninho	Não avaliado	Casal em estações consecutivas	Casal em estações não consecutivas	Um parental em estações consecutivas ou PEP	Um parental em estações não consecutivas ou PEP	Nenhum parental ou PNI
<b>51 (30)</b>	3	2018 (2)	-	2018 (3)	2018 (1)	2014, 2015, 2017, 2018 (21)
<b>52 (12)</b>	-	-	-	-	2017 (1)	2014 (11)
<b>55 (2)</b>	-	-	-	-	-	2014, 2015 (2)
<b>59 (2)</b>	-	-	-	-	-	2014, 2015 (2)
<b>61 (22)</b>	5	2018 (1)	2018 (5) 2017 (1) 2018 (1)	2016 (1) 2018 (1)	2017 (2) 2018 (2) 2018 (2)	2015, 2018 (1)
<b>62 (4)</b>	-	-	-	2015 (2)	-	2014, 2015 (2)
<b>63 (5)</b>	-	-	2018 (1)	2015 (1)	-	2015, 2018 (3)
<b>66 (29)</b>	4	2018 (6)	2017 (7) 2018 (6)	2016 (1)	-	2016 (5)
<b>71 (15)</b>	1	2017 (2)	-	2016 (2)	-	2015, 2016, 2017 (10)
<b>72 (1)</b>	-	-	-	-	-	2015, 2016 (1)
<b>73 (6)</b>	1	-	-	-	-	2015, 2017, 2018 (5)
<b>76 (13)</b>	4	2017 (1) 2018 (1)	2017 (1) 2018 (2) 2018 (2)	2018 (1)	2018 (1)	-
<b>78 (24)</b>	3	2017 (3)	-	-	2018 (1)	2015, 2016(17)
<b>79 (2)</b>	-	-	-	-	-	2015, 2016 (2)
<b>84 (10)</b>	-	-	-	2017 (1)	-	2016, 2017, 2018 (8)

Continuação Tabela 14

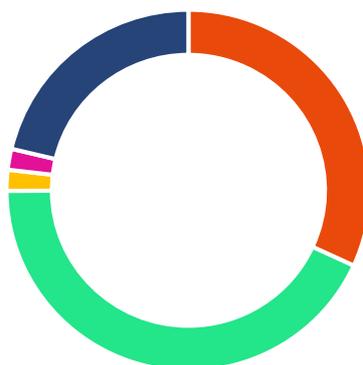
Ninho	Não avaliado	Casal em estações consecutivas	Casal em estações não consecutivas	Um parental em estações consecutivas ou PEP	Um parental em estações não consecutivas ou PEP	Nenhum parental ou PNI
				2018 (1)		
<b>86 (1)</b>	-	2018 (1)	-	-	-	-
<b>87 (2)</b>	-	-	-	-	-	2016, 2018 (2)
<b>88 (8)</b>	-	2018 (2)	-	-	-	2016 (6)
<b>90 (4)</b>	-	2018 (3)	-	2018 (1)	-	-
<b>93 (2)</b>	-	-	-	-	-	2016, 2018 (2)
<b>94 (1)</b>	-	-	-	-	-	2016, 2017 (1)
<b>97 (1)</b>	-	-	-	-	-	2016, 2018 (1)
<b>99 (8)</b>	-	-	-	-	-	2016, 2017, 2018 (8)
<b>101 (1)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (1)
<b>103 (12)</b>	3	2017 (1)	-	-	-	2018 (8)
<b>106 (4)</b>	-	-	2018 (4)	-	-	-
<b>108 (1)</b>	-	-	2018 (1)	-	-	-
<b>119 (3)</b>	-	-	-	-	-	2016, 2017, 2018 (3)
<b>125 (3)</b>	-	2017 (2)	-	2017 (1)	-	-
<b>126 (6)</b>	-	-	-	2018 (5)	-	2017, 2018 (1)
<b>130 (2)</b>	1	2018 (1)	-	-	-	-
<b>131 (2)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (2)
<b>133 (2)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (2)
<b>139 (4)</b>	-	2018 (4)	-	-	-	-
<b>140 (1)</b>	1	-	-	-	-	-

Continuação Tabela 14

Ninho	Não avaliado	Casal em estações consecutivas	Casal em estações não consecutivas	Um parental em estações consecutivas ou PEP	Um parental em estações não consecutivas ou PEP	Nenhum parental ou PNI
<b>141 (2)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (2)
<b>142 (1)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (1)
<b>143 (1)</b>	1	-	-	-	-	-
<b>144 (2)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (2)
<b>145 (4)</b>	1	2018 (2)	-	2018 (1)	-	-
<b>152A (4)</b>	-	2018 (1)	-	2018 (2)	-	2017, 2018 (1)
<b>157 (2)</b>	-	-	-	-	-	2017, 2018 (2)

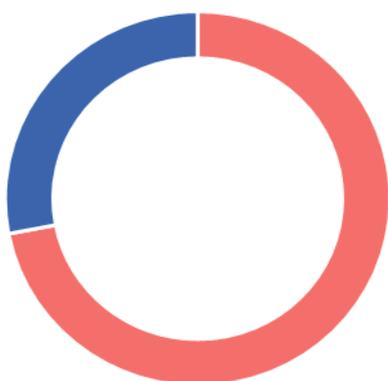
Dentre os 54 ninhos para os quais foi avaliado o possível retorno do casal, foram encontradas evidências de: nenhum parental retornar e/ou presença de PNI em 17 ninhos (31,5%), um parental retornar e/ou presença de PEP em 12 ninhos (21,05%) e o mesmo casal retornar uma a três vezes ao ninho para 46,29% (n = 25; Tabela 14, Fig. 11A). Dentre os 25 possíveis eventos de retorno do casal, em 18 (72%) o retorno ocorreu em estações reprodutivas consecutivas (Tabela 14, Fig. 11B) e em 14 ninhos (33,33%) o mesmo casal parece ter retornado ao longo de todas as estações reprodutivas amostradas no ninho correspondente (Tabelas 13 e 14, Fig. 11C).

### A. Retornos: casais e parentais



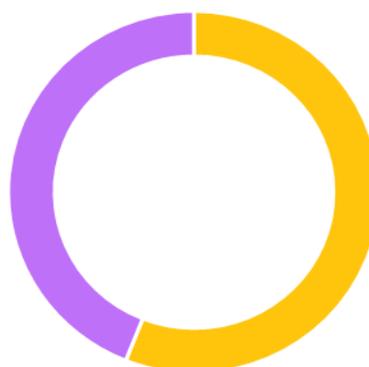
■ 0 - 31,5% (17) ■ 1 - 42,6% (23) ■ 2 - 1,8% (1) ■ 3 - 1,8% (1) ■ 1/2 - 21% (12)

### B. Retorno consecutivo



■ Consecutivas: 72% (18)  
■ Não consecutivas: 28% (7)

### C. Retornos em todas as est. reprodutivas



■ Todas as estações reprodutivas: 56% (14)  
■ Parte das estações reprodutivas: 44% (11)

**Figura 11.** Percentuais encontrados na análise de fidelidade ao ninho e o número de ninhos entre parênteses. **A.** porcentagem e número de ninhos nos quais foi inferido: nenhum parental retornou e/ou presença PNI (0); um parental retornou e/ou presença de PEP (1/2); o mesmo casal retornou uma (1), duas (2) ou três (3) vezes; **B.** porcentagem de retornos de casais que ocorreram em estações reprodutivas consecutivas e não consecutivas; **C.** porcentagem de retornos em todas ou e em parte das estações reprodutivas amostradas.

Algumas observações de campo do comportamento dos casais feitas pela equipe do Instituto Arara Azul (BARBOSA, com. pessoal) permitem levantar suspeitas de se tratarem dos mesmos indivíduos adultos. Por exemplo, quando os pesquisadores se acercam do ninho, certos indivíduos sempre se empoleiram no mesmo local e/ou sempre defendem o ninho da mesma maneira. Assim, essas observações sugerem que o mesmo casal ocupou o ninho 23 durante as estações reprodutivas de 2014 e 2015, e em estações seguintes, ocupou os ninhos 51, 61 e 63. As observações são concordantes com os resultados das análises de parentesco que encontraram evidência de retorno para o ninho 23 (comparação de filhotes de 2014 e 2015: 1 par de FS e 1 de U), ninho 51 (comparação de filhotes de 2017 e 2018: de 6 pares de filhotes categorizados, 2 de FS, 3 de HS e 1 de U), ninho 61 (comparação de filhotes de 2017 e 2018: 1 par FS e 2 pares HS) e ninho 63 (comparação de 2 pares de filhotes de 2015 e 2018, sendo 1 FS; Apêndice 11).

Ainda, a equipe do Instituto Arara Azul suspeita que possivelmente o casal do ninho 36 de 2014 estaria ocupando o ninho 98 em 2016 que se localiza a 9,6 m de distância linear (BARBOSA, com. pessoal). Esse tipo de caracterização dos casais que não possuem anilhas, é feito a partir de observações de comportamentos característicos de cada casal, como por exemplo, onde empoleiram e como defendem o ninho e a prole durante os monitoramentos. A análise de parentesco entre os filhotes do ninho 36 de 2014 (19605, 19606 e 19607) com os do ninho 98 de 2016 (19731 e 19732; Apêndice 12) revelou que de 10 pares de filhotes, resultantes da comparação entre 4 estações reprodutivas diferentes, 4 podem ser irmãos-completos, 2 meio-irmãos (2013/2016) e 4 não aparentados (2014/2016 e 2015/2016). Esses resultados indicam que não se pode descartar a hipótese que o mesmo casal que ocupou o ninho 36 em 2014 utilizou o ninho 98 em 2016. Ainda, outras observações em campo sugerem que o mesmo casal que ocupou o ninho 91 (2016), poderia ter ocupado outros ninhos próximos em diferentes estações reprodutivas: ninho 121 em 2017 e 141 em 2018 (todos os ninhos dentro de um raio de 12,78 m). No entanto, a análise de parentesco entre os filhotes amostrados nesses ninhos indicou que os 7 pares seriam não aparentados (Apêndice 12).

Em 2014 no ninho 42 foi observado que o filhote 19609 teve problemas de empenamento e na estação reprodutiva seguinte, os filhotes 19643 e 19644, não sobreviveram após o primeiro voo. Assim, levantou-se a hipótese de que, se esses filhotes forem aparentados, pode haver algum problema genético. A análise de parentesco entre os dois pares de filhotes do ninho 42 das estações reprodutivas de 2014 e 2015 (Apêndice 11) sugerem que eles sejam meio-irmãos, ou seja, que compartilham apenas um progenitor.

## 5. Discussão

---

No presente estudo buscamos inferir o sistema genético de acasalamento e a fidelidade ao ninho de casais de *Ara ararauna*. Para realizar o estudo é necessário obter amostras biológicas e ao aproximar do ninho, os adultos costumam voar para longe, impossibilitando a sua captura. Já os filhotes são capturados dentro do ninho, em idade anterior ao primeiro voo. Assim, dada a dificuldade em capturar indivíduos adultos para realizar a coleta de material biológico e o estresse que o procedimento causa a um adulto, realizamos a análise sem os dados de composição genética dos possíveis progenitores (casal que defende o ninho com filhotes).

As análises do presente estudo foram realizadas baseadas em dados produzidos por *primers* heterólogos. A utilização de *primers* não específicos para a espécie em estudo podem ocasionar a ocorrência de 'alelos nulos' que, se não identificados, podem levar a inferências incorretas sobre o parentesco entre indivíduos (CALLEN et al., 1993). Esse fenômeno é causado por uma mutação no sítio de hibridação do *primer* ao DNA durante a PCR e com isso um dos alelos pode deixar de ser amplificado, o que pode levar à interpretação incorreta de indivíduos heterozigotos serem classificados como homozigotos (ISHIBASHI et al., 1996; BROOKFIELD, 1996). Nesse contexto, nossos resultados das análises populacionais apontaram evidências de alelos nulos nos locos Amac-06 e Amac-13 (Tabela 9). No entanto, ambos foram mantidos nas análises, pois testes iniciais indicaram que os resultados obtidos com e sem esses locos não diferem quanto à categorização de parentesco (resultados não mostrados). Além disso, um dos programas utilizados para inferir a categoria de parentesco, o *ML-Relate*, corrige para a presença de alelos nulos usando estimativas de probabilidade máxima da frequência de alelos nulos em todos os cálculos (WAGNER et al., 2006; KALINOWSKI et al., 2006).

O teste global de probabilidade (Tabela 9) e os testes para excesso e déficit de heterozigotos não encontraram desvios significativos do equilíbrio de Hardy Weinberg para nenhum loco. A ausência de excesso ou déficit de heterozigotos sugere que a população de *A. ararauna* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul está em equilíbrio mutação-deriva, sem sinal de possíveis gargalos genéticos. A heterozigosidade ( $H_e$ ) esperada por loco variou de 0,650 a 0,912 e a heterozigosidade observada variou de 0,697 a 0,910 (Tabela 9). A probabilidade de identidade (PI), diz respeito a probabilidade média de que dois indivíduos não-aparentados e amostrados ao acaso na mesma população tenham o mesmo genótipo nos locos múltiplos, a PI 13 locos combinada foi  $1,4^{-16}$ . O valor global de FIS não variou significativamente de zero, indicando que a população não é endogâmica (Tabela 108). A análise de desequilíbrio de ligação (LD) com correção de Bonferroni evidenciou possível desequilíbrio de ligação apenas entre o par Amac-06 e Amac-17, os demais podem ser considerados marcadores independentes. Com a possível ligação com o *primer* Amac-17 além da probabilidade de apresentar alelos nulos, seria indicado retirar o *Amac-06* da análise de parentesco. No entanto, a permanência do marcador nas análises foi decidida através de um teste *t Student* entre a média do coeficiente de parentesco dos indivíduos amostrados no mesmo ninho na mesma estação reprodutiva, realizadas com

e sem o marcador, nos seis anos de amostragem. Como não houve desvio das médias (resultados não apresentados), o marcador foi mantido nas análises subsequentes.

