



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**Análises genéticas e ações educativas direcionadas a *Amazona vinacea*  
(papagaio-de-peito-roxo): contribuições à conservação da espécie no Parque  
Nacional das Araucárias**

Talita Roberto Aleixo de Almeida

Botucatu, SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**Análises genéticas e ações educativas direcionadas a *Amazona vinacea* (papagaio-de-peito-roxo): contribuições à conservação da espécie no Parque Nacional das Araucárias**

Aluno: Talita Roberto Aleixo de Almeida

Orientador: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Dra. Flávia Torres Presti

Coorientador: Dra. Vanessa Paes da Cruz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Botucatu/SP

2019

## Ficha catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Almeida, Talita Roberto Aleixo de.

Análises genéticas e ações educativas direcionadas a *Amazona vinacea* (papagaio-de-peito-roxo) : contribuições à conservação da espécie no Parque Nacional das Araucárias / Talita Roberto Aleixo de Almeida. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Flávia Torres Presti

Coorientador: Vanessa Paes da Cruz

Capes: 20200005

1. Papagaio (Ave). 2. Aves - Proteção. 3. Características da população. 4. Variação Variação genética.

Palavras-chave: *Amazona vinacea*; conservação; estratégias educacionais; estrutura populacional; variabilidade genética.

*A todos os meus professores,  
que desde os anos iniciais de ensino  
foram fundamentais para eu chegar até aqui.*

***Dedico***

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko, pelo acolhimento e oportunidade de desenvolver esse trabalho e por me orientar ao longo de sete anos.

À Dra. Flávia Torres Presti, pela coorientação, pelas discussões e confiança em desenvolver o presente trabalho.

À Dra. Vanessa Paes da Cruz, pela coorientação, pelas discussões, confiança e por sempre estar disposta a me ajudar ao longo desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e seus funcionários, pelo auxílio na realização desse trabalho.

Ao Diogo, Daiana, Adauto, André e Luiz, pela colaboração nos materiais didáticos produzidos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética, por toda colaboração e suporte oferecidos durante esse tempo de trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Instituto Espaço Silvestre que concedeu as amostras biológicas de *Amazona vinacea* para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira e ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelo apoio e pela infraestrutura cedida para que eu pudesse realizar uma parte desse trabalho.

Ao Rafael Takahiro, por todo o carinho, presença e apoio em todos os momentos.

À família Nakajima, por todo carinho e apoio nesses dois anos.

Aos meus amigos Bruna, Érica, Carol, Camila, Sabrina, July, Paty, Chokito e Akira, por toda amizade, carinho e apoio.

Às minhas crianças Lívia, Mimi, Gigio e Doninho que só enchem o coração de amor e alegria.

A toda minha família, pelo amor, apoio e incentivo. Muito obrigada pelos conselhos, ensinamentos, valores familiares e pelo exemplo de honestidade e trabalho.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

## Resumo

*Amazona vinacea* (Kuhl, 1820) (papagaio-de-peito-roxo) é uma espécie de psitacídeo considerada ameaçada de extinção em consequência, principalmente, da perda de seu habitat e do intenso tráfico ilegal. Sua população original era distribuída desde a região do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul no Brasil, incluindo ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones na Argentina. Atualmente, sua distribuição encontra-se fragmentada e estima-se que o número de indivíduos em vida livre no Brasil esteja entre 1.000 a 2.500 animais. Diante do exposto, com o objetivo de estimar os níveis de diversidade genética de *A. vinacea* e o grau de parentesco, foram analisados indivíduos reintroduzidos no Parque Nacional das Araucárias no Estado de Santa Catarina e também de animais cativos de diferentes regiões do Brasil, por meio de marcadores moleculares microssatélites e da região controle D-loop do DNA mitocondrial. Foram genotipadas 160 amostras de *A. vinacea* para 7 locos microssatélites e 103 amostras foram sequenciadas para caracterização do DNA mitocondrial. Os resultados obtidos detectaram uma alta variabilidade genética em *A. vinacea*, quando comparada com outros psitacídeos. Uma maior variabilidade foi observada nos locos de microssatélites quando comparados com a região controle do DNA mitocondrial. As análises de diferenciação genética apontaram uma baixa estruturação entre os grupos amostrados, o que pode sugerir fluxo gênico ou expansão populacional / colonização recente. Nas comparações par-a-par entre os indivíduos, as análises de parentesco indicaram que mais de 80% destes não são relacionados. No presente trabalho, também foram desenvolvidos materiais didáticos relacionados à biologia e conservação de *A. vinacea*, como objetivo complementar. Os resultados e materiais gerados poderão melhor subsidiar programas e ações para conservação de populações reintroduzidas e de cativeiro de *A. vinacea*.

Palavras-chave: *Amazona vinacea*, conservação, estrutura populacional, variabilidade genética, estratégias educacionais.

## Abstract

*Amazona vinacea* (Kuhl, 1820) (purple-breasted parrot) is a parrot species that is considered endangered, especially as a result of habitat loss and intense illegal traffic. Its original population was found from the south region of Bahia to Rio Grande do Sul in Brazil, and also included the southeastern Paraguay and the province of Misiones in Argentina. Its current distribution is fragmented and it is estimated that the number of free-living individuals in Brazil is around 1,000 to 2,500 animals. Due to this scenario, in order to estimate the levels of genetic diversity of *A. vinacea* and the kinship degree, animals that were reintroduced at the National Park of Araucárias at Santa Catarina State and also captive individuals from different regions of Brazil were analyzed throughout microsatellite molecular markers and the D-loop control region of the mitochondrial DNA. A total of 160 samples of *A. vinacea* were genotyped for 7 microsatellite locos and 103 samples were sequenced in order to characterize the mitochondrial DNA. The results indicated a high genetic variability in *A. vinacea*, when compared to other Psittacidae species. A higher variability was observed in microsatellite locos when compared to the mitochondrial DNA control region. Genetic differentiation analyzes indicated low structuring among the sampled groups, which could suggest gene flow or population expansion / recent colonization. In pairwise comparisons between the individuals, kinship analyzes indicated that more than 80% of these are unrelated. In the present work, educational materials related to the biology and conservation of *A. vinacea* were also developed, as an additional goal. The obtained results and materials could be used to subsidize programs and actions for the conservation of reintroduced and captive populations of *A. vinacea*.

Key words: *Amazona vinacea*, conservation, genetic structure, diversity index, education strategies.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplos de <i>Amazona vinacea</i> (papagaio-de-peito-roxo)	26
<b>Figura 2.</b> Mapa de ocorrência de <i>Amazona vinacea</i>	27
<b>Figura 3.</b> Visualização da amplificação dos genes <i>CHD1-Z</i> e <i>CDH1-W</i> em indivíduos de <i>Amazona vinacea</i> em gel de agarose	47
<b>Figura 4.</b> Gráfico representativo da estimativa de grupos gênicos	53
<b>Figura 5.</b> Estimativa de estrutura populacional em <i>Amazona vinacea</i> com bases em inferências de <i>memberships</i> proporcionais (K=2)	53
<b>Figura 6.</b> Rede de relacionamento de haplótipos de um fragmento de 558 pb da região controle do DNA mitocondrial de exemplares de <i>Amazona vinacea</i> de quatro grupos amostrais	58
<b>Figura 7.</b> Gráfico de distribuição das diferenças nucleotídicas aos pares ( <i>mismatch distribution</i> ) para haplótipos encontrados em amostras de <i>Amazona vinacea</i> para a espécie como um todo	61
<b>Figura 8.</b> Exemplo de ilustração que compõem a cartilha educativa	88
<b>Figura 9.</b> Imagem da gravação do áudio-book: <i>Papagaio-de-peito-roxo: por que conservar?</i>	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número amostral e origem das amostras	32
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos <i>primers</i> dos microssatélites	34
<b>Tabela 3.</b> Análise de variabilidade por loco para indivíduos de <i>Amazona vinacea</i> de cada grupo amostral	49

<b>Tabela 4.</b> Índices de fixação FIS, FIT e $F_{ST}$ baseados em locos microssatélites de <i>Amazona vinacea</i>	50
<b>Tabela 5.</b> Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) dos sete locos microssatélites para amostragens de <i>Amazona vinacea</i>	50
<b>Tabela 6.</b> Tamanho efetivo populacional em diferentes grupos amostrais de <i>Amazona vinacea</i>	50
<b>Tabela 7.</b> Sítios variáveis da região controle do DNA mitocondrial	51
<b>Tabela 8.</b> Valores de índices de diversidade genética	52
<b>Tabela 9.</b> Atribuição dos grupos através do <i>assignment test</i>	54
<b>Tabela 10.</b> Índices de fixação $F_{ST}$ e $R_{ST}$ a partir da análise de microssatélites	54
<b>Tabela 11.</b> Índices de fixação $F_{ST}$ a partir da análise da região controle do DNA mitocondrial	55
<b>Tabela 12.</b> Valor de $\Phi_{ST}$ , calculado pela AMOVA	56
<b>Tabela 13.</b> Resultado da AMOVA para três grupos de <i>Amazona vinacea</i>	57
<b>Tabela 14.</b> Classificação do teste de <i>Wilcoxon signed-rank</i> do equilíbrio de mutação e deriva estimado para sete locos de microssatélites para cada grupo amostrado de <i>Amazona vinacea</i> e para a espécie como um todo	59
<b>Tabela 15.</b> Índices de neutralidade D de Tajima ( $D_T$ ), $F_s$ de $F_u$ ( $F_s$ ), $D^*$ e $F^*$ para cada grupo amostrado de <i>Amazona vinacea</i> e para a espécie como um todo	60
<b>Tabela 16.</b> Média e variância de valor de parentesco entre exemplares de <i>Amazona vinacea</i> calculadas a partir de sete estimadores	63
<b>Tabela 17.</b> Porcentagem das combinações par-a-par relacionada às categorias de parentesco entre os grupos amostrados de <i>Amazona vinacea</i>	63
<b>Tabela 18.</b> Análise dos estimadores de parentesco	64

**Tabela 19.** Probabilidade de parentesco 64

**Tabela 20.** Comparação dos níveis de diversidade genética entre diferentes espécies de psitacídeos do gênero *Amazona* 67

# SUMÁRIO

<b>Capítulo I</b>	16
1 Introdução	17
1.1 Conservação Biológica e Genética	17
1.2 Marcadores moleculares	19
1.3 Análise de parentesco	22
1.4 Família Psittacidae	23
1.5 <i>Amazona vinacea</i>	25
1.6 Justificativa	29
2 Objetivo	30
3 Materiais e Métodos	31
3.1 Obtenção de material biológico	31
3.2 Extração de DNA total	32
3.3 Quantificação do DNA amostral	33
3.4 Sexagem molecular	33
3.5 Reação de amplificação dos locos de microsatélites	34
3.6 Reação de amplificação (PCR) e purificação da região controle do DNA mitochondrial	36
3.7 Reação de Sequenciamento	37
3.8 Análise dos dados	38