O conjunto de 13 microssatélites analisados em 368 filhotes da população natural de Campo Grande revelou 119 alelos (Tabela 108), com média de 9,15 por loco (Tabela 9). A combinação dos dados dos microssatélites obtidos dos filhotes resultou em uma baixa probabilidade de que dois indivíduos amostrados ao acaso apresentem o mesmo genótipo (PI) semelhante a outros estudos (MIÑO et al. 2009; COSTA, 2012). A caracterização da informação polimórfica é importante pois pode influenciar o desempenho dos estimadores de parentesco (BLOUIN, 2003). O alto polimorfismo encontrado combinado à probabilidade de identidade tornam este conjunto de marcadores uma ferramenta eficaz e informativa na atribuição de parentesco em *A. ararauna*, uma vez que os parâmetros indicam alto poder de precisão, atribuindo parentesco a uma porcentagem maior de indivíduos do que outros estudos com metodologias semelhantes (MIÑO et al., 2009; TURJEMAN et al. 2016)

As taxas esperadas de erro na classificação das categorias de parentesco entre pares de filhotes foram estimadas com base em valores de corte específicos nos valores de  $r$  calculados com o estimador de parentesco TrioML (Fig. 6). As estimativas de erro ajudam a conhecer melhor possíveis limitações na precisão das atribuições entre categorias de parentesco adjacentes (Tabela 4). Por exemplo, as categorias de irmãos-completos (FS) e meio-irmãos (HS) incluem valores de  $r$  com 17,2% e 20,3% de sobreposição, respectivamente (Tabela 4). Ainda, as categorias de parentesco não-adjacentes de não-aparentados (U) e FS incluem valores de  $r$  com 1% a 5,9% de sobreposição, respectivamente (Tabela 4). Já era esperado que a distinção entre categorias de parentesco não-adjacentes apresentasse menor sobreposição. Assim, com os dados dos 13 marcadores moleculares podemos, por exemplo, distinguir entre filhotes gerados pelo par social e um filhote cuja progenitora é uma fêmea parasita de ninho, com até 99% de precisão.

Como inferir categorias de parentesco é um procedimento complexo, foi importante estabelecer uma estratégia de fluxo de decisões (Fig. 7) que considera a estimativa de coeficiente de parentesco entre pares de filhotes (valor de  $r$ , *Coancestry*), a análise de verossimilhança de todas as categorias de parentesco, a comparação da probabilidade de categorias de parentesco alternativas com estimativa de suporte estatístico (*ML-Relate*) e a inferência de agrupamento familiar (*Colony*). Esse fluxo de decisões teve como intuito estabelecer critérios objetivos para realizar a categorização do parentesco (BLOUIN, 2003; JONES & ARDREN, 2003; WEIR et al., 2006; KALINOWSKI et al., 2006; WANG, 2010; JONES & WANG, 2010). Essa metodologia permitiu inferir a categoria de parentesco de pares de filhotes de mesmo ninho e mesma estação reprodutiva (Tabela 11; Fig. 9) para avaliar a frequência de irmãos-completos (que foi usado como indício de monogamia genética dos parentais), de meio-irmãos (que foi considerado como indício de paternidade extra-par, PEP) e de não-aparentados (que foi usado como indício de parasitismo de ninho intraespecífico, PNI; Tabela 12). Ainda, a análise do parentesco entre filhotes amostrados no mesmo ninho, mas em estações reprodutivas diferentes (Tabela 13; Fig. 10) permitiu avaliar a frequência de indícios de nenhum parental retornar e/ou presença de PNI (filhotes

não-aparentados), um parental retornar e/ou presença de PEP (filhotes meio-irmãos) e o mesmo casal retornar ao ninho (filhotes irmãos-completos; Tabela 14).

### **5.1 Parentesco genético de filhotes do mesmo ninho e mesma estação reprodutiva e sistema de acasalamento genético: fatores que influenciam na frequência de paternidade extra-par e suas implicações**

A utilização de ferramentas moleculares em estudos sobre a biologia reprodutiva (BURKE & BRUFORD, 1987) revolucionou o entendimento sobre o sistema de acasalamento das aves. Quase quatro décadas depois, mais de 500 estudos detectaram PEP em mais de 340 espécies de aves, tornando o uso de marcadores moleculares indispensável para analisar sistemas de acasalamento social, sexual e genético (GRIFFITH, 2002).

Um levantamento de estudos realizados até o momento (BROUWER, L. & GRIFFITH, S. C. 2019) revelou que em 386 populações de 255 espécies de aves socialmente monogâmicas com cuidado biparental, a poliandria genética (PEP) foi detectada em 76% das espécies, apresentando uma grande variação nas taxas de PEP entre as espécies estudadas. Em 30% dessas espécies, a PEP foi rara, com menos de 5% das ninhadas contendo descendentes extra-par. Já em 13% das espécies mais de 50% das ninhadas continham pelo menos um filhote extra-par. Em média, nas espécies de aves socialmente monogâmicas com cuidado biparental em que a poliandria genética foi encontrada, aproximadamente 19% da prole foi gerada por um macho extra-par em 33% das ninhadas (BROUWER, L. & GRIFFITH, 2019).

A primeira análise de PEP publicada com alguma espécie da família *Psittacidae* foi de Melland (2000), com o intuito de investigar o sistema de acasalamento genético e a estrutura populacional de *Poicephalus rufiventris*. Os resultados indicaram que o sistema de acasalamento era poligínico, com os machos acasalando-se com várias fêmeas e alguns acasalamentos monogâmicos em menor grau. Masello e colaboradores (2002) analisaram 49 ninhadas de onze casais de *Cyanoliseus patagonus*, indicando um par não-aparentado resultante de PNI e nenhuma evidência de PEP, caracterizando a espécie como social e geneticamente monogâmica. Outro estudo com 154 filhotes e 42 adultos de *Myiopsitta monachus* encontrou PEP em 40% das ninhadas e PNI em 3% (MARTÍNEZ et al., 2013).

Caparroz e colaboradores (2011) avaliaram o sistema de acasalamento de *Ara ararauna* por meio de DNA *fingerprint*. Foram analisados 22 filhotes de 11 ninhos naturais em três localidades (Peixe, TO; Cavalcante, GO e Corginho, MS) com uma sonda de minissatélite multilocos. Considerando outras três ninhadas analisadas previamente (CAPARROZ et al., 2001), apenas um par de filhotes (7%) não foi classificado como irmãos-completos e, sem os genótipos dos progenitores não foi possível afirmar se era um filhote extra-par ou então um filhote fruto de parasitismo de ninho, mas a baixa similaridade aponta para um possível evento de PNI. O resultado foi congruente com a maioria dos estudos anteriores com psitacídeos, nos quais foram encontradas taxas baixas ou inexistentes de PEP, o que

foi atribuído ao sistema social monogâmico, à longevidade das espécies e ao cuidado biparental. Assim, Caparroz e colaboradores (2011) caracterizaram a espécie como social e geneticamente monogâmica.

No presente estudo utilizamos 13 microssatélites para comparar as categorias de parentesco de pares de filhotes do mesmo ninho e pares de filhotes de ninhos diferentes na população natural de *A. ararauna* em Campo Grande (Tabela 5). O valor médio do coeficiente de parentesco entre filhotes de ninhos distintos tem forte evidência de desvio do valor médio estimado entre filhotes do mesmo ninho em todas as estações reprodutivas analisadas, indicando que há diferença significativa entre o parentesco dos dois grupos (Tabela 10). Todos os valores médios dos coeficientes de parentesco de pares de filhotes do mesmo ninho ficaram dentro do intervalo de valores para irmãos-completos (Tabela 10).

Como os filhotes foram amostrados em idade anterior à aprendizagem de voo, não consideramos encontrar algum filhote de outro ninho por engano durante a amostragem. Assim, a presença de filhotes meio-irmãos e não-aparentados no mesmo ninho pode ser inferida como resultado de diferentes estratégias reprodutivas (como PEP e PNI) que não previstas em um sistema de acasalamento genético monogâmico.

Ainda que os genótipos dos progenitores não puderam ser acessados para confirmação de maternidade e paternidade (com exceção de duas possíveis paternidades, ver adiante), foi possível distinguir entre as possíveis categorias de parentesco entre irmãos putativos. Consideramos que, baseado no fluxo de decisões (Fig. 7) bastante conservativo e nas taxas de sucesso de atribuição a categorias de parentesco (Tabela 4), as categorias de parentesco entre irmãos putativos que puderam ser inferidas devem estar corretas. Dos 159 pares de filhotes de mesmo ninho analisados, 133 puderam ter suas categorias de parentesco inferidas (83,64%; Tabela 11). A grande maioria dos pares de filhotes categorizados são de irmãos-completos (100 pares, 75,18%; Tabela 11; Fig. 9). Isso pode estar associado à grande longevidade da espécie (expectativa de vida máxima de 48,52 anos; YOUNG et al., 2012) e ao alto investimento parental observado (BARBOSA, com. pessoal). Esses dois fatores são levantados como sendo importantes na manutenção da monogamia genética (MASELLO & QUILLFELDT, 2002). Ainda, os indivíduos de *A. ararauna* são sempre avistados em casais ou pequenos grupos, o que pode dificultar a cópula extra-par (CEP; GUEDES, 2012).

Cerca de 24 pares de filhotes (18,04% dos pares classificados) apresentaram resultados congruentes e com suporte estatístico indicando que seriam meios-irmãos. Finalmente, os 9 pares de filhotes restantes (6,76% dos pares classificados) foram considerados como não-aparentados (Tabela 11; Fig. 9). Somente a estação reprodutiva de 2013, com o menor número de ninhos analisados ( $n = 15$ ; Tabela 5 e 11), não apresentou nenhum par de filhotes que fosse meio-irmão ou não-aparentado, mas 5 dos 17 pares de filhotes de 2013 não puderam ser categorizados (Tabela 11). Devido à ausência dos genótipos parentais, apenas PEP e PNI parciais de ninhadas podem ser detectadas baseadas na análise de irmãos putativos. Em outras palavras, para detectar PEP e PNI da ninhada completa, ou seja, toda a prole ser do macho extra-par e toda prole ser de outro casal, é necessário ter amostras dos possíveis parentais para comparação. A nossa limitação de amostragem somente permitiu

comparar os filhotes entre eles, ou seja, pode ser que alguns dos irmãos-completos sejam fruto de PEP ou PNI, mas não é possível confirmar sem os genótipos parentais.

Os 24 pares de filhotes (18,04%) que apresentaram resultados congruentes e com suporte estatístico indicando que seriam meios-irmãos, sugerem que cada par compartilha apenas um progenitor, possivelmente devido à ocorrência de PEP na ninhada (Tabelas 11 e 12; Fig. 9). A possível existência de PEP também não foi refutada pelos nossos resultados de exclusão da paternidade entre pares de indivíduos sugeridos como possíveis progenitor-prole baseados em observações de campo. Tanto o macho 19558 quanto o 19722 não foram atribuídos como progenitores da prole analisada (Apêndice 10). Esses machos possuíam 5 e 2 anos de idade quando foram observados em reprodução. Como *A. ararauna* deve atingir a maturidade reprodutiva ao redor dos 5 anos (CAPARROZ et al., 2001), é possível que ambos, mas principalmente o 19722, sejam ainda jovens demais para se reproduzirem com sucesso e sua parceira pode ter sido fertilizada por outro macho.

Nosso resultado de ocorrência de PEP em *A. ararauna* difere de relatos anteriores para a espécie (com possivelmente 0% PEP; CAPARROZ et al., 2011) e também de uma espécie próxima, *Ara chloropterus*. Para essa última espécie, um ninho apresentou similaridade genética entre filhotes congruente com não-aparentados (possível PNI), o que foi atribuído à disputa do ninho por dois casais (CAPARROZ, 2001). Entretanto, nossos resultados foram similares às de outros psitacídeos como *Amazona brasiliensis* que, de 71 pares de filhotes analisados, 21% poderia ser resultado de PEP (FERNANDES, 2015). Apesar dos riscos inerentes à CEP, principalmente para a fêmea, em teoria quando bem sucedida, a CEP agrega os benefícios da PEP (melhora da aptidão dos filhotes e aquisição de “bons genes”) com os benefícios da monogamia social (parceiro fixo e cuidado parental), e os benefícios ecológicos como a possibilidade de forragear nos territórios dos machos extra-par, a oportunidade de explorar potenciais futuros parceiros e a precaução em relação à possível infertilidade do parceiro social (CÉZILLY & NAGER, 1995; GRAY, 1997; NEFF & PITCHER, 2005; GRIFFITH, 2007; ALCOOCK, 2009). No entanto, não há dados sobre esses possíveis benefícios no caso de *A. ararauna*.

Observações obtidas com base em dez estudos com Ciconiiformes (MIÑO & DEL LAMA, 2009) propõem que os benefícios genéticos são mais relevantes para indivíduos envolvidos em CEP, isso porque muitas espécies da ordem reproduzem-se em grandes colônias, portanto, a disponibilidade de alimento e território são menos atrativas. No entanto, *A. ararauna* possui reprodução isolada e compete por ninhos (BARBOSA, 2015), assim, não se pode descartar a possibilidade de os benefícios ecológicos terem certo grau de importância (AGUILERA & ÁLVAREZ, 1989; BARBOSA, 2018). Ainda em uma espécie de Ciconiiformes, Aguilera e Álvarez (1989) propuseram que nenhum dos custos associados à CEP seriam importantes, pois não foi observado nenhum tipo de retaliação e/ou agressão ao parceiro “infiel”, nem competição ou agressão entre os filhotes devido ao menor grau de parentesco.

Finalmente, os 9 pares de filhotes restantes (6,76%; Tabela 11; Fig.9) foram classificados como não-aparentados, o que poderia ser fruto de ocorrência de competição ou parasitismo de ninho intraespecífico (PNI; Tabela 12). A competição intraespecífica por cavidades é um comportamento raramente observado e há apenas um registro de abandono de ninho com a ejeção dos ovos pelo casal

que ocupou o ninho na sequência (BARBOSA, 2015). Assim, a competição por ninhos parece ser um evento muito raro em *A. ararauna*. No entanto, o PNI parece ser uma estratégia mais comum do que se pensava, sendo relatado para mais de 230 espécies de aves, mas com maior probabilidade de ocorrer em espécies que se reproduzem em colônias (GLADSTONE, 1979; BROWN & BROWN, 2001). No presente estudo, o PNI foi encontrado em frequência similar a um estudo anterior com *A. ararauna* (7%; CAPARROZ et al., 2011) e condiz com observações do comportamento reprodutivo dos casais em Campo Grande. Por exemplo no ninho 87, um possível caso de PNI foi observado pela equipe de campo do Instituto Arara Azul e confirmado pela análise de parentesco (Apêndice 7). Esse resultado está de acordo com estudos anteriores com psitacídeos nos quais as taxas de PNI encontradas são baixas, indicando que, em teoria, esse comportamento pode não resultar em altos ganhos de aptidão para as fêmeas (MASELLO et al., 2002; TAYLOR & PARKIN, 2009; DIAS & MACEDO 2011; MARTÍNEZ et al., 2013; MANICA et al. 2016). Ninhadas supranumerárias podem ser um forte indício de PNI, como por exemplo, em *Myiopsitta monachus* (MARTÍNEZ et al., 2013), mas nas seis estações reprodutivas analisadas de *A. ararauna* houve apenas um ninho com número de ovos acima da média que poderiam explicar o PNI (ninho 84; 8 ovos; BARBOSA, com. pessoal), mas dos dois filhotes sobreviventes, apenas um foi genotipado. A presença de alta densidade populacional também pode promover o PNI devido ao aumento de oportunidades para parasitar (ROSSMANITH et al., 2006). Martínez e colaboradores (2013) sugerem que por conta dos ninhos comunais construídos por *M. monachus* a PEP e o PNI podem ser favorecidas pela proximidade dos ninhos multicâmaras se comparado com áreas com menor densidade de ninhos. Diante disso, em breve vamos avaliar se a frequência de PEP e PNI é maior em áreas de Campo Grande onde a densidade de ninhos é maior.