3.8.1	Microssatélites	38
3.8.2	DNA mitocondrial	39
3.8.3	Estrutura Genética Populacional	40
3.8.4	Inferência Demográfica	42
3.8.5	Análises de Parentesco	44
4	Resultados	46
4.1	Isolamento de DNA	46
4.2	Sexagem molecular	46
4.3	Caracterização dos locos de microssatélites e identificação de erros de genotipagem	47
4.4	Sequência da região controle do DNA mitocondrial	51
4.5	Diferenciação genética	52
4.6	Inferências Demográficas	58
4.7	Análise de Parentesco	62
5	Discussão	65
5.1	Sexagem molecular	65
5.2	Variabilidade Genética	67
5.3	Estrutura Genética	70
5.4	Inferências Demográficas	73
5.5	Microssatélites e Estimadores de Parentesco	75
5.6	Implicações para Conservação	78

5.6.1	Indivíduos cativos de <i>Amazona vinacea</i>	78
5.6.2	Reintrodução de <i>Amazona vinacea</i> no Parque Nacional das Araucárias	80
6	Considerações Finais e Conclusões	83
	<b>Capítulo II</b>	84
1	Introdução e Justificativa	85
2	Objetivos	86
3	Desenvolvimento	87
4	Resultados	88
5	Perspectivas	89
	<b>Referências Bibliográficas</b>	90
	<b>Anexos</b>	
	Anexo 1	108
	Anexo 2	115

# Capítulo I

## Análises genéticas em *Amazona vinacea*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Conservação Biológica e Genética

Estima-se que, desde o século XVII, muitas espécies foram extintas na natureza de forma acelerada, a qual supera a taxa natural de extinção (Ceballos *et al.*, 2015). Muitas de suas perdas ocorrem devido ao desmatamento, conversão de paisagens naturais em reflorestamentos, pastagens e culturas agrícolas, ocasionados pela expansão industrial e urbana (Allendorf *et al.*, 2008; Ceballos *et al.*, 2015). Como consequência dessas intervenções, uma alteração global ainda não planejada está sendo testemunhada, com efeitos diretos sobre a diversidade biótica do planeta (Smith e Bernatchez, 2008).

Populações que apresentam diminuição no número de indivíduos são mais sujeitas aos fatores estocásticos ambientais, demográficos e genéticos e a perda de habitat pode diminuir o fluxo gênico entre populações, assim como pode redcarouzir ou eliminar a colonização por espécies presentes em áreas vizinhas (Pires *et al.*, 2006). É importante ressaltar também que espécies que são caracterizadas por longo período de geração, ou por estruturas populacionais fragmentadas, tornam-se menos capazes de se adaptar rápido o suficiente para acompanhar o ritmo das alterações humanas no meio ambiente. Tais características biológicas contribuem, juntamente com fatores não evolutivos, para o que tem sido chamada de perspectiva iminente da sexta extinção em massa da Terra (Carroll *et al.*, 2014).

A redução da diversidade genética diminui o potencial de adaptação das populações em resistir às variações ambientais via seleção natural (Primack & Rodrigues, 2002). Populações de espécies raras têm, em geral, menor variação genética em relação às mais comuns e, por isso, são mais vulneráveis à extinção em locais de baixa resistência ambiental (Ridley, 2006). Esses fatores atuam nas populações pequenas, acentuando ainda mais a redução no número de

indivíduos, tornando-as mais vulneráveis aos próprios fatores estocásticos e dirigindo-as à extinção, entrando em um ciclo conhecido como vórtex da extinção (Gilpin & Soulé, 1986).

Diante desse cenário, a área da Genética da Conservação emergiu para empregar teorias e técnicas da Genética em programas de conservação com o objetivo de reduzir os riscos de extinção, principalmente em espécies ameaçadas (Frankham *et al.*, 2008). Para minimizar essa problemática, diversas medidas para a conservação de espécies têm sido propostas e implementadas, especialmente por instituições acadêmicas e organizações não governamentais, com o objetivo de diminuir os riscos da perda da biodiversidade. Entre essas propostas, podem ser destacadas aquelas que apontam áreas e ações prioritárias para a conservação e ações que incluem desde o monitoramento de populações em ambiente naturais (*in situ*), manejo de populações cativas (*ex situ*) e programas de reintrodução que visam o restabelecimento de populações viáveis na natureza (Bencke *et al.* 2006; Haigh *et al.* 2016).

A reintrodução consiste em uma medida de manejo baseada na liberação de animais em um ambiente natural apropriado, desde que ocorra dentro da área original de abrangência da espécie e que já tenha existido uma população de vida livre no local escolhido (IUCN, 2014). Entretanto, em alguns casos, abordagens genéticas são desconhecidas ou negligenciadas em programas de reintrodução. Geralmente, as populações reintroduzidas possuem poucos indivíduos e estes podem estar sujeitos aos efeitos de deriva genética e endogamia (Frankham *et al.*, 2008).

O manejo de populações cativas desempenha um papel importante na conservação de espécies em condições artificiais atuando como ferramenta de gestão para garantir a segurança demográfica (Witzenberg & Hochkirch, 2011; Haigh *et al.* 2016). Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), quando o número de indivíduos restantes

de uma determinada espécie ameaçada está em declínio, esta deve ser trazida para cativeiro como estratégia para atingir condições mais seguras a fim de restaurar o tamanho populacional. Entretanto, um dos desafios para a propagação em longo prazo de animais em cativeiros é amenizar a redução da diversidade genética e da heterozigose, uma vez que estas reduções ocorrem porque as populações de cativeiro são, geralmente, menores que as populações naturais e dessa forma estão mais expostas aos efeitos da deriva genética, endocruzamento e efeitos fundadores (Witzenberg & Hochkirch, 2011).

Programas que visam a reprodução em cativeiro e a reintrodução de animais na natureza podem ser beneficiados por dados de diversidade genética, por intermédio da identificação de populações e/ou indivíduos potenciais para evitar a depressão endogâmica e exogâmica (Frankham *et al.*, 2008). Tais informações genéticas são atualmente obtidas por meio de diferentes marcadores moleculares, associados tanto ao genoma nuclear quanto ao genoma mitocondrial. O uso desses marcadores, associado a análises estatísticas, tem se mostrado extremamente eficiente em estudos direcionados à conservação e uso de recursos genéticos.

## **1.2 Marcadores moleculares**

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação de ácidos nucleicos, o que levou à análise de diferentes tipos de marcadores moleculares desde a década de 1980. Tais marcadores moleculares podem corresponder a qualquer loco gênico, ou seu próprio produto, que apresente polimorfismos inerentes e que possam ser aplicados em estudos que buscam compreender um aspecto biológico. De maneira mais ampla, marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de qualquer outro segmento específico de DNA (Awise, 2004).

Os dados resultantes de análises genéticas embasadas em diferentes tipos de marcadores moleculares representam ferramentas poderosas e informativas para ecólogos e geneticistas da conservação definirem, por exemplo, a escala geográfica e a área adequada para realização de monitoramento e manejo das populações (Feral, 2002; Caparroz *et al.*, 2013), a estrutura genética entre populações de uma mesma espécie (Presti *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2019), identificar o sexo de espécies que não apresentam dimorfismo sexual aparente (Bantock *et al.*, 2007), verificar a origem geográfica de um indivíduo e dar suporte ao controle do tráfico ilegal de animais (Presti *et al.*, 2015). Dentre os marcadores utilizados em análises genéticas com tais enfoques, destacam-se a região controle do DNA mitocondrial (DNAMt) e os microssatélites, por serem altamente polimórficos e possuírem altas taxas de mutação (Collet, 2004).

O genoma mitocondrial em animais é constituído de uma molécula circular covalentemente fechada de pequeno tamanho, que possui em média 16 kb de comprimento, sendo herdado maternalmente e geralmente não apresentando recombinação gênica (Avisé *et al.*, 1994). Este está organizado em 37 genes codificantes, dos quais 22 resultam em RNAs transportadores, 2 são para RNAs ribossomais e 13 são transcritos em RNAs mensageiros e traduzidos, principalmente, nos complexos proteicos responsáveis pela dinâmica da cadeia transportadora de elétrons (Avisé, 2000). O tamanho efetivo populacional, calculado baseando-se no DNA mitocondrial é quatro vezes menor quando comparado ao calculado para o genoma nuclear (Haavie *et al.*, 2000) e a variabilidade encontrada no DNA mitocondrial é menor do que a encontrada para os microssatélites (Avisé, 2000). Embora o DNA mitocondrial seja relativamente bem conservado entre distintas espécies animais, sua ordem e estrutura gênica têm mostrado variação em diferentes grupos de aves e um exemplo dessas diferenças está relacionado à região controle, denominada de D-loop. A região controle é caracterizada por apresentar alta variabilidade devido, principalmente, a substituições de nucleotídeos, presença

de curtas deleções e inserções e variação no número de repetições em *tandem* (Hartl & Clark, 1997).

A região controle do DNA mitocondrial vem sendo analisada para identificar o nível da variabilidade genética em diversas espécies de aves, como *Dendroica petechia* (mariquita-amarela) (Browne *et al.*, 2008), *Phalacrocorax auritus* (biguá de crista dupla) (Mercer *et al.*, 2013), *Larus dominicanus* (gaivotão) (Dantas, 2012), em espécies diversas das famílias Phasianidae (Huang & Ke, 2016), Anatidae (Warzecha, *et al.*, 2018) e Psittacidae (Eberhard *et al.*, 2001; Caparroz, 2009; Fernandes *et al.*, 2013). Tais informações mostram-se úteis na proposição e desenvolvimento de estratégias conservacionistas e planos de manejo populacional, especialmente aquelas associadas a espécies e/ou populações ameaçadas de extinção.

Outra técnica que tem sido muito utilizada para estudos biológicos envolve a aplicação de marcadores nucleares do tipo microssatélites (SSRs – *Simple Sequence Repeats*), os quais são compostos por unidades de sequências de 1 a 6 pares de bases (pb) repetidas *em tandem* e apresentam repetições di, tri, tetra e hexanucleotídicas. Sendo as di, tri, e tetra mais comuns em estudos genéticos (Tautz, 1989; Selkoe & Toonen, 2006). O número das unidades de repetição é altamente variável entre SSRs localizados no mesmo loco e em locos distintos. Isso confere elevado nível de polimorfismo, a ponto de a probabilidade de dois indivíduos compartilharem os mesmos SSRs ser praticamente nula. Um microssatélite possui tipicamente cerca de 100 pares de bases (pb) no total (Bruford *et al.*, 1996) e, por isso, é facilmente amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), não necessitando de grande quantidade inicial de DNA molde. Além disso, os SSRs apresentam ampla distribuição no genoma e comumente possuem herança codominante, o que permite diferenciar indivíduos heterozigotos de indivíduos homozigotos e

apresentam alta taxa de mutação, cerca de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ , por loco por geração - quando comparada à taxa estimada de mutação pontual de cerca de  $10^{-10}$  no genoma nuclear (Hancock, 1999).