De acordo com a análise de todos os ninhos nas seis estações reprodutivas (224 ninhos; Tabela 11), foi constatado que 9,82% (n = 22) desses ninhos apresentavam pelo menos um filhote extra-par, e, 4,01% (n = 9) dos ninhos continham filhotes não-aparentados. Esse percentual pode ser ainda maior se considerarmos que pode haver casos de ninhadas completas de PEP e PNI que não podem ser detectadas sem os genótipos paternos. Além disso, a análise de PEP deve detectar somente uma fração de CEP, ou seja, aquelas que foram bem-sucedidas na fertilização, produção e sobrevivência da prole. Dessa forma, a frequência de CEP deve ser maior que a frequência de PEP.

A diferença encontrada na frequência de PEP e PNI (tanto para o número de pares de filhotes quanto para o número de ninhadas) entre o presente estudo e o realizado por Caparroz e colaboradores (2011), pode ser devido ao número amostral. A diferença de amostragem de ninhos e de pares de filhotes foi de 210 e 145, respectivamente, além do maior número de marcadores moleculares, assim como o avanço das análises estatísticas e implementação de novos programas de análise (Tabela 2 e 5).

Em espécies socialmente monogâmicas, desvios da razão sexual entre machos e fêmeas também podem levar a um aumento da frequência de PEP e a mudanças no sistema de acasalamento genético de monogâmico para poligâmico, devido a alguns indivíduos não encontrarem um parceiro para formar casal e assim poderiam buscar copular com parceiros já pareados. No entanto, as análises de qui-quadrado dos resultados da sexagem molecular não mostraram evidências de desvio da razão

sexual esperada (1:1), portanto não há viés na razão sexual que poderia impulsionar a PEP (FISHER, 1930; HEINSOHN et al., 2018).

As médias dos coeficientes de parentesco (Tabela 10), associados aos resultados da análise de parentesco para cada um dos ninhos das seis estações reprodutivas (Tabela 11; Fig. 9), indicaram que a maioria dos pares de filhotes de mesmo ninho devem ser irmãos-completos, resultado esperado de acordo com a hipótese de que a longevidade da espécie e o cuidado parental por parte do macho são fatores de manutenção da monogamia genética (MASELLO et al., 2002; GRIFFITH et al., 2010). A longevidade pode aumentar a duração do vínculo do casal e ter um impacto na proporção reprodutiva que os adultos investem em cada tentativa de reprodução, ou seja, a maior expectativa de vida leva a maiores possibilidades de cópula em diferentes estações reprodutivas, e os indivíduos tendem a investir menores proporções, enquanto que indivíduos de espécies com baixa sobrevivência na fase adulta (MAUCK et al. 1999; BENNETT & OWENS 2002), devem investir mais em cada tentativa de reprodução, incluindo em CEP para garantir descendentes. A maior longevidade também pode afetar as estratégias de cuidado parental e, conseqüentemente, os padrões de acasalamento, incluindo a frequência de PEP (REBOREDA et al., 2019). Da mesma maneira, um maior cuidado parental por parte do macho e a sua conseqüente presença no ninho pode ter uma relação inversa com a ocorrência de PEP (GRIFFITH et al., 2002). O cuidado parental está intimamente relacionado à sobrevivência da prole, de forma que, se o cuidado do macho for essencial, as fêmeas podem evitar procurar CEP caso haja o risco de perder o investimento do parceiro na ninhada e assim arcar com todos os custos do cuidado parental. Em particular, os machos de espécies de aves de vida longa interrompem o cuidado parental da ninhada se houver qualquer dúvida sobre o parentesco (MULDER et al. 1994; GOWATY, 1996; MAUCK et al., 1999).

Uma hipótese proposta para explicar a variação nas taxas intraespecíficas de PEP em diferentes espécies de aves, é a da monopolização de recursos (EMLEN & ORING, 1977). Segundo essa hipótese, a retenção dos recursos por indivíduos de um sexo levaria ao aumento no sucesso reprodutivo do mesmo, sugerindo que a sincronia reprodutiva e a densidade de ninhos possam ser fatores que influenciam as taxas de PEP. A sincronia reprodutiva (STUTCHBURY & MORTON, 1995) permite que as fêmeas tenham maior possibilidade de comparar a qualidade de potenciais parceiros de acasalamento quando estes se exibirem de forma síncrona, o que pode também promover mais chances de CEP. Por outro lado, a sincronia reprodutiva pode restringir o comportamento do macho, reduzindo as oportunidades de CEP, já que os machos que realizam comportamento de guarda da parceira terão que escolher entre buscar CEP e proteger suas parceiras férteis (BIRKHEAD & BIGGINS, 1987; WESTNEAT et al. 1990).

O fato da população analisada no presente estudo nidificar em área urbana também poderia ser um fator que influencia as taxas de PEP, entretanto, estudos como o de Westneat e Mays (2005) testaram o efeito do habitat em 1.479 filhotes de *Agelaius phoeniceus* de 537 ninhadas em 235 territórios diferentes e não encontraram suporte para o efeito da estrutura do *habitat* na incidência de PEP, assim como para *Sula nebouxii* (RAMOS et al., 2014;) e *Turdus albicollis* (BIAGOLINI et al.,

2017). Não há evidências até o momento de que os tipos de vegetação e *habitat* influenciem o nível de PEP encontrado em diferentes espécies de aves (BROUWER & GRIFFITH, 2019).

A PEP pode ter custos em termos de risco, tempo e energia investidos na busca por parceiros, mas os benefícios dessa escolha explicam sua evolução e manutenção, incluindo melhorias na sobrevivência e fecundidade individuais, bem como a qualidade genética da prole (ANDERSSON, 1994). Essa teoria também é reforçada por Birkhead e Møller (1992) que propuseram que a manutenção de uma determinada taxa de PEP é impulsionada pelos benefícios que ela traz para machos e fêmeas (PETRIE & KEMPENAEERS, 1998; PETRIE et al. 1998; VEDDER et al. 2010).

Griffith e colaboradores (2002) propuseram que a verdadeira monogamia genética só pode ser caracterizada quando não ocorre fertilização extra-par. Os dados de observações em campo de *A. ararauna* (BARBOSA, com. pessoal) e várias características da espécie como grande longevidade (YOUNG et al., 2012) e cuidado biparental (BARBOSA, com. pessoal; BIANCHI & MACEDO, 1998) indicam que seu comportamento social é monogâmico (GUEDES, 2012). Congruentemente, dos 133 pares de filhotes que puderam ter sua categoria de parentesco inferida (Tabela 11), foi encontrado que somente 33 (24,81%) não sejam irmãos-completos, ou seja, *A. ararauna* é predominantemente monogâmica geneticamente, mas também apresenta poliandria genética e PNI (Tabela 12).

## **5.2 Fidelidade ao ninho: fatores que influenciam e suas implicações**

A fidelidade ao sítio de nidificação é caracterizada pelo uso repetido da mesma cavidade para nidificação por pelo menos duas estações reprodutivas, consecutivas ou não e é frequentemente associada ao sucesso reprodutivo (COLLIAS & COLLIAS, 1984; MARTIN, 1995; MACDONALD et al. 2016). A fidelidade aos locais de nidificação pode ser benéfica para algumas aves devido a uma série de razões. Essa fidelidade permite que os reprodutores tenham familiaridade com os locais de forrageamento e abrigo (GREENWOOD & HARVEY, 1982). Além disso, a fidelidade aos locais de nidificação oferece relação de familiaridade com vizinhos próximos (YASUKAWA, 1979; PICMAN, 1987). Ainda, retornar ao ninho onde a reprodução ocorreu com sucesso pode indicar que seja um local bem protegido de predadores (GREENWOOD & HARVEY, 1982). Portanto, é comum observar uma alta fidelidade aos locais de nidificação em muitas espécies de aves monogâmicas (GREENWOOD & HARVEY, 1982).

Com base nas comparações entre pares de filhotes amostrados no mesmo ninho, mas de diferentes estações reprodutivas (Tabela 6), é possível fazer algumas inferências sobre a reocupação de uma mesma cavidade por um único casal ou se vários casais utilizam o mesmo ninho em anos diferentes.

Embora as araras tenham capacidade de voo significativa, informações de campo sugerem que os casais de *A. ararauna* apresentam fidelidade ao sítio de nidificação, retornando ao mesmo ninho para se reproduzir (BARBOSA, 2015). Assim, no presente estudo realizamos análises de parentesco entre pares de filhotes amostrados no mesmo ninho mas de diferentes estações reprodutivas para

inferir se um ninho pode ser reocupado em anos diferentes por um mesmo casal ou não. Analisamos 371 pares de filhotes de 57 ninhos em seis estações reprodutivas diferentes (Tabela 6), sendo que 336 pares puderam ter sua categoria de parentesco inferida (Tabela 13; Fig 10). Desses 336 pares, 84 eram de irmãos-completos (25%), 44 de meios-irmãos (13,1%), 208 não-aparentados (61,9%; Tabelas 13 e 14; Apêndice 11). Esses resultados de parentesco entre os filhotes sugerem que existem eventos de retorno do mesmo casal ao ninho, mas em não em todos os ninhos e não em todos os anos (Tabelas 13 e 14; Fig. 10).

Baseado na presença ou não de irmãos-completos no mesmo ninho e em anos diferentes foi possível inferir sobre o retorno do mesmo casal em 42 dos 57 ninhos analisados (Tabela 14; Fig. 11A). Desses 42 ninhos, em 25 (59,52%) foram encontrados pares de filhotes irmãos-completos de diferentes estações reprodutivas, indicando que houve pelo menos um evento de retorno de casal de *A. ararauna* (Tabela 14; Fig. 11A). Para 17 dos 42 ninhos (40,48%) todos os pares filhotes amostrados foram classificados como não-aparentados (Tabelas 13 e 14; Figs. 9 e 11A). Existem duas possibilidades para explicar a presença de pares de filhotes não-aparentados: 1) não houve retorno do mesmo casal ao ninho, por isso os filhotes não são aparentados; 2) um dos filhotes envolvidos na comparação era fruto de PNI, portanto, não tem relação de parentesco com o par social e assim não é relacionado geneticamente ao outro filhote, levando a uma inferência incorreta de que não houve retorno do casal.

Foram encontradas evidências de um, dois e três retornos do mesmo casal para 42,59% (n = 23), 1,85% (n = 1) e 1,85% (n = 1) dos ninhos, respectivamente, totalizando 46,29% dos ninhos onde as relações de parentesco puderam ser inferidas (Fig. 11A). Cerca de 72% dos casais que ocuparam o mesmo ninho em mais de uma estação reprodutiva, o fizeram em anos consecutivos (Tabela 14; Fig. 11B), corroborando os dados de campo que indicam que os casais devem se reproduzem anualmente (BARBOSA, 2015). Destes 25 ninhos em que o mesmo casal retornou ao menos uma vez, 56% deles (n = 14) foram ocupados pelo mesmo casal em todos os anos em que foram amostrados filhotes do ninho (Fig. 11C). Um exemplo é o ninho 6, cujos 29 pares de filhotes amostrados revelaram 19 pares de irmãos-completos em três estações reprodutivas diferentes.

Observações de campo que indicavam possível retorno do mesmo casal a determinados ninhos foram congruentes com os resultados encontrados na análise de parentesco dos ninhos 23, (2014/2015), 51 (2017/2018), 61 (2017/2018) e 63 (2015/2018) e estão de acordo com outros estudos com psitacídeos. Por exemplo, no estudo realizado por Rodriguez Castillo e Eberhard (2006), foi encontrada uma taxa de retorno ao ninho de 74% por *Amazona ochrocephala*. Berkunsky e Reboreda (2008) observaram taxas de reocupação de cavidades por 68% das fêmeas anilhadas de *Amazona aestiva* por um ou dois anos consecutivos. Os autores atribuem o retorno dos casais às cavidades a ao sucesso reprodutivo na estação anterior.

Em 21,53% dos ninhos (n = 12) de *A. ararauna* ao menos um par de indivíduos foi classificado como meio-irmão e nenhum como irmão-completo. Duas possibilidades podem explicar esse resultado: 1) Não houve retorno do mesmo casal, mas de apenas um dos progenitores, portanto o par de filhotes é meio-irmão; 2) Houve retorno do mesmo casal ao ninho, mas um dos filhotes analisados (ou todos)

na comparação é fruto de PEP, ou seja, só compartilham um progenitor e são meios-irmãos. Por exemplo, o ninho 106 onde foram amostrados três filhotes em 2017 e dois em 2018, gerando seis pares de filhotes, cinco deles foram classificadas como meios-irmãos e um como não-relacionado, indicando que os filhotes devem compartilhar apenas um progenitor (Tabelas 13 e 14).

É esperado que casais que se reproduziram com sucesso apresentassem maior probabilidade de nidificar no mesmo local e aqueles que sofreram predação de ninhos têm maior probabilidade de mudar o local de reprodução (POWELL & FRASCH 2000; BECKMANN et al., 2015). Essa tem sido uma estratégia comum para muitas aves monogâmicas (GREENWOOD & HARVEY 1982). Dentre os sete ninhos onde foram registrados os maiores números de filhotes com sobrevivência registrada até o primeiro voo (ninhos 8, 25, 46, 51, 61, 66 e 78; Apêndice 1; Tabela 14), quatro foram ocupados pelo mesmo casal em duas estações reprodutivas (46, 51, 61 e 78), um foi ocupado durante três (ninho 66) e dois ninhos apresentaram evidência de retorno de um dos progenitores (ninhos 8 e 25; Tabela 14). Cinco desses ninhos apresentaram algum indício de PEP para os pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na mesma estação reprodutiva, sendo eles, ninho 8: 2015; ninho 25: 2014 e 2016; ninho 46: 2018 (indício sem suporte estatístico; Apêndice 9); ninho 51: 2014 (indício sem suporte estatístico; Apêndice 5) e 2015 (Tabela 12; Apêndice 6) e o ninho 61, que apresenta dois pares de meio-irmãos em 2018 (e outro com indício sem suporte estatístico em 2015; Tabela 12). Apenas dois ninhos não apresentaram nenhum indício de PEP, o ninho 66 em que foram amostrados oito filhotes em três estações reprodutivas diferentes e o ninho 78 em que oito filhotes foram amostrados em 4 anos (Apêndices 4-9). É importante ressaltar que o ninho 66 foi ocupado pelo mesmo casal em três estações reprodutivas, 2015, 2017 e 2018, sendo que nas duas primeiras, três filhotes sobreviveram e a média de sobrevivência até essa idade para a população de *A. ararauna* de Campo Grande é 1,4 juvenil/casal (BARBOSA, 2018; Apêndice 1).