Uma das limitações para o uso de SSRs é a quantidade de tempo e de recursos financeiros necessários para o desenvolvimento dos *primers* utilizados na amplificação. Entretanto, o uso de *primers* heterólogos, isto é, desenvolvidos para uma espécie filogeneticamente próxima da espécie de interesse, pode reduzir o custo e o tempo das pesquisas (Parker *et al.*, 1998). Atualmente, diversos *primers* para amplificação de locos SSRs têm sido descritos para psitacídeos e testados em espécies proximalmente relacionadas, como para o papagaio de São Vicente (*Amazona guildingii*) (Russello *et al.*, 2001; Russello *et al.*, 2005), arara canindé (*Ara ararauna*) (Caparroz *et al.*, 2009), caturrita ou periquito-monge (*Myiopsitta monachus*) (Russello *et al.*, 2007), papagaio cubano (*Amazona leucocephala*) (Taylor & Parkin, 2007) e papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) (Fernandes *et al.*, 2019). Dessa forma, o uso de *primers* heterólogos tem sido uma ferramenta importante para acessar os níveis de variabilidade genética em espécies filogeneticamente próximas.

Tanto os segmentos da região controle do DNA mitocondrial como SSRs podem ser analisados como indicadores de variabilidade genética populacional e, portanto, mostram-se úteis na proposição e desenvolvimento de estratégias conservacionistas e planos de manejo populacional associados a espécies e/ou populações ameaçadas de extinção.

### **1.3 Análise de parentesco**

O conhecimento sobre grau de parentesco entre indivíduos em uma população é útil em várias áreas de pesquisa como em estudos de evolução e comportamento, ecologia e conservação biológica e tem se tornado um dos principais temas no campo da “ecologia

molecular” (Awise, 2004). O parentesco entre indivíduos tem auxiliado diferentes áreas da biologia como, por exemplo, para inferir: (i) sistemas de acasalamento, (ii) padrões de dispersão sexo-diferencial e (iii) processos populacionais históricos-demográficos (Awise, 2004).

O grau de parentesco pode ser inferido diretamente de heredogramas (Ballou & Lacy, 1995), através de cálculos ou do registro genealógico da espécie (*studbook*). Entretanto, o completo *pedigree* dos indivíduos não pode ser determinado devido a algumas limitações, como dificuldade na captura de indivíduos adultos, casos em que a família social não se configura como a família biológica (De Castele *et al.*, 2001) ou quando dados do heredograma não são completos ou são duvidosos (Pemberton, 2004; Boakes *et al.*, 2007). Por essas razões, estudos genéticos através da utilização de marcadores moleculares podem ser bastante úteis nessa abordagem.

Além disso, análises de parentesco têm sido utilizadas na área da genética da conservação a fim de minimizar acasalamentos entre indivíduos proximalmente relacionados e minimizar a perda da diversidade genética por depressão endogâmica (Lynch & Ritland, 1999; Witzenberg & Hochkirch, 2011). Um exemplo de tal aplicação refere-se à escolha de casais fundadores para reprodução em cativeiro, para que a população manejada possa reter o máximo de variação genética a fim de gerar uma população viável a longo prazo.

#### **1.4 Família Psittacidae**

A Família Psittacidae compreende um grupo de aves popularmente conhecidas como araras, papagaios e periquitos (Collar, 1997; Sick, 1997). É composta por aproximadamente 390 espécies distribuídas em 82 gêneros (Handbook of the Birds of the World and BirdLife International, 2017) - com distribuição global, concentrando-se principalmente nas zonas

tropicais (Sick, 1997) - e são reconhecidas pela morfologia de seus bicos curvos e arredondados, suas plumagens coloridas, habilidade mímica e caráter carismático (Forshaw, 1989; Wright *et al.*, 2001). O Brasil é o país mais rico do mundo em aves dessa família, onde são encontradas 84 espécies distribuídas em 24 gêneros. Desde o ano 1500 essa riqueza já era reportada, sendo o Brasil designado pelos portugueses como “Terra dos Papagaios” (Sick, 1997).

Aproximadamente 17% das espécies de psitacídeos são endêmicas do território brasileiro, sendo encontrados em todos os principais ecossistemas do país. Embora a região de maior endemismo seja a Floresta Atlântica, existem espécies que não são endêmicas, mas apresentam atualmente uma distribuição bastante restrita, como é o caso da arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*). Várias outras espécies apresentam distribuição ampla, ocorrendo em grande parte do território nacional, como a arara-vermelha (*Ara chloroptera*) e o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). A Floresta Amazônica é a região mais rica, tanto em número de indivíduos como em número de espécies. O papagaio-galego (*Salvatoria xanthops*) e o periquito-da-catinga (*Eupsittula cactorum*) ocorrem, exclusivamente, nas regiões secas do cerrado e da catinga, enquanto as florestas de Araucária (*Araucaria angustifolia*) do sul do Brasil constituem uma fonte importante de alimento para uma espécie de papagaio (*Amazona petrei*, papagaio charão) (Sick, 1997).

Segundo Wright *et al.* (2001), a família Psittacidae está entre as mais ameaçadas dentre as famílias de aves - cerca de 31%, das espécies de psitacídeos neotropicais encontram-se sob risco de extinção em nível global. No Brasil, 16 espécies estão vulneráveis ou ameaçadas de extinção e constam na Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN). Além destas apresentarem baixas taxas de reprodução, ninhadas pequenas, baixa sobrevivência de indivíduos juvenis e maturidade sexual tardia (Wright *et al.*, 2001), a

interferência antrópica nos ecossistemas naturais tem levado a um acentuado declínio de suas populações e ainda, o tráfico ilegal de animais também tem causado grande impacto sobre as populações de psitacídeos (Wright *et al*, 2001).

Com o objetivo de proteger e recuperar espécies ameaçadas de extinção, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) desenvolveu o Plano de Ação Nacional (PAN) para Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica, que abrange a conservação de quatro espécies do gênero *Amazona* em diferentes níveis de ameaça de extinção, sendo elas: *Amazona brasiliensis* (papagaio-de-cara-roxa), *A. rhodocorytha* (papagaio-chauá), *A. petrei* (papagaio-charão) e *A. vinacea* (papagaio-de-peito-roxo), espécie foco do presente estudo. Segundo a IUCN, *A. vinacea* é classificada como “em perigo” e suas populações tendem a decrescer (IUCN, 2017). O PAN tem como objetivo melhorar o estado de conservação das espécies-alvo através da **redução da perda**, fragmentação e degradação do habitat, do aumento do conhecimento científico das espécies-alvo, atuando na implementação de diversas medidas de manejo e na ampliação do envolvimento da sociedade na conservação das mesmas.

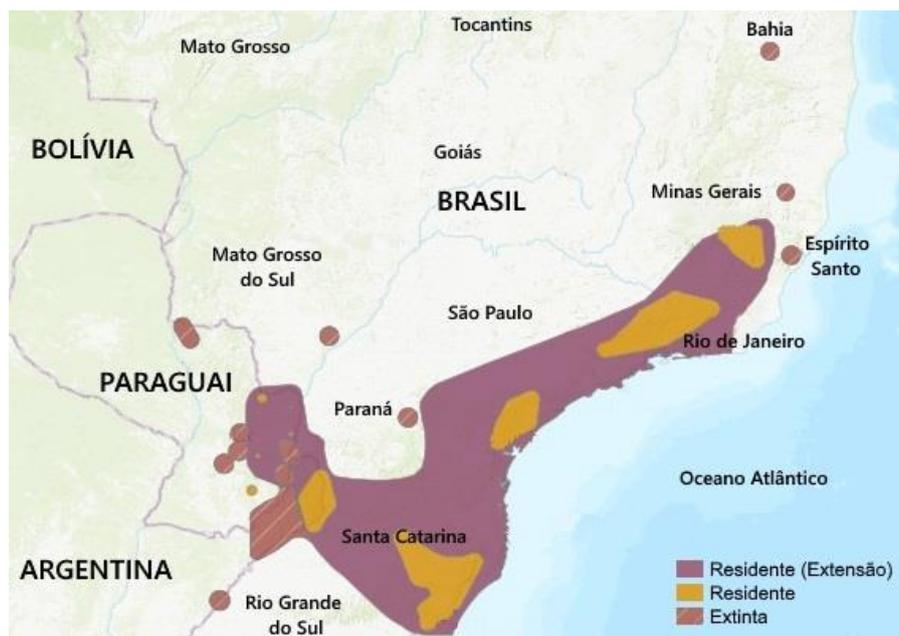
### **1.5 *Amazona vinacea***

A espécie *Amazona vinacea* (Kuhl, 1820) (Figura 1), conhecida popularmente como papagaio-de-peito-roxo, é um representante neotropical da família Psittacidae, pertencente à ordem Psittaciformes (Sick, 1997). Os indivíduos de *A. vinacea* caracterizam-se por apresentar coloração verde na maior parte do seu corpo, colorido roxo nas penas do peito, maxila vermelha com a extremidade branca e a base do bico vermelha (Figura 1). Indivíduos adultos chegam a medir 35 centímetros de comprimento da ponta do bico à ponta da cauda (Sick, 1997).



**Figura 1.** Exemplos de *Amazona vinacea* (papagaio-de-peito-roxo) (Fonte: [www.espacosilvestre.org.br](http://www.espacosilvestre.org.br)).

A espécie é endêmica da Mata Atlântica e estima-se que, atualmente, existam cerca de 1.000 a 2.500 indivíduos em vida livre no Brasil (Cockle *et al.*, 2007). Sua distribuição original abrangia a região do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul no Brasil, incluindo a região do sudeste do Paraguai e a província de Misiones na Argentina (Sick, 1997; Cockle *et al.*, 2007) (Figura 2). Entretanto, sua distribuição atual encontra-se fragmentada, devido principalmente as ações antrópicas, ocasionando a perda de seu habitat (Collar *et al.*, 1997; Urban-Filho *et al.*, 2008) (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa de ocorrência de *Amazona vinacea*. Em roxo contínuo: área total de extensão de distribuição; em laranja: regiões de ocorrência da espécie; e em listrado: regiões onde a espécie foi extinta.

A espécie *A. vinacea* é considerada predominantemente monogâmica, com o casal permanecendo juntos mesmo após a estação reprodutiva (Sick, 1997), a qual se estende de agosto a janeiro, sendo o período de incubação dos ovos de 25 a 26 dias. A postura varia de dois a quatro ovos arredondados, brancos e pequenos, chocados principalmente pela fêmea, a qual é alimentada pelo macho. Tanto o macho quanto a fêmea apresentam dispendioso cuidado parental. Após dois meses, o filhote pode abandonar o ninho, contudo, estes só se separam realmente dos pais apenas quando começam um acasalamento, geralmente após seis a oito meses de vida (Sick, 1997).

Os papagaio-do-peito-roxo nidificam em ocos de árvores normalmente secas, sendo estes ocupados somente na estação reprodutiva. *Apuleia leiocarpa* (garapeira ou amarelinho), *Araucaria angustifolia* (araucária), *Cabrelea canjerana* (cedro-canjerana), *Nectandra lanceolata* (canela-amarela), *Ocote puberula* (canela-guaicá), *Ocote pulchella* (canela-

lageana), *Parapiptadenia rígida* (angico), *Prunus myrtiflorus* (abrunheiro) e *Ruprechtia laxiflora* (marmeleiro-do-mato) (Cockle, *et al.* 2007) representam as principais espécies em que *A. vinacea* faz seus ninhos (Abe, 2004). A espécie utiliza dormitórios coletivos para pernoitar, que podem reunir mais de 100 aves (Prestes & Martinez, 1996).

A alimentação de *A. vinacea* é constituída de sementes, frutos e flores, como a corticeira *Erythrina falcata*, por folhas jovens de eucalipto e pinho, além de folhas e brotos de bambu. Há registros da espécie se alimentando em pomares de frutas e plantações comerciais, como as de laranja e milho (Collar, 1997; Urben-Filho *et al.*, 2008). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2011), indivíduos de *A. vinacea* procuram seu alimento tanto nas copas das árvores mais altas como em arbustos frutíferos, onde se alimentam principalmente de sementes, embora não haja muita contribuição da espécie para a dispersão destas. Durante o inverno, essas aves se alimentam das sementes (pinhão) de *Araucaria angustifolia*, fonte altamente calórica que contribui para a manutenção da temperatura corpórea nesse período (Collar, 1997; Urben-Filho *et al.*, 2008). A espécie parece realizar migrações regionais em busca de alimentação (Collar *et al.*, 1997).

Devido principalmente à degradação ambiental que leva à perda de habitat (locais de alimentação e nidificação) e à captura de indivíduos para comercialização ilegal, o número de exemplares de *A. vinacea* tem decaído nos últimos anos (Cockle, *et al.* 2007). A espécie consta como ameaçada de extinção, na categoria “em perigo” nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Marques *et al.*, 2002; Urben-Filho *et al.*, 2008), “criticamente em perigo” em São Paulo e Espírito Santo e “vulnerável” no estado do Rio de Janeiro (Urben-Filho *et al.*, 2008). A nível mundial, consta na lista vermelha das espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza, na categoria “em perigo” (IUCN, 2017).

Embora estudos ecológicos e etológicos já realizados para a espécie *A. vinacea* possam subsidiar ações para sua conservação (Sick, 1997; Cockle *et al.*, 2007; Prestes *et al.*, 2014), ainda não existem dados genéticos, baseados em marcadores moleculares, para este psitacídeo ameaçado. A ampliação de informações sobre a espécie poderá permitir o desenvolvimento mais efetivo de ações para sua conservação.

## 1.6 Justificativa

*A. vinacea* é uma espécie endêmica da Mata Atlântica e encontra-se em perigo de extinção devido principalmente à perda de habitat e ao tráfico ilegal. Em 2010, ações para conservação e reintrodução da espécie na natureza foram iniciadas no Parque Nacional das Araucárias (SC), por intermédio de ações realizadas pela Organização Não Governamental (ONG) Instituto Espaço Silvestre, cujo principal objetivo é fornecer o suporte necessário para que a população dessa espécie de psitacídeo seja viável em longo prazo. Assim, as aves passam por um rigoroso processo de reabilitação, que inclui a realização exames clínicos e laboratoriais, além de treinamentos comportamentais que as preparam para a vida na natureza.

Embora a ONG conservacionista reconheça a importância de minimizar a perda da diversidade genética na população de papagaios-de-peito-roxo do Parque Nacional das Araucárias, não existem dados na literatura a respeito do *status* genético da espécie. Desta forma, acessar a variabilidade genética de indivíduos de *A. vinacea*, por meio da utilização de diferentes marcadores moleculares, poderá melhor subsidiar programas para sua conservação, incluindo a definição de metas e estratégias mais efetivas que evitem ou minimizem o risco de extinção da espécie.

Os resultados do presente trabalho poderão fornecer subsídios não somente ao projeto de conservação de *A. vinacea* desenvolvido pelo Instituto Espaço Silvestre no Parque Nacional das Araucárias como também, de uma forma mais abrangente, ao Plano de Ação Nacional para Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica (Instituto Chico Mendes - ICMBio, Ministério do Meio Ambiente).

## 2 OBJETIVO

Considerando-se a deficiência de dados moleculares disponíveis para *Amazona vinacea*, o presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar geneticamente indivíduos reintroduzidos na natureza e cativos da espécie, com ênfase em exemplares associados ao Parque Nacional das Araucárias (SC) e, assim, auxiliar futuras ações de conservação dessa espécie de ave.

Visando atingir tal objetivo, este trabalho teve como metas:

- Estimar os níveis de diversidade genética de *A. vinacea*, utilizando marcadores nucleares (SSRs) e mitocondriais;
- Verificar o grau de parentesco entre indivíduos e reconstruir a genealogia dos exemplares reintroduzidos na natureza, por meio da análise de locos SSRs.
- Identificar o número de distribuição de haplótipos de *A. vinacea* associados à região controle do DNA mitocondrial.
- Propor medidas para conservação da espécie com base nos dados gerados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de material biológico

De forma a utilizar procedimentos não-destrutivos de amostragem biológica, foram coletadas alíquotas de sangue da veia braquial da asa de filhotes e de indivíduos adultos de *A. vinacea*, totalizando 160 amostras (Anexo I). Após contenção dos animais, o local de retirada das amostras biológicas foi higienizado com algodão embebido em álcool 70%. Aproximadamente 0,1 ml de sangue da veia braquial da asa foram coletados com seringa descartável e preservados em etanol absoluto. Após a retirada de sangue de cada animal, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 ml contendo álcool etílico absoluto (100%), mantidos a -20°C até o momento de extração do DNA.

As amostras foram separadas em três diferentes categorias: (i) Soltura Sul - grupo de 63 indivíduos apreendidos pelo IBAMA na região sul do país, os quais foram soltos no Parque Nacional (PARNA) das Araucárias em Santa Catarina; (ii) Zoológico - grupo de 31 indivíduos apreendidos pelo IBAMA, os quais se encontram em zoológicos/cativeiros nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; (iii) CETAS - grupo de 42 indivíduos apreendidos pelo IBAMA, os quais se encontram no Centro de Treinamento de Animais Selvagens em Santa Catarina e (iv) Minas Gerais - grupo de 24 indivíduos apreendidos pelo IBAMA no estado de Minas Gerais e que foram soltos no PARNA das Araucárias. O número de amostras utilizadas para o uso dos marcadores SSRs e para o DNA mitocondrial encontra-se descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Número amostral e origem das amostras. Origem (localidade onde amostras foram coletadas), número de amostras de *Amazona vinacea* utilizadas nas análises com microssatélites (Nmic) e número de amostras utilizadas para região controle do DNA mitocondrial (Nmit).

Localidade	Nmic	Nmit
Soltura Sul	63	46
Zoológico	31	31
CETAS	42	18
Minas Gerais	24	8
Total	160	103

### 3.2 Extração de DNA total

A extração de DNA total seguiu o protocolo baseado na utilização de proteinase K e fenol-clorofórmio, modificado segundo Bruford *et al.* (1992). Foram misturados 300 µl de TNE (50mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de EDTA, pH 7,5), 30 µl de Tris HCl 1M pH 7,5, 8 µl de SDS 25% e 20 µl de proteinase K (20mg/mL) e acrescentados cerca de 2 mm<sup>2</sup> do sangue coagulado. O material foi incubado a 37°C durante cerca de 10 horas ou a 55°C por 4 horas, em banho-maria. Após a incubação, foram acrescentados, aproximadamente, 360 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o tubo foi invertido algumas vezes para misturar as soluções. Em seguida, este foi colocado em vortex por 10 segundos e, por fim, centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. A fase superior da solução foi retirada com auxílio de uma pipeta e transferida para um tubo novo. A esse novo tubo foram adicionados, aproximadamente, 500 µl de etanol absoluto. O tubo foi invertido para precipitação do DNA e centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol a 70% e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. Após o sobrenadante ser descartado, o precipitado foi mantido à temperatura ambiente até que estivesse totalmente seco e posteriormente foi ressuspendido em água ultrapura autoclavada. A solução com DNA diluído foi armazenada em freezer a -20°C.

### 3.3 Quantificação do DNA amostral

A quantificação de DNA genômico total contido em cada amostra individual e a verificação de contaminação por proteínas e/ou solventes orgânicos como álcool/fenol/clorofórmio foi feita por espectrometria com base nas razões de absorbância de luz na faixa de 260/280nm e 230/260nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro da Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific (Thermo-Scientific, EUA).

Para conferir a integridade do DNA genômico, este foi submetido a uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) e visualizado em transluminador, sob luz ultravioleta.

### 3.4 Sexagem molecular

Para identificação de machos e fêmeas de *A. vinacea* foram realizadas reações de amplificação dos genes *CHD I* (*chromo-helicase-DNA-binding*), localizados nos cromossomos sexuais Z e W, via reação em cadeia de polimerase (PCR) seguindo o protocolo descrito por Miyaki *et al.* (1998), utilizando os *primers* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'), originalmente descritos por Griffiths *et al.* (1998).

A amplificação do DNA foi realizada conforme protocolo adaptado de Griffiths (1998), em volume total de 12µl. Cada reação conteve 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/ µl), 0,5 µl de cada *primer* (10 µM), 0,4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,4 µl de dNTPs (4 mM), 1 µl de tampão (10x), 1 µl de DNA (20 a 50 ng/ µl) e 8,1 µl de água ultrapura autoclavada.

As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 5 minutos. Os produtos

de amplificação obtidos foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta.