Dois ninhos com duas ocorrências de PEP dentro da mesma ninhada (ninhos 8 e 25, Tabela 12), nenhum apresentou evidência de reocupação pelo mesmo casal, mas ambos apresentaram pares de filhotes meio-irmãos em anos diferentes, sugerindo que um dos progenitores pode ter retornado à cavidade (Tabelas 13 e 14). No ninho 8 foram encontradas evidências de possíveis filhotes frutos de PEP e PNI na mesma ninhada e em diferentes estações reprodutivas, através da presença de pares de filhotes classificados como meio-irmãos, sugerindo que há fidelidade de um dos progenitores e pares de filhotes não-aparentados, sugerindo que um desses filhotes pode ter sido colocado neste ninho por uma fêmea parasita (Tabela 12 e 13). No ninho 76, onde foram detectadas diferentes estratégias na mesma estação reprodutiva (possível filhote fruto de PEP e outro de PNI), foram encontradas evidências de três reocupações da cavidade pelo mesmo casal (Tabelas 12 e 13).

Esses dados sugerem que o sucesso reprodutivo em alguns ninhos (baseado no número de filhotes sobreviventes maior do que a média) pode não estar associado à fidelidade do casal e ao retorno ao ninho, mas é possível que diferentes estratégias reprodutivas, como a PEP, podem oferecer benefícios genéticos e ecológicos, enquanto o aumento de ovos no ninho pode ser devido a eventos de PNI (CÉZILLY & NAGER, 1995; GRAY, 1997; GRIFFITH, 2007). Entretanto, a sobrevivência dos filhotes do ninho 66 acima da média e a monogamia genética inferida entre o par social podem estar

associados à maior fidelidade desse casal ao ninho. Nenhuma das duas alternativas pode ser descartada nesse momento.

A diferença de número de retornos dos casais para o mesmo ninho entre estações reprodutivas (Tabela 14) pode ser explicada pela perda de ninhos ou pela ocupação por outras espécies que também se reproduzem em cavidades arbóreas como araras-híbridas (geradas do cruzamento de *A. ararauna* com *A. chloropterus*), tucanos (*Ramphastos toco*) e maracanã-de-cara-amarela (*Ortopsittaca manilata*; BARBOSA, 2015; dados de campo). Com relação à perda de ninhos, BARBOSA (2018) averiguou que na área urbana de Campo Grande 46 ninhos ativos utilizados por *A. ararauna* foram perdidos em sete anos, sendo 58,7% removidos e 41,3% que caíram naturalmente, pois são palmeiras mortas, em decomposição. Essas palmeiras têm vida útil média como abrigos de ninhos de quatro anos, variando de um a sete. A queda anual variou de quatro (2016) até 23 ninhos (2017). As remoções ocorrem para abrir espaço para construções e devido ao risco de queda. Como encontramos evidências de retorno de alguns casais ao mesmo ninho, a remoção e a queda dos ninhos deve causar impacto negativo na nidificação, principalmente para os casais que apresentam o comportamento de retorno ao ninho, fazendo com que busquem uma cavidade, aumentando a competição entre casais de *A. ararauna* e de outras espécies que ocupam cavidades.

Dos 57 ninhos analisados quanto à fidelidade do casal, 51 deles foram perdidos, 30 caíram naturalmente, 19 foram removidos, dois tiveram perda por motivo indefinido e um não é mais monitorado (BARBOSA, com. pessoal; Tabela 6). Restam cinco ninhos, 36, 45, 76, 93 e 119. Os ninhos 36 e 45, mesmo disponíveis, não estão ativos (com postura de ovos) desde 2015 e 2017, respectivamente. Já os ninhos 76, 93 e 119 foram ocupados até a última estação reprodutiva.

*A. ararauna* se tornou símbolo da cidade de Campo Grande, e trouxe benefícios inclusive para a economia, através do turismo ecológico. Com o aumento da sua população e com a crescente necessidade de cavidades naturais para a reprodução, em 2018 foi sancionada a Lei Municipal nº6.075 que proíbe a remoção de árvores utilizadas como ninhos pela espécie. Essa medida visou diminuir a perda de ninhos e salvaguardar a reprodução da espécie, já que a oferta de ninhos pode ser um fator crítico (BIANCHI & MACÊDO, 1998; GUEDES, 2004; BARBOSA, 2015; BARBOSA, 2018; DIOGRANDE, 2018).

## 6. Conclusões

---

- ❖ O valor médio do coeficiente de parentesco entre filhotes de *Ara ararauna* amostrados no mesmo ninho foi significativamente maior do que o entre filhotes de ninhos diferentes e indica grau maior de parentesco entre eles, sugerindo que os marcadores selecionados e a metodologia utilizada foram informativos para inferir categorias de parentesco.
- ❖ O grau de parentesco genético entre 18,04% pares de filhotes amostrados no mesmo ninho, tem forte evidência de desvio do valor esperado para irmãos-completos, sugerindo um sistema de acasalamento genético diferente da monogamia para *A. ararauna*. Apesar disso, a grande maioria dos pares de filhotes amostrados no mesmo ninho apresenta fortes evidências de serem irmãos-completos, o que sugere monogamia genética do casal parental.
- ❖ A espécie apresenta estratégias mistas de reprodução em frequência baixa, incluindo o parasitismo de ninho intraespecífico detectado em 6,76% de pares de filhotes não-aparentados.
- ❖ Houve reocupação do mesmo ninho pelo mesmo casal ao menos uma vez em 45,45% dos ninhos, sendo 72% deles em anos consecutivos. Isso mostra a importância de preservar as palmeiras na cidade de Campo Grande.
- ❖ As observações em campo de longo prazo são essenciais para a interpretação dos resultados das análises genéticas. Algumas dessas observações puderam ser testadas com as análises genéticas dos filhotes e resultaram em informações importantes para a melhor compreensão da biologia reprodutiva de *A. ararauna*.

## 7. Referências

---

- AGUILERA, E. & ÁLVAREZ, F. (1989). Copulation and mate guarding of the Spoonbill (*Platalea leucorodia*). *Behavior*, 110: 1-4.
- ALATALO, R. V., GUSTAFSSON, L. & LUNDBERG, A. (1984). Why do young passerine birds have shorter wings than older birds? *Ibis*, 126: 410– 415.
- ALCOCK, J. (2005). *Animal Behavior: an Evolutionary Approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- ALCOCK J. (2009). *Comportamento Animal. Uma abordagem evolutiva*. Artmed Editora S.A., Porto Alegre.
- ANDERSSON, M. & ERIKSON, O. G. (1982). Nest parasitism in goldeneyes *Bucephala clangula*: some evolutionary aspects. *The American Naturalist*, 120: 1-16.
- ANDERSSON M. (2017). Helping relatives survive and reproduce: inclusive fitness and reproductive value in brood parasitism. *The American Naturalist*, 189:138-152.
- ARNQVIST, G. & KIRKPATRICK, M. (2005). The evolution of infidelity in socially monogamous passerines: the strength of direct and indirect selection on extrapair copulation behavior in females. *The American Naturalist*, 165: S26–S37.
- ASHLEY, M. V. et al. (2009). Full Sibling Reconstruction in Wild Populations from Microsatellite Genetic Markers. In: RUSSE, A.S. (Ed.), *Computational Biology: New Research*. Nova Publishers, Hauppauge. Pp. 231– 258.
- AVISE, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland.
- BARBOSA, L. T. (2018). Fatores que influenciam o sucesso reprodutivo da arara-canindé (*Ara Ararauna*) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Tese (Doutorado), Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande.
- BARBOSA, L. T., SILVA, M. H. S., FAVERO, S. & GUEDES, N. M. R. (2015). Avaliação do sucesso reprodutivo da arara-canindé (*Ara ararauna* - Psittacidae) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado), Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande.
- BECKMANN, C., BIRO, P. A. & MARTIN, K. (2015). Hierarchical analysis of avian re-nesting behavior: mean, across-individual, and intra-individual responses. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69: 1631–1638.
- BEIGUELMAN, B. (1996). *Curso de Bioestatística Básica*. 4ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- BENNET, P. M. & OWENS, I. P. F. (2002). *Evolutionary Ecology of Birds: Life Histories, Mating Systems and Extinction*. Oxford University Press, Oxford.
- BERGALLO, H. G., ROCHA, C. F. D., SLUYS, M. V. & ALVES, M. A. S. (1999). A fauna ameaçada do Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Hoje*, 26: 18 – 23.
- BERKUNSKY, I., MAHLER, B. & REBOREDA, J. C. (2009). Sexual dimorphism and determination of sex by morphometrics in blue-fronted amazon (*Amazona aestiva*). *Emu*, 109: 192-197.
- BIAGOLINI, C., COSTA, M. C., PERRELLA, D. F., ZIMA, P. V. Q., RIBEIRO-SILVA, L. & FRANCISCO, M. R. (2016) Extrapair paternity in a Neotropical rainforest songbird, the white-necked thrush *Turdus albicollis* (Aves: Turdidae). *Zoologia*, 33:e20160068.

- BIANCHI, C. A. C. & MACÊDO, R. H. F. (1998). Biologia Reprodutiva da Arara-canindé (*Ara ararauna*, Psittacidae) no Parque Nacional das Emas, Goiás. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- BIRKHEAD, T. R. & MØLLER, A. P. (1992). Sperm Competition in Birds: Evolutionary Causes and Consequences. Academic Press, London.
- BIRKHEAD, T. R. & MØLLER, A. P. (1993). Female control of paternity. Trends in Ecology and Evolution, 8: 100–104.
- BIRKHEAD, T. R. & BIGGINS, J. D. (1987). Reproductive synchrony and extra-pair copulation in birds. Ethology, 74: 320–334.
- BIRKHEAD, T. R. (1998). Sperm Competition in Birds: Mechanisms and Function. In: BIRKHEAD, T. R. & MØLLER, A. P. (Eds.) Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, London. Pp.: 579–622.
- BLOUIN, M. S., PARSONS, M., LACAILLE, V. & LOTZ, S. (1996). Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. Molecular Ecology, 5 : 393-401.
- BLOUIN, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. Trends in Ecology and Evolution, 18: 503-511.
- BOLOPO, D., RONCALLI, G., CANESTRARI, D. & BAGLIONE V. (2020). Cheating Cheaters: social monogamy but genetic polygamy in a brood parasite. Ardeola, 67 : 39-56.
- BROOKFIELD, J. F. Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. Molecular Ecology, 5: 453-455.
- BROUWER, L. & GRIFFITH, S. C. (2019). Extra-pair paternity in birds. Molecular Ecology, 28: 4864–48820.
- BROWN, C. R. & BROWN, M. B. (2001). Avian Coloniality: Progress and Problems. In: NOLAN Jr, V.; THOMPSON, C. F. Current Ornithology. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- BURKE, T. & BRUFORD, M. (1987). DNA fingerprinting in birds. Nature, 327: 149– 152.
- BURKE, T., DAVIEST, N., BRUFORD, M. & HATCHWELL, B. (1989). Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. Nature, 338: 249–251.
- BUTLER, K., FIELD, C., HERBINGER, C. M. & SMITH. B. R., (2004). Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data. Molecular Ecology, 13: 1589–1600.
- CALLEN, D. F. et. al. (1993). Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. American Journal of Human Genetics, 52: 922–927.
- CAPARROZ, R., GUEDES, N. M. R., BIANCHI, C. A. & WAJNTAL, A. (2001). Analysis of the genetic variability and breeding behaviour of wild populations of two macaw species (Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. Ararajuba, 9: 43-49.
- CAPARROZ, R., MIYAKI, C. Y. & BAKER, A. J. (2011). Genetic evaluation of the mating system in the blueand-yellow macaw (*Ara ararauna*, Aves, Psittacidae) by DNA fingerprinting. Genetics and Molecular Biology, 34: 161–164.
- CASTILLO, A. M. R. & EBERHARD, J. R. (2006). Reproductive behavior of the yellow-crowned parrot (*Amazona chrocephala*) in western Panama. The Wilson Journal of Ornithology, 118: 225-236.

- CEZILLY, F. & NAGER, R. G. (1995). Comparative evidence for a positive association between divorce and extra-pair paternity in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 262: 7–12.
- CHAKRABORTY, R., SHAW, M. & SCHULL, M. J. (1974). Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, 26: 477– 488.
- CHAMBERS, G. K. & MACAVOY, E. S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126 : 455-476.
- COLLAR, N., BOESMAN, P. & SHARPE, C.J. (2019). Blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*). In: DEL HOYO, J., ELLIOTT, A., SARGATAL, J., CHRISTIE, D. A. & DE JUANA, E. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona (retirado de: <https://www.hbw.com/node/54616> em 15/jun/2023).
- COSTA, V. et al. (2012). Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *BMC Research Notes*, 5: 479
- DEWOODY, J. A., WALKER, D. & AVISE, J. C. (2000). Genetic parentage in large half-sib clutches: theoretical estimates and empirical appraisals. *Genetics*, 154: 1907– 1912.
- DEWOODY, J. A. (2005). Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: Practical applications for wild animals. *Journal of Wildlife Management*, 69: 1400- 1418.
- DARWIN, C. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray, London.
- DAVIES, N. B. (1991). Mating systems. In: KREBS, J. R. & DAVIES, N.B. *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 263-294.
- DIAS, R. I. & MACEDO, R. H. (2011). Nest predation versus resources in a Neotropical passerine: constraints of the food limitation hypothesis. *Ornis Fennica*, 88 :30–39.
- DIOGRANDE (2016). Lei complementar n. 287, de 19 de outubro de 2016. *Diário Oficial de Campo Grande, Poder Executivo, Campo Grande, MS. Seção 1. Pp. 4.705.*
- EMLEN, S. T. & ORING, L. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197: 214–223.
- ESHEL, I., VOLOVIK, I. & SANSONE, E. (2000). On Fisher–Zahavi’s handicapped sexy son. *Evolutionary Ecology Research*, 2: 509–523.
- FERNANDES, G. A. (2015). *Comportamento reprodutivo de papagaio-de-cara-roxa (Amazona brasiliensis: Psittacidae, Aves): uma abordagem molecular. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília.*
- FISHER, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection: a Complete Variorum Edition*. Oxford University Press, Oxford.
- FORSYTH, J. M. (1989). *The Parrots of the World*, 3ed. Lansdowne Press, Willoughby.
- FORSTMEIER, W., NAKAGAWA, S., GRIFFITH, S. C. & KEMPENAERS, B. (2014). Female extra-pair mating: adaptation or genetic constraint? *Trends in Ecology and Evolution*, 29 : 456–464.
- FRANK, S. A. (1990). Sex allocation theory for birds and mammals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 21: 13– 55.
- GLADSTONE, D. E. (1979). Promiscuity in monogamous colonial birds. *American Naturalist*, 114: 545-557.

- GOODNIGHT, K. F. & QUELLER, D. C. (1999). Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, 8: 1231-1234.
- GOWATY, P. A. (1996). Battles of the Sexes and Origins of Monogamy. In: BLACK JM (Ed.) *Partnerships in Birds: The Study of Monogamy*. Oxford University Press, Oxford. Pp. 21–52.
- GRAY, E. M. (1996). Female control of offspring paternity in a western population of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 38: 267–278.
- GREENWOOD, P. J. & HARVEY, P. H. (1982). The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 1– 21.
- GRIFFITH, S. C., OWENS, I. P. F. & THUMAN, K. A. (2002). Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, 11: 2195-2212.
- GRIFFITH, S. C. (2010). The role of multiple mating and extra-pair paternity in creating and reinforcing boundaries between species in birds. *Emu*, 110: 1-9.
- GRIFFITH, S. C. (2007). The evolution of infidelity in socially monogamous passerines: Neglected components of direct and indirect selection. *The American Naturalist*, 169: 274– 281.
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M. C., ORR, K. & DAWSON R. J. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075.
- GRZYBOWSKI, J. A. & PEASE, C. M. (2005). Renesting determines seasonal fecundity in songbirds: What do we know? What should we assume? *The Auk*, 122: 280–291.
- GUEDES, N. M. R. (2004). Araras Azuis: 15 anos de estudos no Pantanal. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e socioeconômicos do Pantanal, Corumbá. Anais eletrônicos. (Retirado de: <https://www.institutoararaazul.org.br/wp-content/uploads/2022/05/21.-Guedes-2004-Projeto-Arara-Azul-15-anos-SIMPAN.pdf> em: 12/jun2023).
- GUEDES, N. M. R. (2012). Araras da Cidade. In: QUEVEDO, T. L. *Araras da Cidade – Músicas do Mato*. Editora Alvorada, Campo Grande. Pp. 45-140.
- HADFIELD, J. D., RICHARDSON, D. S. & BURKE, T. (2006). Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology*, 15: 3715–3730.
- HEINSOHN, R., OLAH, G., WEBB, M., PEAKALL, R. & STOJANOVIC, D. (2018). Sex ratio bias and shared paternity reduce individual fitness and population viability in a critically endangered parrot. *Journal of Animal Ecology*, 88: 502– 510
- IBGE: Censo – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010: Características urbanísticas do entorno dos domicílios. Rio de Janeiro, 2010. Atualizado parcialmente. (Retirado de: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/campo-grande/panorama> em: 11/mai/2023)
- IBGE: Shapefile – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Malhas territoriais (Retirado de: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/malhas-territoriais/15774-malhas.html> em 29/jun/23)
- ISHIBASHI, Y., SAITOH, T., ABE, S. & YOSHIDA, M. C. (1996). Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. *Molecular Ecology*, 5: 589-590.
- JONES, A. G. & ARDREN, W. R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12: 2511-2523.

- JONES, A. G., SMALL, C. M., PACZOLT, K. A. & RATTERMAN, N. L. (2010). A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology*, 10: 6-30.
- JONES, O. R. & WANG, J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 3: 551-555.
- KALINOWSKI, S. T., WAGNER, A. P. & TAPER, M. L. (2006). ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6: 576-579.
- LACK, D. (1968). *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. Methuen, London.
- LEŽALOVÁ-PIÁLKOVÁ, R. (2011). Molecular evidence for extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the black-headed gull. *Journal of Ornithology*, 152: 291–295.
- LIMA-REZENDE, C. A. et al. (2019). In silico identification and characterization of novel microsatellite loci for the Blue-and-yellow macaw *Ara ararauna* (Linnaeus, 1758) (Psittaciformes, Psittacidae). *Genetics and Molecular Biology*, 42: 68-73.
- LYNCH, M. & RITLAND, K. (199). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152: 1753-1766.
- LYNCH, M. & WALSH, J. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland.
- LYON, B. E. (1998). Optimal clutch size and conspecific brood parasitism. *Nature*, 392: 380– 383.
- LYON, B. E. & EADIE, J. M. (2008). Conspecific brood parasitism in birds: a life-history perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 343–363
- MANICA, L. T. (2013). Seleção sexual, características sexuais multimodais e cópulas extra-par em tizius (*Volantina jacarina*). Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília.
- MARASCO, et al. (2020). Molecular evidence of extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism by the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Ornithology*, 161: 125–135.
- MARSHALL, T. C., SLATE, J., KRUIK, L. E. B. & PEMBERTON, J. M (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- MARTÍNEZ, J. J., DE ARANZAMENDI, M. C., MASELLO, J. F. & BUCHER, E. H. (2013). Genetic evidence of extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the monk parakeet. *Frontiers in Zoology*, 10:68.
- MASELLO, J. F. & QUILLFELDT, P. (2002). Chick growth and breeding success of the burrowing parrot. *Condor*, 104: 574-586.
- MASELLO, J. F. et al. (2002). Genetic monogamy in burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus*? *Journal of Avian Biology*, 33: 99-103.
- MAUCK, R. A., MARSHALL, E. A. & PARKER, P. G. (1999). Adult survival and imperfect assessment of parentage: effects on male parenting decisions. *The American Naturalist*, 154: 99– 109.
- MEAGHER, T. R. & THOMPSON, E. A. (1986). The relationship between single parent and parent pair likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 29: 87– 106.
- MELLAND, R. R. (2000). The genetic mating system and population structure of the green-rumped parrotlet. Tese (Doutorado). University of North Dakota, Grand Forks.
- MENDONÇA DANTAS, G. P. et al. (2020). Extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) on Elephant Island, Antarctica. *Polar Biology* 43: 851–859.

- MILLIGAN, B. G. (2003). Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, 163: 1153-1167.
- MIÑO, C. I. & DEL LAMA, S. N. (2009). Sistemas de acasalamento e biologia reprodutiva em aves aquáticas neotropicais. *Oecologia Brasiliensis*, 13: 141-152.
- MIÑO, C. I., SAWYER, G. M., BENJAMIN, R. C. & DEL LAMA, S. N. (2009). Parentage and relatedness in captive and natural populations of the roseate spoonbill (Aves: Ciconiiformes) based on microsatellite data. *Journal of Experimental Zoology*, 311: 453-464.
- MIÑO, C. I. (2010). Genética de populações e relações de parentesco em Ciconiiformes (Aves). Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- MØLLER, A. P. & BIRKHEAD, T. R. (1993). Cuckoldry and sociality: a comparative study of birds. *The American Naturalist*, 142: 118-140
- MONTAÑO, A., SABINO, J. & GUEDES, N. M. R. (2009). Alimentação da arara-canindé (*Ara ararauna* - Psittacidae) em ambiente urbano, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: Anais Encontro anual de etologia e I Simpósio latino-americano de etologia. Bonito.
- MOUSSEAU, T. A., RITLAND, K. & HEATH, D. D. (1998). A novel method for estimating heritability using molecular markers. *Heredity*, 80: 218-224.
- MUFF, S., NILSEN, E. B., O'HARA, R. B. & NATER, C. R. (2022). Rewriting results sections in the language of evidence. *Trends in Ecology and Evolution*, 37: 203-210.
- MULDER, R. A. et al. (1994). Helpers liberate female fairy-wrens from constraints on extra-pair mate choice. *Of the Royal Society of London: Biological Sciences*, 255: 223-229.
- NEFF, B. D. & PITCHER, T. E. (2005). Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology*, 14: 19-38.
- NEFF, B. D., PITCHER, T. E. & RAMNARINE, I. W. (2008). Inter-population variation in multiple paternity and reproductive skew in the guppy. *Molecular Ecology*, 17: 2975- 2984.
- NIELSEN, R., MATTILA, D. K., CLAPHAM, P. J. & PALSBØLL, P. J. (2001). Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to Northern Atlantic humpback whale. *Genetics*, 157: 1673- 1682.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- PEREIRA, E. D. L., BARBOSA, L. T., RABENHORST, K. C. & GUEDES, N. M. R. (2012). Biologia Reprodutiva da Arara-canindé (*Ara ararauna*, Aves: Psittacidae) em Área Urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Anhanguera- Uniderp, Campo Grande.
- PETRIE, M. & KEMPENAERS, B. (1998). Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 52-58.
- PETRIE, M., DOUMS, C. & MOLLER, A. P. (1998). The degree of extra-pair paternity increases with genetic variability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9390-9395.
- PICMAN, J. (1987). Territory establishment, size, and tenacity by male red-winged blackbirds, *The Auk*, 104: 405-412.
- PLANURB- Instituto Municipal de Planejamento Urbano. Perfil socioeconômico de Campo Grande. Campo Grande: PMCG, 2017. (Retirado de:

<https://www.campogrande.ms.gov.br/planurb/downloads/perfil-socioeconomico-de-campo-grande-ms-edicao-2020/em:12/mai/2023>).

PONNIKAS, S., OLLILA, T. & KVIST, L. (2017). Turnover and post-bottleneck genetic structure in a recovering population of peregrine falcons *Falco peregrinus*. *Ibis*, 159: 311-323.

POWELL, L. A. & FRASCH, L. L. (2000). Can nest predation and predator type explain variation in dispersal of adult birds during the breeding season?. *Behavioral Ecology*, 11: 437-443.

QUELLER, D. C. & GOODNIGHT, K. F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43: 258-275.

RAMOS, A. G. et al. (2014). Habitat structure and colony structure constrain extrapair paternity in a colonial bird. *Animal Behaviour*, 95: 121-127.

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

REBOREDA, J. C., FIORINI, V. D. & TUERO, D.T. (2019). *Behavioral Ecology of Neotropical Birds*. Springer, Cham.

REICHARD, U. H. (2003). Monogamy: Past and Present. In: REICHARD, U.H.; BOESCH, C. (Eds) *Monogamy: Mating Strategies and Partnerships in Birds, Humans and other Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 3-25.

REYNOLDS, J. D. (1996). Animal breeding systems. *Trends Ecology and Evolution*, 11: 68-72.

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

ROSSMANITH, E., GRIMM, V., BLAUM, N. & JELTSCH, F. (2006). Behavioural flexibility in the mating system buffers population extinction: lessons from the lesser spotted woodpecker *Picoides minor*. *Journal Animal Ecology*, 75: 540-548.

RUSSELLO, M. A. & AMATO, G. (2004). Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, 13: 2829-2840.

RYMESOVA, D. et al. (2017). Mate choice for major histocompatibility complex complementary in a strictly monogamous bird, the grey partridge (*Perdix perdix*). *Frontiers in Zoology*, 14:9.

SÃO PAULO (Estado) (1998) Decreto no 42.838, de 4 de fevereiro de 1998. Declaração das espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção e as provavelmente ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. *Diário Oficial, São Paulo* 108 (25), 5 fev.

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

SCRIBNER, K. T. & PEARCE, J. M. (2000). Microsatellite: Evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic Levels. In: BAKER, A. J. (Ed). *Molecular Methods in Ecology*. Oxford University Press, Oxford. Pp. 235-271.

SEMADUR (2010) – Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Desenvolvimento Urbano. Plano Diretor de Arborização Urbana. Campo Grande, 2010. (Retirado de: <https://prefcg-repositorio.campogrande.ms.gov.br/wp-cdn/uploads/sites/24/2018/05/Plano-Diretor-de-Arboriza%C3%A7%C3%A3o-Urbana-2010.pdf> em: 12/mai/2023).

SEPULCRE, A. L., & KOKKO, H. (2002). The role of kin recognition in the evolution of conspecific brood parasitism. *Animal Behaviour*, 64: 215-222.

- SHELDON, B. C. (1993). Sexually transmitted disease in birds: occurrence and evolutionary significance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 339:491–497
- SICK, H. (1997). *Ornitologia Brasileira, uma Introdução*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- SKUTCH, A. F. (1985). Clutch size, nesting success, and predation on nests of Neotropical birds, Reviewed. *Ornithological Monographs*, 36: 575–594.
- SMITH, J. M. (1977). Parental investment: a prospective analysis. *Animal Behavior*, 25: 1– 9.
- SOUZA, A. S. M. C., DEL LAMA, S. N., MIÑO, C. I. (2013). Conspecific brood parasitism in the white-faced ibis *Plegadis chihi* (Aves: Pelecaniformes) revealed by microsatellites' based kinship-reconstruction. *Journal of Experimental Zoology*, 319: 277– 284.
- STUTCHBURY, B. J. M. & MORTON, E. S. (1995). The effect of breeding synchrony on extra-pair mating systems in songbirds. *Behaviour* 132: 675–690.
- STUTCHBURY, B. J. M. & MORTON, E. S. (2001). *Behavioral ecology of tropical birds*. Academic Press, San Diego.
- STUTCHBURY, B. J. M., MORTON, E. S. & PIPER, W. H. (1998). Extra-pair mating system of a synchronously breeding tropical songbird. *Journal of Avian Biology*, 29: 72–78.
- TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463– 6471.
- TAYLOR, T. D. & AND PARKIN, D. T. (2009). Preliminary evidence suggests extra-pair mating in the endangered echo parakeet, *Psittacula eques*. *African Zoology*, 44: 71–74.
- THOMAS, S. C. & HILL, W. G. (2000). Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, 155: 1961–1972.
- THOMPSON, E. A. (1975). The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics*, 39:173 – 188.
- TRIVERS, R. (1972). Parental investment and sexual selection. In: CAMPBELL, B. G. (Ed.) *Sexual Selection and the Descent of Man*. Aldine Press, Chicago. Pp. 136–179.
- TURJEMAN, S. F. et al. (2016). Extra-pair paternity in the socially monogamous white stork (*Ciconia ciconia*) is fairly common and independent of local density. *Scientific Reports*, 6: 27976.
- VAN DE CASTEELE, 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.
- VEDDER, O., KOMDEUR, J., VAN DER VELDE, M., SCHUT, E. & MAGRATH, M. J. (2010). Polygyny and extra-pair paternity enhance the opportunity for sexual selection in blue tits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65: 741–752.
- WAGNER, A. P., CREEL, S., & KALINOWSKI, S. T. (2006). Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, 97: 336-345.
- WANG, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160: 1203-1215.

- WANG, J. (2007). Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetics Research*, 89: 135-153.
- WANG, J. (2010). Effects of genotyping errors on parentage exclusion analysis. *Molecular Ecology*, 19: 5061-5078.
- WANG, J. (2011). COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analyzing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology*, 11: 141–145.
- WEIR, B. S. (1996). *Genetic Data Analysis II – Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Sunderland.
- WEIR, B. S., ANDERSON, A. D. & HEPLER, A. B. (2006). Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews on Genetics*, 7: 771 – 780.
- WESTNEAT, D. F. & MAYS, H. L. (2005). Tests of spatial and temporal factors influencing extra-pair paternity in red-winged blackbirds. *Molecular Ecology*, 14: 2155-2167.
- WESTNEAT, D. F., SHERMAN, P. W. & MORTON, M. L. (1990). The ecology and evolution of extrapair paternity in birds. *Current Ornithology*, 7: 331-369.
- YASUKAWA, K. (1979). Territory establishment in red-winged blackbirds: importance of aggressive behavior and experience. *The Condor*, 81: 258–264.
- YOM-TOV, Y. (2001). An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds. *Ibis*, 143: 133–143.
- YOUNG, A. M., HOBSON, E. A., LACKEY, L. B. & WRIGHT, T. F. (2012). Survival on the ark: life-history trends in captive parrots. *Animal Conservation*, 15: 28-43.
- ZAR, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- ZINK, A. G. (2000). The evolution of intraspecific brood parasitism in birds and insects. *The American Naturalist*, 155: 395-405.