### 3.5 Reação de amplificação dos locos de microssatélites

Foram testados dez pares de *primers* de SSRs desenvolvidos para espécie *Amazona guildingii* (papagaio-de-são-vicente) (AgGT04, AgGT07, AgGT12, AgGT21, AgGT22, AgGT29, AgGT72, AgGT81, AgGT83 e AgGT90) (Russello *et al.*, 2001; Russello *et al.* 2005) (Tabela 2). O método descrito por Schuelke (2000) foi utilizado para todos os pares de *primers*. Segundo essa metodologia, os *primers* não são marcados com fluorescência, mas um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) é acrescido de uma cauda M13 com 18pb (3' TGTAACGACGACGGCCAGT 5') e marcado com um fluoróforo (FAM, TET ou NED).

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* dos microssatélites. Temperatura de anelamento (Ta), P - Polimórfico e M - Monomórfico.

Loco	Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3')	Repetição	Ta (°C)	Referência	Resultado
AgGT04	F: CTTGCTCCACTGAAAGG	(GT) <sub>11</sub>	55	Russello <i>et al.</i> 2001	M
	R: GCGATGAAGATAACCC				
AgGT07	F: CAAACCATTTACACCC	(GT) <sub>21</sub>	50	Russello <i>et al.</i> 2001	P
	R: GCTCTTGAGTTTTCCC				
AgGT12	F: ACTCATGCAGGGGTTCTCAG	(GT) <sub>17</sub>	56	Russello <i>et al.</i> 2001	P
	R: TTGTGGCTGGTAGAGGTGTG				
AgGT21	F: TCCCAGGCCAACACATTTAC	(GT) <sub>21</sub>	54	Russello <i>et al.</i> 2001	P
	R: GCTTAGTGCATATCCCAAGCTA				
AgGT22	F: CCTGGATGTGCTCTGTGATG	(CA) <sub>22</sub>	54	Russello <i>et al.</i> 2005	M
	R: GGAGCACCATAGCTTGAGGA				

<b>AgGT29</b>	F: CATGATGGGTTGGCTTTTTTC R: CTGCAAGCATGCATGAGAAC	(CA) <sub>12</sub>	56	Russelo <i>et al.</i> 2005	P
<b>AgGT72</b>	F: GTCATATGATTGTTGCTAATCAGTG R: AGAACAGCCTTATGGAAAGTTG	(CA) <sub>18</sub>	55	Russelo <i>et al.</i> 2005	M
<b>AgGT81</b>	F: GGGGAACATCATTCTTCCAG R: AGAAGGAGGGAAGCACATGA	(GT) <sub>20</sub>	52	Russelo <i>et al.</i> 2001	P
<b>AgGT83</b>	F: GGCCTGGGTAACAAAAAGGT R: ACCTAAGAGGCCATCCCAGT	(GT) <sub>21</sub>	56	Russelo <i>et al.</i> 2001	P
<b>AgGT90</b>	F: TCCACAATTCTACCGAAGTGG R: ACAGACACATCACTCCCCAAC	(GT) <sub>21</sub>	50	Russelo <i>et al.</i> 2005	P

---

F – forward; R – reverse.

Os protocolos das reações de PCR e as condições de amplificação foram otimizadas para cada um dos *primers*, variando as concentrações dos componentes (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs e *primers*) separadamente e a temperatura de anelamento, quando necessário. As reações de amplificação consistiram em volume final de 10 µl, com 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl de dNTPs (4 mM), 1,2 µl de tampão (10x), 1 µl de DNA (20 a 50 ng/µl) e 4,3 µl de água miliQ autoclavada. As condições de amplificação via PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 52-58°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, além de um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Aproximadamente 2 µl (200 ng/µl) dos produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) para avaliar a qualidade e estimar sua quantidade. Se o produto possuía boa quantidade e qualidade, cerca de 2 µl do marcador molecular GeneScan™ -500

ROX™ STANDARD (2fmol) e 7 µl de formamida deionizada foram misturados a uma alíquota de 1,0 µl de cada uma das amostras amplificadas. Cerca de 10 µl dos produtos de PCR foram analisados em sequenciador automático ABI 3500 (DNA Analyzer - Applied Biosystems) pelo Instituto de Biotecnologia (IBTEC, UNESP). O polimorfismo foi testado em 10 indivíduos e os locos que se mostraram polimórficos foram utilizados na genotipagem dos demais indivíduos.

### **3.6 Reação de amplificação (PCR) e purificação da região controle do DNA mitocondrial**

Segmentos da região controle do DNA mitocondrial foram obtidos utilizando os *primers* Lglu 16376 (5' GCCCCTGAAAARCCATCGT 3') e H522 (5' TGGCCCTGACYTAGGAACCAG 3') (Eberhard *et al.*, 2001), utilizados com sucesso para amplificação de fragmentos de DNA de outros psitacídeos como *Anodorhynchus hyacinthinus* e *Arara ararauna* (Almeida *et al.*, 2019; Caparroz *et al.*, 2009). As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 11 µl, a qual continha 5 µl de água milliQ autoclavada; 4 µl de GoTaq (Promega) (mix pronto 1x contendo 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA Polimerase); 0,5 µl de cada *primer* (10 µM) e 1 µl de DNA (20-50 ng/µL).

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, com um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos. O rendimento do produto da amplificação foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) e visualizado em transluminador, sob luz ultravioleta. Após a checagem da amplificação, cerca de 5 µl de cada produto da reação foi purificado com a adição de 0,5 µl de fosfatase alcalina de camarão (1

U/μl) (Affymetrix, Inc.) e 0,4 μl de exonuclease I (10 U/μl) (Affymetrix, Inc.) e incubado por 45 minutos a 37°C e a 80°C por 15 minutos. Posteriormente, os produtos purificados foram sequenciados.

### 3.7 Reação de Sequenciamento

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

Foram adicionados 4 μl de água ultrapura e 16 μl de etanol 95% e a solução foi misturada em agitador de tubos e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente (~25 °C). A amostra foi posteriormente centrifugada por 30 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante retirado com auxílio de uma micropipeta do lado oposto ao precipitado de DNA. O precipitado foi lavado com cerca de 200 μl de etanol 70% e a solução foi misturada em um agitador de tubos e novamente centrifugada por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi novamente retirado com auxílio de uma micropipeta e a amostra foi mantida a 90 °C durante 2 min para secagem e posteriormente mantida a -20 °C até seu processamento. As sequências foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu.

### 3.8 Análise dos dados

#### 3.8.1 Microssatélites

A identificação dos tamanhos dos alelos foi feita com o auxílio do programa GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems). Para a construção e exportação das matrizes utilizadas em diferentes programas e as estimativas de alelos privados foi utilizado o *software* GENEALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). O número de alelos, os valores de heterozigosidades esperada e observada ( $H_e$  e  $H_o$ ), índice de fixação  $F_{IS}$  e o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (valor significativo  $P < 0,05$ ) foram obtidos a partir do *software* GeneAlex 6.5. Os níveis de significância EHW,  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  foram ajustados usando as correções de Bonferroni (Rice, 1989), sendo a correção padrão para HWE ( $P < \alpha/\kappa$ , onde  $\alpha$  representa o índice de significância 0,05 e  $\kappa$  o número de locos) e sequencial para índices de fixação ( $P < \alpha/\kappa$ , onde  $\alpha$  representa o índice de significância 0,05 e  $\kappa$  o número de estimativas). O desequilíbrio de ligação foi estimado para todos os locos através do programa GENEPOP 4.0.1 (Raymond & Rousset, 1995). Para avaliar a presença de alelos nulos, erros de genotipagem, *stutter bands* e *allele dropout* foi utilizado o programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout, *et al.*, 2004). O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi estimado através do programa NEESTIMATOR versão 2.01 (Peel *et al.*, 2004), utilizando frequência alélica mínima (MAF) de 0,1 e o método de desequilíbrio de ligamento.

O conteúdo da informação polimórfica (PIC), o qual indica a qualidade do marcador genético, foi obtido pelo programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.*, 1998). Os marcadores foram classificados de acordo com o seu valor de PIC em: (i) muito informativos ( $PIC > 0,5$ ), (ii) razoavelmente informativos ( $0,5 > PIC > 0,25$ ) e (iii) pouco informativos ( $PIC < 0,25$ ).

### 3.8.2 DNA mitocondrial

A visualização dos eletroferogramas foi realizada através do programa computacional GENEIOUS v4.8.5 (Drummond *et al.*, 2009), o qual permite a leitura de diversas extensões do sequenciamento. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento.

Posteriormente, as sequências foram editadas e alinhadas e os respectivos eletroferogramas verificados. Cada resultado foi analisado individualmente e comparado ao seu respectivo eletroferograma pelo menos duas vezes. Os alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta (algoritmo) MUSCLE (Edgard, 2004) alocado no programa Geneious v4.8.5. Os alinhamentos foram verificados manualmente, pelo menos duas vezes, e comparados aos seus eletroferogramas para a certificação da posição de bases nitrogenadas nas sequências obtidas. Para confirmar a identidade das sequências, foi utilizado o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990), através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), o qual relaciona sequências por meio de similaridade entre bases nitrogenadas. Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores.

A relação entre os haplótipos foi obtida através do programa computacional ARLEQUIN v3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). A diversidade haplotípica ( $h$ ) (número e a frequência de haplótipos diferentes), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (correspondente ao número de nucleotídeos diferentes por sítio entre sequências escolhidas ao acaso em uma população), além da composição percentual das bases, número de haplótipos, suas frequências e sua distribuição

entre as populações foram estimados com auxílio do programa DNASP v.5.0 (Librado & Rozas, 2009).

### 3.8.3 Estrutura Genética Populacional

O programa STRUCTURE v2.3.4 (Prichard *et al.*, 2000, [www.taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/index.php](http://www.taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/index.php)) foi utilizado para inferir o número de conjuntos gênicos (K) com diferentes frequências alélicas em cada loco, em um conjunto de genótipos multilocus que melhor explica os dados por meio de um método de agrupamento Bayesiano baseado nos SSRs. Os parâmetros utilizados nas análises foram 5.000 passos de *burn-in* e 1.000.000 iterações de MCMC. Cada simulação foi replicada 20 vezes (Evanno *et al.*, 2005). O programa STRUCTURE HARVESTER foi utilizado para inferir qual dos valores de K melhor representa os dados pelo método de Evanno (Earl *et al.*, 2012).

O programa Arlequin realiza a atribuição dos indivíduos pelo *assignment test*. O método consiste na determinação da verossimilhança de cada um dos genótipos multilocus de um indivíduo em cada população, assumindo que o indivíduo pertence a determinado grupo gênico. A probabilidade é calculada de acordo com frequências alélicas estimadas de cada grupo, assumindo que todos os locos são independentes. Cada indivíduo é atribuído a um grupo para o qual o logaritmo da probabilidade de sua frequência genotípica esperada é maior (Paetkau *et al.*, 1997). Os genótipos dos indivíduos de *A. vinacea* foram inseridos no programa e agrupados de acordo com o agrupamento dos indivíduos amostrados pelo programa Structure 2.3.4 (Prichard *et al.*, 2000).

Estatísticas-F, implementadas por Wright (1943), foram utilizadas para quantificar a diferenciação genética entre populações utilizando os coeficientes de endocruzamento para dividir a variância genética dentro e entre populações (Holsinger & Wier, 2009). A

diferenciação entre os grupos de indivíduos foi avaliada pela estimativa dos índices de fixação  $F_{ST}$  (para os dados de SSRs e DNA mitocondrial) e  $R_{ST}$  (somente para os dados de SSRs). A estatística  $F$  foi avaliada através do programa Arlequin, com 1.000 permutações a fim de acessar a significância do valor de  $p$  para eles associados. Para os cálculos dos índices  $F_{ST}$ , foi utilizado o modelo IAM e para o índice  $R_{ST}$  foi assumido o modelo SMM:

1. *Infinite allele model* (IAM, Kimura & Crow, 1964): assume que cada mutação gera um alelo que não existe na população, pela perda ou ganho de qualquer número de unidades de repetição, assumindo que alelos idênticos partilhem a mesma ascendência. Neste modelo, maior proximidade de tamanho entre dois alelos não significa maior proximidade evolutiva.
2. *Stepwise mutation model* (SMM, Kimura & Ohta, 1978): assume que cada mutação gera um alelo, pela perda ou ganho de uma única unidade de repetição, podendo dar origem a alelos já existentes na população, considerando também a possibilidade de eventuais fenômenos de homoplasia. Neste modelo, admite-se que alelos de tamanhos muito diferentes estão menos relacionados do que os que tem tamanhos mais próximos.

A diversidade genética dentro e entre grupos foi verificada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), classe de medidas semelhante à estatística- $F$  que utiliza as frequências haplotípicas para testar a significância dos componentes da variância molecular associada com diferentes níveis hierárquicos (entre populações, entre as populações dentro de um grupo e entre grupos), por um procedimento permutacional não paramétrico, e que requer uma hipótese *a priori* de agrupamento entre diferentes grupos amostrais, realizada no programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

A rede de haplótipos foi construída empregando-se as sequências da região controle do DNA mitocondrial de todos os indivíduos analisados de *A. vinacea*. A rede de haplótipos foi elaborada para observar a existência de haplótipos compartilhados ou haplótipos característicos em cada grupo amostral e conseguir observar a existência de estruturação populacional. A construção dessa rede foi realizada utilizando o método de *median-joining* com posterior análise de máxima parcimônia utilizando o programa PopART (<http://popart.otago.ac.nz/index.shtml>) (Bandelt *et al.*, 1999).

#### **3.8.4 Inferência Demográfica**

O programa BOTTLENECK v1.2.02 (Piry *et al.*, 1999) foi utilizado para testar se há sinal de existência de gargalo populacional (*bottleneck*), utilizado somente para os dados de SSRs, através do método de excesso de heterozigotos (Cornuet e Luikart, 1996). O teste parte do princípio de que, após uma severa redução no tamanho efetivo populacional, o número de alelos é reduzido mais rápido do que a heterozigosidade esperada pelas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos polimórficos.

Três testes estatísticos estão disponíveis para avaliar a significância das comparações entre as heterozigosidades: *sign test* que apresenta pouco poder estatístico, pois considera somente o número esperado de locos que desviam significativamente dos valores de heterozigosidades esperadas no equilíbrio; *standardized differences test* que tem mais poder estatístico quando são analisados pelo menos 20 locos polimórficos e considera qual a probabilidade de desvio do equilíbrio mutação-deriva se todos os locos estiverem evoluindo de acordo com modelo de mutação específico e *Wilcoxon sign-rank test* que tem maior poder estatístico quando utilizados menos de 20 locos e número reduzido de amostras (Luikart *et al.*, 1997). O programa também permite assumir diferentes modelos de mutação, como o de alelos

infinitos (IAM), de mutação a passo-a-passo (SMM) e de duas fases (TPM) (Estoup *et al.*, 2002). No presente trabalho, foi utilizado o teste estatístico *Wilcoxon sign-rank* assumindo os três modelos de mutação.

Além da neutralidade do marcador utilizado, o teste *D* de Tajima (Tajima, 1989) e o teste de *F<sub>s</sub>* de Fu (Fu, 1997) foram utilizados para examinar se as amostras dos diferentes grupos se apresentam em equilíbrio. Tais testes são importantes considerando que um desvio significativo no equilíbrio genético do DNA mitocondrial é sinal de expansão ou redução do tamanho populacional recente nas situações onde nenhuma vantagem seletiva entre haplótipos existe. O teste *D* de Tajima compara o número de sítios segregantes com a diversidade nucleotídica - valores negativos são interpretados como indicativo de populações que experimentaram mudanças de tamanho (Tajima, 1989).

O teste *F<sub>s</sub>* de Fu quantifica a polaridade da mutação e faz uma estimativa de  $\theta$  (parâmetro populacional) baseado no número de mutações únicas. Valores de *F<sub>s</sub>* significativos e negativos são gerados pelo excesso de mutações, o que caracteriza um sinal de expansão populacional (Fu, 1997). Ambos os testes foram realizados utilizando o programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Os testes *D\** e *F\** de Fu & Li (Fu & Li, 1993) foram calculados para inferir causas de eventual desvio de neutralidade, uma vez que esses testes são mais sensíveis a desvios decorrentes de seleção e não dos sinais de expansão populacional. Ambos foram realizados através do programa DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

A mudança na demografia histórica de cada região foi investigada também comparando o perfil das distribuições das diferenças par-a-par de indivíduos (*mismatch distribution*) de cada grupo amostral e da espécie como um todo com o esperado para populações estáveis e em expansão ou redução. A análise foi realizada no programa DNAsp 5.0 (Librado, & Rozas,

2009). Para amostragem de populações que estão em equilíbrio demográfico (estáveis), a distribuição das diferenças é geralmente multimodal. Já as populações que tem passado por recente expansão ou redução possuem tipicamente distribuição das diferenças unimodal (Harpending, 1994).

### **3.8.5 Análises de Parentesco**

Com o objetivo de analisar o potencial dos marcadores SSRs para estimativas de parentesco, a probabilidade de não exclusão dos candidatos pais e o nível de parentesco entre estes foram avaliados. A probabilidade média de não exclusão de paternidade para um candidato pai (NE-1P) e a probabilidade de não exclusão para o segundo pai (NE-2P) foram estimadas utilizando o programa Cervus v3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007).

Estimativas de parentesco genético podem ser calculadas com base nos padrões de identidade-por-descendência (IBD – *Identity by Descent*), onde dois alelos são idênticos quando descendem recentemente de um mesmo alelo ancestral (Queller & Goodnight, 1989). A caracterização do grau de parentesco genético entre dois indivíduos baseia-se, então, na probabilidade de que seus os alelos sejam IBD, fator também chamado de “coeficiente de coancestralidade” (Weir *et al.*, 2006).

O parentesco entre dois indivíduos pode ser calculado por meio de duas categorias de estimadores: (i) métodos de momentos (*methods-of-moments, MM*), os quais são utilizados para calcular valores de similaridade genética em termos de probabilidade de identidade-por-descendência (Ritland, 1996; Queller & Goodnight, 1989; Lynch & Ritland, 1999) e (ii) método de máxima verossimilhança, o qual determina, a partir dos genótipos, a probabilidade de relacionamento entre dois indivíduos (como pai e filho, irmãos completos, meio irmãos ou primos).

O programa COANCESTRY 1.0.1.2 (Wang, 2011) foi utilizado no presente trabalho para gerar diferentes estimativas de relacionamentos. Esse programa utiliza sete estimadores disponíveis na literatura para estimar o valor de parentesco entre dois indivíduos a partir de marcadores codominantes. Cinco estimadores são de momento (Queller & Goodnight, 1989; Ritland, 1996; Lynch & Ritland 1999; Wang, 2002) e dois de máxima verossimilhança (Milligan, 2003; Wang, 2002). A matriz de dados contendo os diferentes genótipos dos sete locos utilizados no presente estudo e suas frequências alélicas geradas foram utilizadas para inferir valor de coeficiente de parentesco “ $r$ ” para cada par de indivíduos.

Adicionalmente, o programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006) foi utilizado para inferir as relações de parentesco entre dois indivíduos, por meio da abordagem de máxima verossimilhança. Esse programa é útil para discriminar quatro relações de parentesco comuns: não relacionados (*Unrelated* – U), meio irmãos (*Half Sibs* – HS), irmãos completos (*Full Sibs* – FS) e pai e filho (*Parent/Offspring* – PO). As relações entre os indivíduos são representadas matematicamente como a probabilidade de que seus genótipos compartilhem zero, um ou dois alelos idênticos por descendência (Lynch & Walsh, 1998). Os índices obtidos para distinguir entre as categorias de relacionamento foram divididos em três categorias: índices de parentesco baixo ( $< 0,25$ ), intermediário (entre 0,25 e 0,50) e alto ( $> 0,5$ ) (Russello *et al.* 2004). A classificação final do provável relacionamento foi inferida quando o coeficiente de parentesco “ $r$ ” e a categoria de relacionamento encontrados para cada par de indivíduos foram coincidentes.

O programa COLONY v2.0.5.5 (Wang & Santure, 2009) foi utilizado para determinar as relações entre pais e filhos de um indivíduo nascido na natureza (v42) e de uma família com *pedigree* conhecido (pai e mãe: v23mg e v24mg; filhos: v1mg, v2mg, v4mg e v5mg). Esse

programa utiliza uma abordagem de verossimilhança para inferir as categorias de relacionamento. As relações putativas testadas foram compostas por todos os pares de indivíduos que obtiveram altos valores estimados no programa Coancestry. As frequências alélicas foram recalculadas após o ajuste para pais e filhos biologicamente viáveis que foram consistentemente identificados ao longo de uma série de suposições dos parâmetros dos programas Coancestry e ML-Relate. As relações foram então fixadas nos parâmetros de entrada para o Colony, e as frequências alélicas ajustadas foram usadas para calcular a probabilidade da relação. Dessa forma, informações combinadas da abordagem Coancestry, ML-Relate e Colony foram utilizadas para determinar o relacionamento entre pais e filhos para os indivíduos citados acima.