## 8. Apêndices

**Apêndice 1.** Número de filhotes amostrados em cada ninho por estação reprodutiva.

NINHO	2013	2014	2015	2016	2017	2018
2	2	1				
3	3					
6	2					
8	2	1	3	2		
16	2					
17	2					
19	2					
20	2	1		2		
23		1	2			
25	2	2	2	2		
30	3	2				
32		1	2			
33	1	2			1	
35	1	1				
36	1	3	2			
37	3					
39	1					
41		1	1	1		
42		1	2			
45		1	1		1	
46		2	1	2		2
47		2	1			3
48			2			
49		1				
51		2	2		2	3
52		2	2		2	
53				2		
54			2			
55		2	1			
57		1				
59		1	2			
60			2			
61			3	1	1	3
62		2	2			
63		1	1			2
65			2			
66			3	1	3	2
68			2			
69			1		2	1
70			2			
71			3	2	2	
72			1	1		
73			2		1	1
74			1			
76			1	2	1	2
77					1	
78			2	2	2	2
79			1	2		
80			1			
81				3		
82			1			

Continuação Apêndice 1

NINHO	2013	2014	2015	2016	2017	2018
83			2			
84				2	1	2
85			2			
86					1	1
87				2		1
88				2	2	1
89				1		
90					2	2
91				2		
92						
93				1		2
94				1	1	
96						1
97				1		1
98				2		
99				2	1	2
100				1		
101					1	1
102				2		
103				2	2	2
106				2		2
107						1
108				1		1
109				1		
112					1	
116				1		
117				2		
119				1	1	1
120				2		
121					1	
122						
123						
125				3	1	
126					3	2
127						2
129					2	
130					2	1
131					1	2
132					1	
133					1	2
134					1	
135						1
136					2	
137					1	
139					2	2
140					1	1
141					1	2
142					1	1
143					1	1
144					1	2
145					2	2
147					1	
148						3
149					2	
150					2	

Continuação Apêndice 1

NINHO	2013	2014	2015	2016	2017	2018
152 A					2	2
152 B					1	
154						2
155					2	
157					1	2
1010					1	
159						1
160						2
161						2
162						1
164						2
165						2
167						2
168						1
169						1
171						2
175						1
177						2
178						1
179						3
180						2
181						2
184						2
186						1
187						3
188						1
190						1
191						1
192						2
193						2
195						2

**Apêndice 2.** Valor médio do coeficiente de parentesco  $r$ , seus valores de variância e RMSE (*root mean squared error*) obtidos com cada um dos sete estimadores e o valor obtido dos 3.000 pares de genótipos simulados (Valor esperado).

	<b>TrioML</b>	<b>Wang</b>	<b>LynchLi</b>	<b>LynchRd</b>	<b>Ritland</b>	<b>QuellerGt</b>	<b>DyadML</b>	<b>Valor esperado</b>
Média	0.24534	0.25065	0.25030	0.24970	0.25143	0.24869	0.27259	0.25000
Variância	0.04115	0.05814	0.05821	0.06391	0.23956	0.05743	0.04486	0.04167
RMSE	0.01350	0.01845	0.01855	0.02445	0.19879	0.01840	0.01388	

**Apêndice 3.** Valores de correlação dos coeficientes de parentesco obtidos por pares de estimadores e de cada estimador com o valor esperado dos 3.000 pares de genótipos simulados.

<b>Correlação</b>	<b>TrioML</b>	<b>Wang</b>	<b>LynchLi</b>	<b>LynchRd</b>	<b>Ritland</b>	<b>QuellerGt</b>	<b>DyadML</b>	<b>Valor esperado</b>
TrioML	100.000							
Wang	0.94202	100.000						
Lynch LI	0.94464	0.96442	100.000					
Lynch RD	0.89965	0.87471	0.86172	100.000				
Ritland	0.47821	0.44162	0.43847	0.67836	100.000			
Queller GT	0.94455	0.94012	0.97948	0.86734	0.45303	100.000		
DyadML	0.99452	0.95353	0.95264	0.90661	0.47869	0.95072	100.000	
Valor esperado	0.83731	0.82653	0.82572	0.78605	0.41260	0.82487	0.84602	100.000

**Apêndice 4.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2013. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** p-valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.

Ind 1	Ind 2	r	Cat.	H0/H1	p-value	Agr. familiar
19557	19558	0,2328	HS	HS/FS	0,1110	-
19559	19560	0,2807	FS	FS/HS	0,1260	-
19559	19561	0,6943	FS	FS/HS	0,0000	-
19560	19561	0,5000	FS	FS/HS	0,1910	FS
19562	19563	0,6425	FS	FS/HS	0,0000	-
19564	19565	0,8222	FS	FS/HS	0,0000	-
19566	19567	0,4989	FS	FS/HS	0,0770	-
19568	19569	0,5070	FS	FS/HS	0,0140	-
19570	19571	0,5453	FS	FS/HS	0,0000	-
19572	19573	0,3790	HS	HS/FS	0,0720	HS
19574	19575	0,4521	FS	FS/HS	0,0270	-
19576	19577	0,7409	FS	FS/HS	0,0000	-
19576	19578	0,6412	FS	FS/HS	0,0010	-
19577	19578	0,5000	FS	FS/HS	0,0310	-
19582	19583	0,6076	FS	FS/HS	0,0010	-
19582	19584	0,5000	FS	FS/HS	0,0340	-
19583	19584	0,2216	HS	HS/FS	0,0080	FS

HS: *half sibs* (meio-irmãos); FS: *full sib* (irmãos-completos).

**Apêndice 5.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2014. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** *p*-valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.

<b>Ind 1</b>	<b>Ind 2</b>	<b>r</b>	<b>Cat.</b>	<b>H0/H1</b>	<b>p-value</b>	<b>Agr. familiar</b>
19596	19597	0,2519	HS	HS/FS	0,0830	
19598	19599	0,4094	FS	FS/HS	0,0380	
19601	19602	0,0369	U	U/HS	0,0930	
19605	19607	0,4843	FS	FS/HS	0,0060	
19606	19607	0,4275	FS	FS/HS	0,0230	
19605	19606	0,3728	FS	FS/HS	0,0180	
19611	19612	0,6377	FS	FS/HS	0,0000	
19613	19614	0,3971	FS	FS/HS	0,0500	
19617	19618	0,2293	HS	HS/FS	0,1190	HS
19619	19620	0,8234	FS	FS/HS	0,0000	
19621	19622	0,0000	U	U/HS	0,0000	
19625	19626	0,6793	FS	FS/HS	0,0000	

HS: *half sibs* (meio-irmãos); FS: *full sib* (irmãos-completos); U: *unrelated* (não-aparentados).

**Apêndice 6.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2015. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** p-valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.

Ind 1	Ind 2	r	Cat.	H0/H1	p-value	Agr. familiar
19631	19633	0,7776	FS	FS/HS	0,0000	
19632	19633	0,5000	HS	HS/FS	0,0460	HS
19631	19632	0,2187	HS	HS/FS	0,0530	HS
19634	19635	0,2028	HS	HS/FS	0,0210	
19636	19637	0,4342	FS	FS/HS	0,0480	
19638	19639	0,3129	HS	HS/FS	0,1030	FS
19640	19641	0,6239	FS	FS/HS	0,0060	
19643	19644	0,5207	FS	FS/HS	0,0050	
19648	19649	0,5000	FS	FS/HS	0,2630	FS
19650	19651	0,2521	HS	HS/FS	0,0330	
19652	19653	0,1932	HS	HS/FS	0,0400	
19654	19655	0,2143	HS	HS/FS	0,0860	
19657	19658	0,5000	FS	FS/HS	0,0440	
19659	19660	0,3347	FS	FS/HS	0,0300	FS
19661	19663	0,4454	FS	FS/HS	0,0090	
19661	19662	0,2689	HS	HS/FS	0,1230	FS
19662	19663	0,5227	FS	FS/HS	0,0050	
19664	19665	0,1843	HS	HS/FS	0,0600	
19667	19668	0,5255	FS	FS/HS	0,0040	
19669	19670	0,5407	FS	FS/HS	0,0090	
19669	19671	0,5161	FS	FS/HS	0,0310	
19670	19671	0,4885	FS	FS/HS	0,0020	
19672	19673	0,6483	FS	FS/HS	0,0000	
19675	19676	0,5130	FS	FS/HS	0,0750	
19677	19678	0,4913	FS	FS/HS	0,0870	
19677	19679	0,1508	HS	HS/FS	0,0410	
19678	19679	0,4711	FS	FS/HS	0,0160	
19681	19682	0,0000	U	U/HS	0,0110	
19685	19686	0,5536	FS	FS/HS	0,0150	
19690	19691	0,4912	FS	FS/HS	0,0230	
19692	19693	0,2084	HS	HS/FS	0,0140	

FS: *full sib* (irmãos-completos); HS: *half sibs* (meio-irmãos); U: *unrelated* (não-aparentados).

**Apêndice 7.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2016. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:**  $p$ -valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.

Ind 1	Ind 2	r	Cat.	H0/H1	p-value	Agr. familiar
19694	19695	0,0789	U	U/HS	0,0660	
19696	19697	0,4967	FS	FS/HS	0,0140	
19698	19699	0,2668	HS	HS/FS	0,0970	
19701	19702	0,4128	FS	FS/HS	0,0210	
19703	19704	0,5000	FS	FS/HS	0,3100	FS
19707	19708	0,0798	U	U/HS	0,0500	
19710	19711	0,1558	HS	HS/FS	0,0560	
19712	19713	0,5527	FS	FS/HS	0,0310	
19714	19715	0,1808	HS	HS/FS	0,0340	
19716	19718	0,3509	FS	FS/HS	0,0160	
19716	19717	0,0005	U	U/HS	0,0970	
19717	19718	0,3266	HS	HS/FS	0,1040	HS
19719	19720	0,4676	FS	FS/HS	0,0070	
19721	19722	0,0000	U	U/HS	0,0200	
19723	19724	0,5483	FS	FS/HS	0,0020	
19726	19727	0,3462	HS	FS/HS	0,1330	FS
19731	19732	0,4317	FS	FS/HS	0,0020	
19738	19739	0,0847	U	U/HS	0,1370	
19740	19741	0,3314	FS	FS/HS	0,1180	FS
19745	19746	0,2328	HS	HS/FS	0,0300	
19748	19749	0,2942	FS	FS/HS	0,0460	FS
19751	19752	0,5756	FS	FS/HS	0,0030	
19751	19753	0,5000	FS	FS/HS	0,1270	FS
19752	19753	0,3425	HS	HS/FS	0,1110	FS
18879	18880	0,4019	FS	FS/HS	0,0840	
18881	18882	0,3519	HS	HS/FS	0,0250	HS
18884	18885	0,5720	FS	FS/HS	0,0020	
18885	18886	0,7418	FS	FS/HS	0,0010	
18884	18886	0,4955	FS	FS/HS	0,0320	
18887	18888	0,2543	FS	FS/HS	0,0590	FS
18889	18890	0,0358	U	U/HS	0,1070	
18895	18896	0,6033	FS	FS/HS	0,0000	
18900	18901	0,5453	FS	FS/HS	0,0010	
18902	18903	0,3586	FS	FS/HS	0,1160	HS
18908	18909	0,5000	FS	FS/HS	0,0870	
18916	18917	0,7177	FS	FS/HS	0,0000	
18917	18918	0,5931	FS	FS/HS	0,0150	
18916	18918	0,5901	FS	FS/HS	0,0060	

Continuação Apêndice 7

<b>Ind 1</b>	<b>Ind 2</b>	<b><i>r</i></b>	<b>Cat.</b>	<b>H0/H1</b>	<b><i>p-value</i></b>	<b>Agr. familiar</b>
18920	18921	0,3600	FS	FS/HS	0,0420	FS
18922	18923	0,3399	FS	FS/HS	0,0750	
18928	18929	0,6072	FS	FS/HS	0,0050	
18931	18932	0,7555	FS	FS/HS	0,0000	
18941	18942	0,2183	HS	HS/FS	0,0240	
18944	18945	0,0584	U	U/HS	0,1030	
18947	18948	0,3337	HS	HS/FS	0,0920	
18949	18950	0,0364	U	U/HS	0,0950	
18952	18953	0,4548	FS	FS/HS	0,0100	

U: *unrelated* (não-aparentados ); HS: *half sibs* (meio-irmãos); FS: *full sib* (irmãos-completos).

**Apêndice 8.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2017. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** *p*-valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.

Ind 1	Ind 2	<i>r</i>	Cat.	H0/H1	<i>p-value</i>	Agr. familiar
18879	18880	0,4019	FS	FS/HS	0,0840	
18881	18882	0,3519	HS	HS/FS	0,0250	HS
18884	18885	0,5720	FS	FS/HS	0,0020	
18885	18886	0,7418	FS	FS/HS	0,0010	
18884	18886	0,4955	FS	FS/HS	0,0320	
18887	18888	0,2543	FS	FS/HS	0,0590	
18889	18890	0,0358	U	U/HS	0,1070	
18895	18896	0,6033	FS	FS/HS	0,0000	
18900	18901	0,5453	FS	FS/HS	0,0010	
18902	18903	0,3586	FS	FS/HS	0,1160	HS
18908	18909	0,5000	FS	FS/HS	0,0870	
18916	18917	0,7177	FS	FS/HS	0,0000	
18917	18918	0,5931	FS	FS/HS	0,0150	
18916	18918	0,5901	FS	FS/HS	0,0060	
18920	18921	0,3600	FS	FS/HS	0,0420	
18922	18923	0,3399	FS	FS/HS	0,0750	FS
18928	18929	0,6072	FS	FS/HS	0,0050	
18931	18932	0,7555	FS	FS/HS	0,0000	
18941	18942	0,2183	HS	HS/FS	0,0240	
18944	18945	0,0584	U	U/HS	0,1030	
18947	18948	0,3337	HS	HS/FS	0,0920	
18949	18950	0,0364	U	U/HS	0,0950	
18952	18953	0,4548	FS	FS/HS	0,0100	

FS: *full sib* (irmãos-completos); HS: *half sibs* (meio-irmãos); U: *unrelated* (não-aparentados).

**Apêndice 9.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho na estação reprodutiva de 2018. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** p-valor associado ao teste de hipóteses; **Agr. familiar:** teste de agrupamento familiar.

Ind 1	Ind 2	r	Cat.	H0/H1	p-value	Agr. familiar
19805	19806	0,3866	HS	HS/FS	0,1270	HS
19807	19808	0,5046	FS	FS/HS	0,0010	
19807	19809	0,3079	FS	FS/HS	0,1120	HS
19808	19809	0,5552	FS	FS/HS	0,0010	
19810	19811	0,4581	FS	FS/HS	0,0370	
19811	19812	0,4769	FS	FS/HS	0,0180	
19810	19812	0,3289	HS	HS/FS	0,0590	
19813	19814	0,3853	FS	FS/HS	0,0340	FS
19813	19815	0,0784	U	HS/FS	0,0040	U
19814	19815	0,1945	HS	HS/FS	0,0330	FS
19818	19819	0,5365	FS	FS/HS	0,0030	
19822	19823	0,0333	U	U/HS	0,0030	
19824	19825	0,6812	FS	FS/HS	0,0000	
19826	19827	0,5011	FS	FS/HS	0,0040	
19831	19832	0,1352	HS	HS/FS	0,0240	
19833	19834	0,1478	HS	HS/FS	0,0440	
19840	19841	0,3616	FS	FS/HS	0,0320	
19843	19844	0,5568	FS	FS/HS	0,0000	
19845	19846	0,5701	FS	FS/HS	0,0010	
19850	19851	0,4971	FS	FS/HS	0,0010	
19852	19853	0,5173	FS	FS/HS	0,0000	
19857	19858	0,7288	FS	FS/HS	0,0000	
19859	19860	0,1389	HS	HS/FS	0,0550	
19862	19863	0,7300	FS	FS/HS	0,0000	
19865	19866	0,5302	FS	FS/HS	0,0020	
19870	19871	0,4163	FS	FS/HS	0,0700	
19872	19873	0,4329	FS	FS/HS	0,0020	
19876	19877	0,5599	FS	FS/HS	0,0000	
19876	19878	0,3243	FS	FS/HS	0,0320	
19877	19878	0,4322	FS	FS/HS	0,0150	
19880	19881	0,5000	FS	FS/HS	0,0090	
19882	19883	0,7573	FS	FS/HS	0,0000	
19885	19886	0,2526	HS	HS/FS	0,0260	
19888	19889	0,4528	FS	FS/HS	0,0640	
19890	19891	0,5278	FS	FS/HS	0,0050	
19893	19894	0,2995	HS	HS/FS	0,0710	
19895	19896	0,3340	FS	FS/HS	0,0670	
19897	19898	0,4395	FS	FS/HS	0,0570	
19901	19902	0,4853	FS	FS/HS	0,0020	

Continuação Apêndice 9

<b>Ind 1</b>	<b>Ind 2</b>	<b><i>r</i></b>	<b>Cat.</b>	<b>H0/H1</b>	<b><i>p-value</i></b>	<b>Agr. familiar</b>
19904	19905	0,5826	FS	FS/HS	0,0030	
19907	19909	0,6987	FS	FS/HS	0,0000	
19908	19909	0,6260	FS	FS/HS	0,0010	
19907	19908	0,5604	FS	FS/HS	0,0100	
19910	19911	0,3850	FS	FS/HS	0,0290	
19912	19913	0,3540	FS	FS/HS	0,0810	
19914	19915	0,7834	FS	FS/HS	0,0000	
19917	19919	0,6534	FS	FS/HS	0,0000	
19918	19919	0,6643	FS	FS/HS	0,0000	
19917	19918	0,4632	FS	FS/HS	0,0000	
19923	19924	0,1231	HS	HS/FS	0,0140	
19925	19926	0,7075	FS	FS/HS	0,0000	
19927	19928	0,3360	FS	FS/HS	0,1120	FS

HS: *half sibs* (meio-irmãos); FS: *full sib* (irmãos-completos); U: *unrelated* (não-aparentados).

**Apêndice 10.** Resultados das análises de paternidade para dois pares de progenitor-prole sugeridos pelas observações de campo. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **Ano 1 Ano 2:** Ano em que o indivíduo 1 e 2 foram amostrados; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** p-valor associado ao teste de hipóteses.

<b>Ind 1</b>	<b>Ano 1</b>	<b>Ind 2</b>	<b>Ano 2</b>	<b>r</b>	<b>Cat.</b>	<b>H0/H1</b>	<b>p-valor</b>
19558	2013	18926	2017	0.0000	U	U/HS	
19558	2013	19859	2018	0.1976	HS	HS/FS	0,0124
19558	2013	19860	2018	0.3054	HS	HS/FS	0,0169
19722	2016	19912	2018	0.0000	U	U/HS	
19722	2016	19913	2018	0.0000	U	U/HS	

**Apêndice 11.** Resultados das análises de parentesco para pares de filhotes amostrados no mesmo ninho mas em diferentes estações reprodutivas de 2013 a 2019. **Ninho:** identificação de campo do ninho onde as amostras foram coletadas; **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **Ano:** dois últimos dígitos do ano de início da estação reprodutiva dos indivíduos 1 e 2 respectivamente; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa e **p-value:** p-valor associado ao teste de hipóteses.

Ninho	Ind. 1	Ind. 2	Ano	r	Cat.	$H_0/H_1$	p-value
2	19557	19590	13-14	0,3532	FS	FS-HS	0,067
2	19558	19590	13-14	0,3424	FS	FS-HS	0,031
8	19564	19593		0,0325	U		
8	19564	19631		0,0000	U		
8	19564	19632		0,0609	U		
8	19564	19633		0,0000	U		
8	19564	19694		0,0462	U		
8	19564	19695		0,0000	U		
8	19565	19593		0,0000	U		
8	19565	19631		0,0000	U		
8	19565	19632		0,0000	U		
8	19565	19633		0,0000	U		
8	19565	19694		0,0000	U		
8	19565	19695		0,0000	U		
8	19593	19631	14-15	0,5000	FS	HS-FS	0,105
8	19593	19632	14-15	0,0000	U	U-HS	0,005
8	19593	19633	14-15	0,2992	HS	HS-FS	0,021
8	19593	19694		0,0000	U		
8	19593	19695		0,0593	U		
8	19631	19694		0,0000	U		
8	19631	19695		0,1043	U		
8	19632	19694		0,0000	U		
8	19632	19695		0,0000	U		
8	19633	19694		0,0000	U		
8	19633	19695		0,0000	U		
8	19694	19695		0,0895	U		
20	19572	19594		0,0303	U		
20	19572	19696		0,0010	U		
20	19572	19697		0,0000	U		
20	19573	19594		0,0459	U		
20	19573	19696		0,1052	U		
20	19573	19697		0,0864	U		
20	19594	19696	14-16	0,2738	HS	HS-FS	0,107
20	19594	19697	14-16	0,2863	HS	HS-FS	0,015
23	19595	19634	14-15	0,3812	FS	FS-HS	0,098

<b>Ninho</b>	<b>Ind. 1</b>	<b>Ind. 2</b>	<b>Ano</b>	<b>r</b>	<b>Cat.</b>	<b>H<sub>0</sub>/H<sub>1</sub></b>	<b>p-value</b>
23	19595	19635	14-15	0,0837	U	U-HS	0,050
25	19574	19596		0,0095	U		
25	19574	19597		0,0000	U		
25	19574	19698		0,0000	U		
25	19574	19699		0,0000	U		
25	19575	19596		0,0000	U		
25	19575	19597		0,0000	U		
25	19575	19698		0,0000	U		
25	19575	19699		0,0110	U		
25	19596	19698	14-16	0,2382	HS	HS-FS	0,004
25	19596	19699	14-16	0,3226	HS	HS-FS	0,017
25	19597	19698	14-16	0,3058	HS	HS-FS	0,029
25	19597	19699	14-16	0,0551	U	U-HS	0,112
30	19576	19598	13-14	0,7524	FS	FS-HS	0,000
30	19576	19599	13-14	0,6066	FS	FS-HS	0,005
30	19577	19598	13-14	0,8171	FS	FS-HS	0,000
30	19577	19599	13-14	0,3765	FS	FS-HS	0,112
30	19578	19598	13-14	0,4497	FS	FS-HS	0,020
30	19578	19599	13-14	0,5000	FS	FS-HS	0,097
32	19600	19638	14-15	0,1935	HS	HS-FS	0,0410
32	19600	19639	14-15	0,1317	HS	HS-FS	0,0050
33	19579	19601	13-14	0,6622	FS	FS-HS	0,000
33	19579	19602	13-14	0,3484	FS	FS-HS	0,108
33	19579	18877	13-17	0,0000	U		
33	19601	18877	14-17	0,0000	U		
33	19602	18877	14-17	0,0000	U		
35	19580	19603	13-14	0,3344	FS	FS-HS	0,089
36	19581	19605	13-14	0,1045	U	U-HS	0,126
36	19581	19606	13-14	0,1583	U	U-HS	0,043
36	19581	19607	13-14	0,2000	HS	HS-FS	0,076
36	19581	19640		0,0731	U		
36	19581	19641		0,0095	U		
36	19605	19640		0,1033	U		
36	19605	19641		0,0000	U		
36	19606	19640		0,0000	U		
36	19606	19641		0,0000	U		
36	19607	19640		0,0000	U		
36	19607	19641		0,0000	U		
41	19608	19642	14-15	0,0000	U		
41	19608	19700	14-16	0,0000	U		
41	19642	19700	15-16	0,5477	FS	FS-HS	0,005
42	19609	19643	14-15	0,2218	HS	HS-FS	0,020

<b>Ninho</b>	<b>Ind. 1</b>	<b>Ind. 2</b>	<b>Ano</b>	<b>r</b>	<b>Cat.</b>	<b>H<sub>0</sub>/H<sub>1</sub></b>	<b>p-value</b>
42	19609	19644	14-15	0,3115	HS	HS-FS	0,005
45	19610	19645	14-15	0,0000	U		
45	19610	18878	14-17	0,0000	U		
45	19645	18878	15-17	0,1362	U	U-HS	0,157
46	19611	19646	14-15	0,5000	FS	FS-HS	0,086
46	19611	19701		0,0000	U		
46	19611	19702		0,0000	U		
46	19611	19805		0,0426	U		
46	19611	19806		0,0000	U		
46	19612	19646	14-15	0,6576	FS	FS-HS	0,000
46	19612	19701		0,0000	U		
46	19612	19702		0,0000	U		
46	19612	19805		0,0000	U		
46	19612	19806		0,0000	U		
46	19646	19701		0,0997	U		
46	19646	19702	15-16	0,1628	HS	HS-FS	0,002
46	19646	19805		0,0000	U		
46	19646	19806		0,0000	U		
46	19701	19805		0,0350	U		
46	19701	19806		0,0022	U		
46	19702	19805		0,0486	U		
46	19702	19806		0,0837	U		
47	19613	19647	14-15	0,0152	U		
47	19613	19807	14-18	0,3037	FS	FS-HS	0,100
47	19613	19808	14-18	0,2592	HS	HS-FS	0,189
47	19613	19809	14-18	0,5000	FS	FS-HS	0,021
47	19614	19647	14-15	0,0000	U		
47	19614	19807	14-18	0,2084	HS	HS-FS	0,039
47	19614	19808	14-18	0,3281	FS	FS-HS	0,011
47	19614	19809	14-18	0,5922	FS	FS-HS	0,000
47	19647	19807	15-18	0,0000	U		
47	19647	19808	15-18	0,0000	U		
47	19647	19809	15-18	0,0000	U		
51	19617	19650		0,0000	U		
51	19617	19651		0,0848	U		
51	19617	18879		0,0000	U		
51	19617	18880		0,0187	U		
51	19617	19810		0,0335	U		
51	19617	19811		0,0646	U		
51	19617	19812		0,0055	U		
51	19618	19650		0,0000	U		
51	19618	19651		0,1327	U		

Ninho	Ind. 1	Ind. 2	Ano	<i>r</i>	Cat.	H <sub>0</sub> /H <sub>1</sub>	<i>p</i> -value
51	19618	18879		0,0000	U		
51	19618	18880	14-17	0,1899	U	U-HS	0,026
51	19618	19810		0,0904	U		
51	19618	19811		0,0890	U		
51	19618	19812		0,0423	U		
51	19650	18879		0,0000	U		
51	19650	18880		0,0000	U		
51	19650	19810	15-18	0,1773	HS	HS-FS	0,006
51	19650	19811		0,0369	U		
51	19650	19812		0,0000	U		
51	19651	18879		0,0000	U		
51	19651	18880		0,0688	U		
51	19651	19810	15-18	0,3785	FS	FS-HS	0,111
51	19651	19811	15-18	0,2189	HS	HS-FS	0,173
51	19651	19812	15-18	0,0697	HS		
51	18879	19810	17-18	0,1569	HS	HS-FS	0,063
51	18879	19811	17-18	0,2397	HS	HS-FS	0,013
51	18879	19812	17-18	0,1365	HS	HS-FS	0,007
51	18880	19810	17-18	0,4570	FS	FS-HS	0,022
51	18880	19811	17-18	0,4672	FS	FS-HS	0,025
51	18880	19812	17-18	0,0416	U		
52	19619	19652		0,0000	U		
52	19619	19653		0,0734	U		
52	19619	18881		0,0000	U		
52	19619	18882		0,0394	U		
52	19620	19652		0,0000	U		
52	19620	19653		0,0440	U		
52	19620	18881		0,0000	U		
52	19620	18882		0,0000	U		
52	19652	18881		0,0000	U		
52	19652	18882		0,0000	U		
52	19653	18881		0,0000	U		
52	19653	18882	15-17	0,2243	HS	HS-FS	0,051
55	19621	19656		0,0000	U		
55	19622	19656		0,0000	U		
59	19624	19657		0,0834	U		
59	19624	19658		0,0580	U		
61	19661	19705	15-16	0,3530	HS	HS-FS	0,085
61	19661	18883	15-17	0,3784	HS	HS-FS	0,039
61	19661	19813	15-18	0,0000	U		
61	19661	19814	15-18	0,2301	HS	HS-FS	0,022
61	19661	19815	15-18	0,4389	FS	FS-HS	0,014