## **4 RESULTADOS**

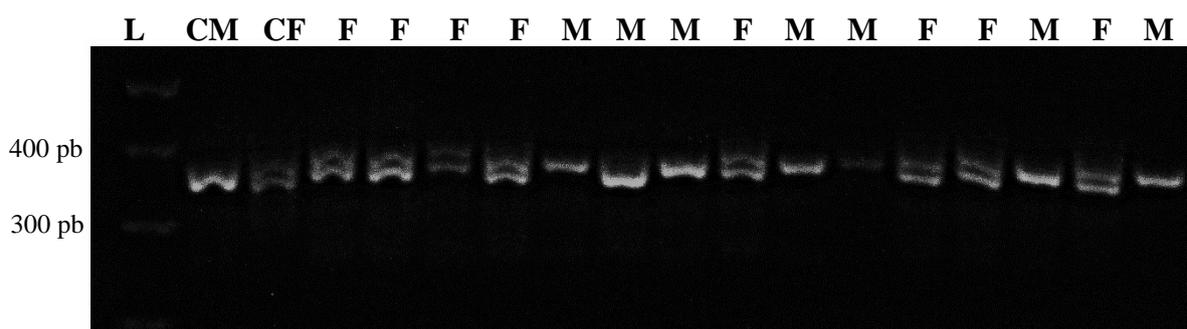
### **4.1 Isolamento de DNA**

Embora invasivas, as coletas de sangue dos exemplares de *A. vinacea* implicaram somente em um pequeno período de estresse aos animais, dado que foi necessário realizar a contenção e a manipulação destes. As amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue apresentaram valores de 1,8 a 2,2 em comparações de absorvância a 260/280nm. Grande parte das amostras obtidas foram amplificadas com sucesso via PCR, evidenciando tanto quantidade como qualidade suficientes de DNA para as análises de sexagem molecular e amplificação de locos microsatélites e de segmentos de DNA mitocondrial.

### **4.2 Sexagem molecular**

Através da sexagem molecular, foi possível identificar o sexo de 160 indivíduos de *A. vinacea*. O resultado indicou um total de 78 machos e 82 fêmeas (Anexo 1). Dois fragmentos

de DNA de tamanhos distintos foram evidenciados para fêmeas (associados aos genes *CHDI-W* e *CHDI-Z*) e um único fragmento de DNA foi evidenciado para os machos (associado ao gene *CHDI-Z*). A Figura 3 exemplifica os resultados da identificação do sexo dos animais por meio da visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 2%.



**Figura 3.** Visualização da amplificação dos genes *CHDI-Z* e *CHDI-W* em indivíduos de *Amazona vinacea* em gel de agarose. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHDI-Z* e *CHDI-W* em indivíduos de *Amazona vinacea*, visualizados em gel de agarose 2%. L – ladder (1 Kb Plus), marcador de tamanho molecular conhecido, CM – controle positivo macho, CF – controle positivo fêmea, F – fêmea e M – macho.

#### 4.3 Caracterização dos locos de microssatélites e identificação de erros de genotipagem

Genótipos de 160 espécimes de *A. vinacea* provenientes dos grupos amostrais Soltura Sul, CETAS, Cativeiro e Minas Gerais foram analisados. Dentre os dez *primers* de SSRs utilizados, três evidenciaram locos monomórficos e não foram utilizados nas análises (AgGT04, AgGT22 e AgGT72). Sete SSRs se mostraram adequados para identificação de polimorfismos (AgGT07, AgGT12, AgGT21, AgGT29, AgGT81, AgGT83 e AgGT90), evidenciando de cinco (AgGT07) a 18 alelos (AgGT21 e AgGT83) (Tabela 3), com média de 11,2 alelos por loco. No grupo amostral Soltura Sul, foi identificado um alelo privado associado ao loco AgGT83.

A heterozigosidade observada por loco variou de 0,417 (AgGT29) a 0,948 (AgGT29), com média de 0,755 entre todos os locos. A heterozigosidade esperada por loco variou de 0,615 (AgGT07) a 0,920 (AgGT21), com média entre todos os locos de 0,795 (Tabela 3).

A média geral de todos os locos em todos os grupos amostrados foi de  $FIS = 0,45$  com  $P < 0,008$  (Tabela 4). A diversidade genética total de  $FIT$  variou de -0,008 (AgGT07) a 0,159 (AgGT81). O índice de diferenciação genética  $F_{ST}$  entre amostras de *A. vinacea* para todos os locos foi significativo, com média de  $F_{ST} = 0,03$ , sugerindo baixa diferenciação entre os grupos amostrados (Tabela 4).

A hipótese nula ( $H_0$ ) de Equilíbrio de Hardy Weinberg foi aceita para a maioria das estimativas, com valores significantes de  $P < 0,001$  após a correção de Bonferroni. Entretanto, foi verificada significância de desvio para os locos AgGT83 e AgGT81 para os grupos amostrais Soltura Sul e Cativoiro. Os sete locos de SSRs analisados não apresentaram evidência de desequilíbrio de ligação ( $p > 0,05$ ) podendo, então, ser considerados como marcadores independentes. Não foram evidenciadas presenças de bandas fantasmas “*stutter band*”, alelos nulos ou presença de alelos “*dropout*”.

O valor de PIC variou de 0,655 a 0,909, sendo o valor mais elevado associado com o loco AgGT90. De acordo com os valores do conteúdo da informação polimórfica ( $PIC > 0,5$ ), os sete locos analisados foram considerados informativos, com valor médio de 0,808 (Tabela 5). Os resultados do tamanho efetivo populacional encontram-se descritos na Tabela 6.

**Tabela 3.** Análise de variabilidade por loco para indivíduos de *Amazona vinacea* de cada grupo amostral. Número de alelos (A), heterozigosidades observadas (H<sub>O</sub>) e esperada (H<sub>E</sub>) por loco para indivíduos de *Amazona vinacea* de cada grupo amostral. Entre parênteses estão os números de indivíduos.

Grupo Amostral	Loco							Média
	AgGT07	AgGT12	AgGT21	AgGT29	AgGT81	AgGT83	AgGT90	
<b>Soltura Sul (n=63)</b>								
A	8	12	18	15	11	18	8	12,85
H <sub>O</sub>	0,661	0,845	0,909	0,948	0,672	0,828	0,645	0,669
H <sub>E</sub>	0,661	0,841	0,909	0,878	0,790	0,897	0,644	0,802
<b>Zoológico (n=31)</b>								
A	8	11	17	13	10	15	8	11,71
H <sub>O</sub>	0,767	0,760	0,926	0,900	0,741	0,760	0,800	0,807
H <sub>E</sub>	0,742	0,811	0,920	0,814	0,818	0,910	0,726	0,820
<b>CETAS (n=42)</b>								
A	8	10	15	13	11	16	8	11,57
H <sub>O</sub>	0,775	0,889	0,829	0,921	0,707	0,738	0,762	0,803
H <sub>E</sub>	0,777	0,782	0,902	0,881	0,860	0,883	0,726	0,830
<b>Minas Gerais (n=24)</b>								
A	5	8	7	11	7	15	7	8,57
H <sub>O</sub>	0,667	0,591	0,600	0,417	0,625	0,818	0,667	0,626
H <sub>E</sub>	0,615	0,736	0,738	0,757	0,724	0,907	0,630	0,729
<b>Total de Alelos</b>	8	12	18	15	12	18	8	13
<b>Média</b>								
A	7,25	10,25	14,25	13	9,75	16	7,75	<b>11,2</b>
H <sub>O</sub>	0,717	0,771	0,816	0,796	0,686	0,786	0,718	<b>0,755</b>
H <sub>E</sub>	0,698	0,792	0,867	0,832	0,798	0,899	0,681	<b>0,795</b>

**Tabela 4.** Índices de fixação  $FIS$ ,  $FIT$  e  $F_{ST}$  baseados em locos microssatélites de *Amazona vinacea*.

	$FIS$	$FIT$	$F_{ST}$
<b>AgGT07</b>	-0,027	-0,008	0,018
<b>AgGT12</b>	0,027	0,087	0,062
<b>AgGT21</b>	0,059	0,103	0,047
<b>AgGT29</b>	0,043	0,061	0,019
<b>AgGT81</b>	0,140	0,159	0,022
<b>AgGT83</b>	0,126	0,143	0,019
<b>AgGT90</b>	-0,054	-0,031	0,021
<b>Média</b>	0,045	0,073	0,030

**Tabela 5.** Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) dos sete locos microssatélites para amostragens de *Amazona vinacea*.

	<b>PIC</b>
<b>AgGT07</b>	0.683
<b>AgGT12</b>	0.847
<b>AgGT21</b>	0.909
<b>AgGT29</b>	0.850
<b>AgGT81</b>	0.808
<b>AgGT83</b>	0.908
<b>AgGT90</b>	0.655
<b>Média</b>	0.808

**Tabela 6.** Tamanho efetivo populacional em diferentes grupos amostrais de *Amazona vinacea*.

<b>Grupo amostral</b>	$N$	$Ne$
Soltura Sul	63	54,4
Zoológico	31	24
CETAS	42	38,1
Minas Gerais	24	20,3

$N$  – número de indivíduos;  $Ne$  – tamanho efetivo populacional usando a menor frequência alélica de 0,01.

#### 4.4 Sequência da região controle do DNA mitocondrial

Produtos de PCR com 558 pares de bases, associados à região controle do DNA mitocondrial, foram obtidos a partir de amostras de DNA de 103 indivíduos de *A. vinacea*. As sequências obtidas foram alinhadas e a sequência consenso gerada foi utilizada em buscas por homologia no BLAST (Altschul *et al.* 1990), para verificar sua identidade com outras sequências homólogas referentes à região controle do DNAmt. Uma alta identidade pôde ser verificada entre distintas espécies do mesmo gênero, como detectado para *Amazona ochrocephala auropalliata* em que foi observada identidade de 90,19% com *e-value* igual a 0.

A análise, dessas sequências nucleotídicas, permitiu determinar um total de 3 haplótipos gerados a partir de 5 sítios polimórficos, correspondendo a 4 transições e uma transversão (Tabela 7). A porcentagem de bases nitrogenadas encontrada foi de: 23,43% de citosina, 30,61% de timina, 27,71% de adenina e 18,25% de guanina. A partir da matriz das sequências geradas, foram obtidos os números de sítios polimórficos e de haplótipos, os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica para a espécie como um todo e para cada grupo amostral (Tabela 8).

**Tabela 7.** Sítios variáveis da região controle do DNA miticondrial. Sítios variáveis em 558 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial e número de indivíduos de *Amazona vinacea* por grupo amostral que possuem os haplótipos encontrados.