<b>Ninho</b>	<b>Ind. 1</b>	<b>Ind. 2</b>	<b>Ano</b>	<b>r</b>	<b>Cat.</b>	<b>H<sub>0</sub>/H<sub>1</sub></b>	<b>p-value</b>
61	19662	19705	15-16	0,2896	HS	HS-FS	0,117
61	19662	18883	15-17	0,5916	FS	FS-HS	0,001
61	19662	19813	15-18	0,3386	FS	FS-HS	0,109
61	19662	19814	15-18	0,6772	FS	FS-HS	0,000
61	19662	19815	15-18	0,3427	FS	FS-HS	0,057
61	19663	19705	15-16	0,5000	FS	FS-HS	0,467
61	19663	18883	15-17	0,2769	HS	HS-FS	0,009
61	19663	19813	15-18	0,3336	FS	FS-HS	0,028
61	19663	19814	15-18	0,5381	FS	FS-HS	0,003
61	19663	19815	15-18	0,1933	HS	HS-FS	0,099
61	19705	18883	16-17	0,2829	FS	FS-HS	0,024
61	19705	19813	16-18	0,2319	HS	HS-FS	0,009
61	19705	19814	16-18	0,2183	HS	HS-FS	0,059
61	19705	19815	16-18	0,6811	FS	FS-HS	0,001
61	18883	19813	17-18	0,2230	HS	HS-FS	0,020
61	18883	19814	17-18	0,5000	FS	FS-FS	0,025
61	18883	19815	17-18	0,3612	HS	HS-FS	0,119
62	19625	19664	14-15	0,2166	HS	HS-FS	0,046
62	19625	19665	14-15	0,0000	U		
62	19626	19664	14-15	0,3729	HS	HS-FS	0,055
62	19626	19665	14-15	0,0986	U		
63	19627	19666	14-15	0,1400	HS	HS-FS	0,004
63	19627	19816	14-18	0,0000	U		
63	19627	19817	14-18	0,0000	U		
63	19666	19816	15-18	0,5494	FS	FS-HS	0,068
63	19666	19817	15-18	0,0770	U		
66	19669	19706	15-16	0,0920	HS	HS-U	0,124
66	19669	18884	15-17	0,7820	FS	FS-HS	0,000
66	19669	18885	15-17	0,6668	FS	FS-HS	0,000
66	19669	18886	15-17	0,6346	FS	FS-HS	0,001
66	19669	19818	15-18	0,4856	FS	FS-HS	0,022
66	19669	19819	15-18	0,6530	FS	FS-HS	0,002
66	19670	19706	15-16	0,1153	HS	HS-FS	0,104
66	19670	18884	15-17	0,4630	FS	FS-HS	0,051
66	19670	18885	15-17	0,2836	FS	FS-HS	0,088
66	19670	18886	15-17	0,3089	FS	FS-HS	0,083
66	19670	19818	15-18	0,5776	FS	FS-HS	0,001
66	19670	19819	15-18	0,4399	FS	FS-HS	0,016
66	19671	19706	15-16	0,1346	HS	HS-FS	0,010
66	19671	18884	15-17	0,5664	FS	FS-HS	0,012
66	19671	18885	15-17	0,5272	FS	FS-HS	0,035
66	19671	18886	15-17	0,6346	FS	FS-HS	0,000

Ninho	Ind. 1	Ind. 2	Ano	<i>r</i>	Cat.	H <sub>0</sub> /H <sub>1</sub>	<i>p</i> -value
66	19671	19818	15-18	0,6874	FS	FS-HS	0,002
66	19671	19819	15-18	0,5241	FS	FS-HS	0,006
66	19706	18884	16-17	0,0211	U		
66	19706	18885	16-17	0,0960	U		
66	19706	18886	16-17	0,0378	U		
66	19706	19818	16-18	0,0445	U		
66	19706	19819	16-18	0,0866	U		
66	18884	19818	17-18	0,5308	FS	FS-HS	0,018
66	18884	19819	17-18	0,5587	FS	FS-HS	0,003
66	18885	19818	17-18	0,4161	FS	FS-HS	0,037
66	18885	19819	17-18	0,7022	FS	FS-HS	0,000
66	18886	19818	17-18	0,6605	FS	FS-HS	0,000
66	18886	19819	17-18	0,5875	FS	FS-HS	0,000
71	19677	19708		0,0000	U		
71	19677	18889		0,0000	U		
71	19677	18890		0,0000	U		
71	19678	19707		0,0844	U		
71	19678	19708		0,0000	U		
71	19678	18889		0,0159	U		
71	19678	18890		0,0197	U		
71	19679	19707	15-16	0,1297	HS	HS-FS	0,024
71	19679	19708	15-16	0,2144	HS	HS-FS	0,088
71	19679	18889		0,0112	U		
71	19679	18890		0,0439	U		
71	19707	18889	16-17	0,2356	FS	FS-HS	0,085
71	19707	18890	16-17	0,5699	FS	FS-HS	0,000
71	19708	18889	16-17	0,5109	FS	FS-HS	0,008
71	19708	18890		0,0830	U		
72	19680	19709		0,0000	U		
73	19681	19682		0,0249	U		
73	19681	18891		0,0307	U		
73	19681	19821		0,0274	U		
73	19682	18891		0,0276	U		
73	19682	19821		0,0202	U		
73	18891	19821	17-18	0,3415	HS	HS-FS	0,161
76	19684	19710	15-16	0,5324	FS	FS-HS	0,019
76	19684	19711	15-16	0,2257	U	U-HS	0,118
76	19684	18892	15-17	0,5158	FS	FS-HS	0,040
76	19684	19822	15-18	0,5236	FS	FS-HS	0,000
76	19684	19823	15-18	0,3367	FS	FS-HS	0,031
76	19710	18892	16-17	0,0877	HS		
76	19710	19822	16-18	0,5827	FS	FS-HS	0,005

Ninho	Ind. 1	Ind. 2	Ano	<i>r</i>	Cat.	H <sub>0</sub> /H <sub>1</sub>	<i>p</i> -value
76	19710	19823	16-18	0,2507	HS	HS-FS	0,090
76	19711	18892	16-17	0,2959	HS	HS-FS	0,152
76	19711	19822	16-18	0,4045	FS	FS-HS	0,012
76	19711	19823	16-18	0,3134	FS	FS-HS	0,048
76	18892	19822	17-18	0,2678	HS	HS-FS	0,039
76	18892	19823	17-18	0,3533	FS	FS-HS	0,052
78	19685	19712		0,0907	U		
78	19685	19713		0,0800	U		
78	19685	18895		0,0000	U		
78	19685	18896		0,0000	U		
78	19685	19824		0,0349	U		
78	19685	19825		0,0316	U		
78	19686	19712		0,0000	U		
78	19686	19713		0,0000	U		
78	19686	18895		0,0409	U		
78	19686	18896	15-17	0,1519	U	U-HS	0,026
78	19686	19824	15-18	0,1481	HS	HS-FS	0,012
78	19686	19825	15-18	0,5000	FS	FS-HS	0,288
78	19712	18895	16-17	0,5845	FS	FS-HS	0,002
78	19712	18896	16-17	0,5528	FS	FS-HS	0,008
78	19712	19824	16-18	0,0033	U		
78	19712	19825	16-18	0,0220	U		
78	19713	18895	16-17	0,5463	FS	FS-HS	0,009
78	19713	18896	16-17	0,3106	FS	FS-HS	0,127
78	19713	19824	16-18	0,1279	U	U-HS	0,119
78	19713	19825	16-18	0,0060	U		
78	18895	19824	17-18	0,0489	U		
78	18895	19825	17-18	0,0695	U		
78	18896	19824	17-18	0,0000	U		
78	18896	19825	17-18	0,0277	U		
79	19687	19714		0,1091	U		
79	19687	19715		0,0456	U		
84	19719	18898		0,0303	U		
84	19719	19826		0,0000	U		
84	19719	19827		0,0000	U		
84	19720	18898	16-17	0,1858	HS	HS-FS	0,025
84	19720	19826		0,0289	U		
84	19720	19827		0,0000	U		
84	18898	19826	17-18	0,2030	HS	HS-FS	0,028
84	18898	19827		0,0275	U		
86	18899	19828	17-18	0,5067	FS	FS-HS	0,000
87	19721	19722		0,0000	U		

<b>Ninho</b>	<b>Ind. 1</b>	<b>Ind. 2</b>	<b>Ano</b>	<b>r</b>	<b>Cat.</b>	<b>H<sub>0</sub>/H<sub>1</sub></b>	<b>p-value</b>
87	19721	19829		0,0000	U		
87	19722	19829		0,0952	U		
88	19723	18900		0,0000	U		
88	19723	18901		0,0000	U		
88	19723	19830		0,0000	U		
88	19724	18900		0,1099	U		
88	19724	18901		0,0000	U		
88	19724	19830		0,0000	U		
88	18900	19830	17-18	0,6691	FS	FS-HS	0,002
88	18901	19830	17-18	0,5429	FS	FS-HS	0,034
90	18902	19831	17-18	0,6581	FS	FS-HS	0,002
90	18902	19832	17-18	0,4153	FS	FS-HS	0,000
90	18903	19831	17-18	0,3004	HS	HS-FS	0,049
90	18903	19832	17-18	0,8000	FS	FS-HS	0,000
93	19728	19833		0,0000	U		
93	19728	19834		0,0000	U		
94	19729	18905		0,0000	U		
97	19730	19837		0,0000	U		
99	19733	18906		0,0000	U		
99	19733	19840		0,0000	U		
99	19733	19841		0,0423	U		
99	19734	18906		0,0000	U		
99	19734	19840		0,0000	U		
99	19734	19841		0,0959	U		
99	18906	19840		0,0000	U		
99	18906	19841		0,0000	U		
101	18907	19842		0,0000	U		
103	19738	18908	16-17	0,3531	FS	FS-HS	0,101
103	19738	18909	16-17	0,2655	FS	FS-HS	0,106
103	19738	19843		0,0326			
103	19738	19844		0,0000			
103	19739	18908	16-17	0,4922	FS	FS-HS	0,010
103	19739	18909	16-17	0,3164	FS	FS-HS	0,114
103	19739	19843		0,0000	U		
103	19739	19844		0,0000	U		
103	18908	19843		0,0000	U		
103	18908	19844		0,0000	U		
103	18909	19843		0,0000	U		
103	18909	19844		0,0000	U		
106	19740	19845	16-18	0,5883	FS	FS-HS	0,0000
106	19740	19846	16-18	0,4628	FS	FS-HS	0,0010
106	19741	19845	16-18	0,3473	FS	FS-HS	0,054

Ninho	Ind. 1	Ind. 2	Ano	<i>r</i>	Cat.	H <sub>0</sub> /H <sub>1</sub>	<i>p</i> -value
106	19741	19846	16-18	0,5691	FS	FS-HS	0,000
108	19742	19848	16-18	0,4095	FS	FS-HS	0,024
119	19747	18912		0,0000	U		
119	19747	19849		0,0000	U		
119	18912	19849		0,0000	U		
125	19751	18915	16-17	0,6096	FS	FS-HS	0,006
125	19752	18915	16-17	0,4303	FS	FS-HS	0,058
125	19753	18915	16-17	0,1780	HS	HS-HS	0,028
126	18916	19850	17-18	0,2057	HS	HS-FS	0,032
126	18916	19851	17-18	0,2153	HS	HS-FS	0,071
126	18917	19850	17-18	0,1740	U	U-HS	0,069
126	18917	19851	17-18	0,0823	HS	HS-FS	0,009
126	18918	19850	17-18	0,1666	HS	HS-FS	0,039
126	18918	19851	17-18	0,3423	HS	HS-FS	0,051
130	18922	19854		0,3925	HS	HS-FS	0,092
130	18923	19854		0,5089	FS	FS-HS	0,007
131	18924	19857		0,0000	U		
131	18924	19858		0,0000	U		
133	18926	19859		0,0000	U		
133	18926	19860		0,0000	U		
139	18931	19862	17-18	0,4149	FS	FS-HS	0,075
139	18931	19863	17-18	0,4630	FS	FS-HS	0,013
139	18932	19862	17-18	0,6798	FS	FS-HS	0,000
139	18932	19863	17-18	0,4275	FS	FS-HS	0,077
140	18933	19864	17-18	0,2908	FS	FS-HS	
141	18934	19865		0,0556	U		
141	18934	19866		0	U		
142	18936	19867		0	U		
143	18937	19869	17-18	0,3152	FS	FS-HS	0,107
144	18940	19870		0,0000	U		
144	18940	19871		0,0848	U		
145	18941	19872	17-18	0,3303	HS	HS-FS	0,112
145	18941	19873	17-18	0,1900	HS	HS-FS	0,001
145	18942	19872	17-18	0,4200	FS	FS-HS	0,083
145	18942	19873	17-18	0,4904	FS	FS-HS	0,000
152A	18949	19880	17-18	0,3159	HS	HS-FS	0,085
152A	18949	19881	17-18	0,0738	U	U-HS	0,062
152A	18950	19880	17-18	0,2218	HS	HS-FS	0,076
152A	18950	19881	17-18	0,3931	FS	FS-HS	0,038
157	18956	19885		0,0164	U		
157	18956	19886		0,1146	U		

FS: *full sib* (irmãos-completos); HS: *half sibs* (meios-irmãos); U: *unrelated* (não-aparentados)

**Apêndice 12.** Resultados das análises de parentesco de três possíveis trocas de ninho sugeridos pelas observações de campo. **Ind 1 e Ind 2:** Número LGEMA dos indivíduos 1 e 2; **Ninho 1 e Ninho 2:** ninhos onde os indivíduos 1 e 2 foram amostrados com o ano correspondente entre parênteses; **r:** coeficiente de parentesco; **Cat.:** categoria de parentesco com maior probabilidade;  $H_0/H_1$ : hipótese nula e hipótese alternativa; **p-value:** *p*-valor associado ao teste de hipóteses

Ind 1	Ninho 1	Ano 1	Ind 2	Ano 2	Ninho 2	r	Cat.	H0/H1	p-valor
18920	129	2017	18926	2017	133	0.1735	HS	HS/FS	0,0091
18920	129	2017	19859	2018	133	0.0000	U	U/HS	
18920	129	2017	19860	2018	133	0.0206	U	U/HS	
18921	129	2017	18926	2017	133	0.0000	U	U/HS	
18921	129	2017	19859	2018	133	0.0000	U	U/HS	
18921	129	2017	19860	2018	133	0.0000	U	U/HS	
19581	36	2013	19731	2016	98	0.1309	U	U/HS	
19581	36	2013	19732	2016	98	0.0000	U	U/HS	
19605	36	2014	19731	2016	98	0.4055	FS	FS/HS	0,0060
19605	36	2014	19732	2016	98	0.2447	HS	HS/FS	0,0458
19606	36	2014	19731	2016	98	0.6113	FS	FS/HS	0,0766
19606	36	2014	19732	2016	98	0.7421	FS	FS/HS	0,0230
19607	36	2014	19731	2016	98	0.6507	FS	FS/HS	0,0009
19607	36	2014	19732	2016	98	0.2612	HS	HS/FS	0,0019
19640	36	2015	19731	2016	98	0.0000	U	U/HS	
19640	36	2015	19732	2016	98	0.0000	U	U/HS	
19641	36	2015	19731	2016	98	0.0000	U	U/HS	
19641	36	2015	19732	2016	98	0.0000	U	U/HS	
19726	91	2016	18934	2017	141	0.0192	U	U/HS	
19726	91	2016	19865	2018	141	0.0000	U	U/HS	
19726	91	2016	19866	2018	141	0.0901	U	U/HS	
19726	91	2016	18914	2017	121	0.0000	U	U/HS	
19727	91	2016	18934	2017	141	0.0000	U	U/HS	
19727	91	2016	19865	2018	141	0.0000	U	U/HS	
19727	91	2016	19866	2018	141	0.0309	U	U/HS	