Haplótipo	Sítios polimórficos (1 – 558)					Grupos Amostrais				Total
	268	290	295	308	332	Sul	CETAS	Zoológico	Minas Gerais	
H1	T	C	G	C	C	19	3	9	2	33
H2	C	A	A	T	T	18	13	17	6	54
H3	T	A	G	T	T	9	2	5	0	16

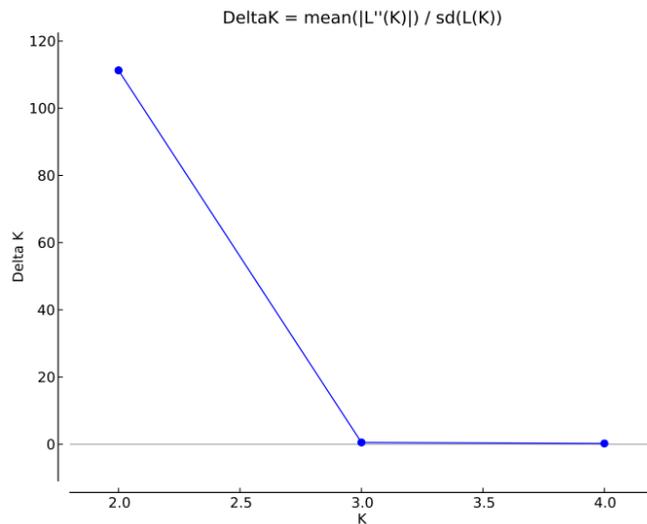
**Tabela 8.** Valores de índices de diversidade genética. Valores de índices de diversidade genética associados à sequência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial de 103 indivíduos de *Amazona vinacea*.

<b>Grupo Amostral</b>	<b>P</b>	<b>H</b>	<b>h +/- s.d.</b>	<b><math>\pi</math> +/- s.d.</b>
Soltura Sul (46)	5	3	0,6522 +/- 0,0283	0,003771+/-0,002379
CETAS (17)	5	3	0,4853 +/- 0,1260	0,003163 +/- 0,002156
Zoológico (32)	5	3	0,5988 +/- 0,0620	0,003707 +/- 0,002370
Minas Gerais (8)	3	2	0,4286 +/- 0,1687	0,002304 +/- 0,001830
Total (103)	5	3	0,6042 +/- 0,0282	0,003658 +/- 0,002294

Número de sítios polimórficos (P), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), assim como os respectivos desvios padrão (s.d.). Em parênteses estão os números de espécimes de *Amazona vinacea* analisados.

#### 4.5 Diferenciação genética

O maior valor de verossimilhança para estimativa de grupos gênicos pela análise Bayesiana, sem a utilização das informações de agrupamentos *a priori* (LOCPRIOR), resultou em um número mais provável de grupos igual a dois ( $K = 2$ ) (Figura 4), de acordo com o maior valor de  $\Delta K$ . A distribuição da variabilidade genética pode ser observada na Figura 5.



**Figura 4.** Gráfico representativo da estimativa de grupos gênicos. Valor de  $\Delta K$  em função de K. Gráfico gerado pelo programa Structure Harvester, mostrando K = 2 como número mais provável pelo log da probabilidade de grupos para os exemplares de *Amazona vinacea* obtido da análise dos microssatélites.



**Figura 5.** Estimativa de estrutura populacional em *Amazona vinacea* com base em inferências de *memberships* proporcionais (K=2). Cada barra vertical representa um indivíduo e cada cor representa um único grupo gênico.

Através do *assignment test*, os indivíduos foram atribuídos como pertencentes ao grupo 1 ou grupo 2, conforme maior probabilidade de suas frequências gênicas pertencerem a um determinado grupo. A porcentagem de atribuição por grupo amostral pode ser visualizada na Tabela 9.

**Tabela 9.** Atribuição dos grupos através do *assignment test*. Probabilidade de indivíduos de *Amazona vinacea* serem atribuídos ao Grupo 1 ou Grupo 2 a partir da distribuição de suas frequências alélicas.

Grupo Amostral	Atribuição Grupo 1	Atribuição Grupo 2
Soltura Sul (63)	42,85%	57,14%
Zoológico (31)	41,94%	58,06%
CETAS (42)	28,57%	71,43%
Minas Gerais (24)	91,67%	8,33%

Os índices de fixação  $F_{ST}$  par-a-par baseados nos sete locos de SSRs, os quais foram obtidos considerando os quatro grupos amostrados (Soltura Sul, Zoológico, CETAS e Minas Gerais), evidenciaram valores baixos variando de -0,00085 (CETAS com Minas Gerais) a 0,01986 (Zoológico com Minas Gerais) (Tabela 10). Os índices de fixação  $R_{ST}$  variaram de -0,01729 (CETAS com Minas Gerais) a 0,07353 (Zoológico com Minas Gerais) (Tabela 10). Os índices  $F_{ST}$  par-a-par baseados nas sequências da região controle do DNA mitocondrial variaram de -0,07667 (Soltura Sul com CETAS) a 0,13688 (Soltura Sul com Minas Gerais) (Tabela 11).

**Tabela 10.** Índices de fixação  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  a partir da análise de microssatélites. Valores de índice de fixação  $F_{ST}$  (abaixo da diagonal) e  $R_{ST}$  (acima da diagonal) calculados na comparação par-a-par dos diferentes grupos amostrais de *Amazona vinacea* a partir da análise de microssatélites. Em negrito estão os valores com significância estatística ( $p < 0.05$ ).

Grupo Amostral	Soltura Sul	Zoológico	CETAS	Minas Gerais
Soltura Sul	-	0,02651	0,00307	0,01388
Zoológico	- 0,00068	-	<b>0,06648</b>	<b>0,07353</b>
CETAS	<b>0,01413</b>	0,00767	-	- 0,01729
Minas Gerais	<b>0,01209</b>	<b>0,01986</b>	- 0,00085	-

**Tabela 11.** Índices de fixação  $F_{ST}$  a partir da análise da região controle do DNA mitocondrial. Valores de índices de  $F_{ST}$  calculados na comparação par-a-par dos diferentes grupos amostrais de *Amazona vinacea* a partir de 558 pb da região controle do DNA mitocondrial. Em negrito estão os valores com significância estatística ( $p < 0.05$ ).

Grupo Amostral	Soltura Sul	Zoológico	CETAS	Minas Gerais
Soltura Sul	-			
Zoológico	0,01678	-		
CETAS	<b>0,10159</b>	-0,01228	-	
Minas Gerais	0,13688	0,10159	-0,07667	-

A análise de variância molecular (AMOVA) foi inicialmente calculada considerando todos os indivíduos de todos os grupos amostrais a partir dos genótipos dos SSRs e das sequências da região controle do DNA mitocondrial. Nesse tipo de análise, foi possível observar que 99,08% da variância total ocorreu dentro do grupo amostral e a variância entre os grupos foi de apenas 0,92%, com índice de fixação global calculado de  $\Phi_{ST} = 0,00921$  significativo ( $p < 0.05$ ) (Tabela 12). Quando utilizado o índice  $R_{ST}$ , a variação total dentro do grupo amostral foi de 98,07 % e a variância entre os grupos foi de 1,93%, com índice de fixação global calculado de  $\Phi_{ST} = 0,01934$  (Tabela 12). Entretanto, esse valor não foi significativo ( $p > 0.05$ ). Para dados da região controle do DNA mitocondrial, foi observado que 95% da variação genética total ocorre dentro do grupo amostral e 4,33% da variação ocorre entre os grupos, com índice de fixação global  $\Phi_{ST} = 0,0433$ , entretanto esse valor não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Valor de  $\Phi_{ST}$ , calculado pela AMOVA, considerando todos os indivíduos de *Amazona vinacea* dos quatro grupos amostrais em um único agrupamento, levando em consideração um valor com significância estatística  $p < 0.05$ .

	Componentes da variância	Porcentagem da variância
<b>Microssatélites <math>F_{ST}</math></b>		
Entre grupos	0,00950	0,92%
Dentro dos grupos	1,02187	99,08%
Total	1,03137	
Índice de Fixação	<b>0,00921</b>	
<b>Microssatélites <math>R_{ST}</math></b>		
Entre grupos	2,62580	1,93%
Dentro dos grupos	133,1486	98,07%
Total	135,77443	
Índice de Fixação	0,01934	
<b>DNAmT <math>F_{ST}</math></b>		
Entre grupos	0,04485	4,33%
Dentro dos grupos	0,99018	95,67%
Total	1,03503	
Índice de Fixação	0,04333	

Além disso, a AMOVA também foi realizada considerando os indivíduos dos quatro grupos amostrais dentro de três grupos (Soltura Sul + Minas Gerais, Zoológico e CETAS), onde foram reveladas as proporções de diferenciação dentro de cada grupo, entre população dentro do grupo e entre populações. Nesse caso, Soltura Sul e Minas Gerais foram considerados como um único grupo uma vez que os dois grupos amostrais foram reintroduzidos no Parque das Araucárias. Assim, quando indivíduos de *A. vinacea* provenientes da Soltura Sul e Minas Gerais foram agrupados e comparadas com indivíduos de Zoológico e CETAS, o valor de variação entre os grupos foi de 1,27%. Entre as populações dentro de um grupo, a variação foi de -0,14%

e a variação dentro dos grupos foi de 98,87%, com  $\Phi_{ST} = 0,01128$  significativo ( $p < 0.05$ ) (Tabela 13).

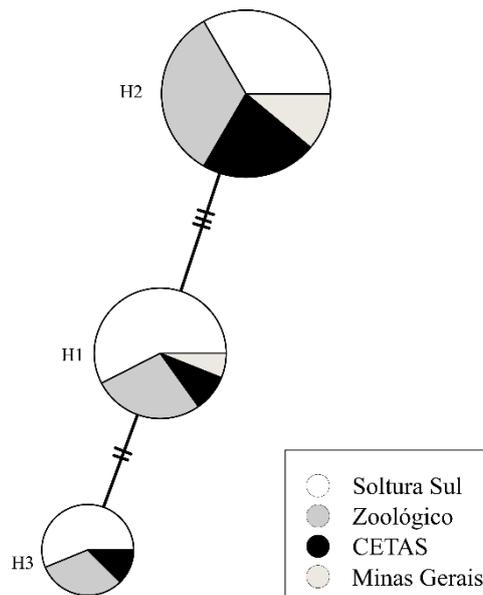
Quando utilizado o índice  $R_{ST}$ , o valor de variação entre os grupos foi de -0,23%, entre populações dentro dos grupos foi de 2,13% e a variação dentro das populações foi de 98,10%, com  $\Phi_{ST} = 0,01897$  significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13). Dados da região controle do DNA mitocondrial indicaram que -0,12% da variação genética se encontra dentro dos grupos, enquanto 15,52% da variação ocorre entre populações dentro de um grupo e 96,90% da variação ocorre dentro das populações, com  $\Phi_{ST} = 0,03104$ . Entretanto, esse valor não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Resultado da AMOVA para três grupos de *Amazona vinacea* (Soltura Sul + Minas Gerais, Zoológico e CETAS), valores atribuídos à diferenciação dentro de cada população ( $\Phi_{SC}$ ), de toda a população ( $\Phi_{ST}$ ) e entre as populações ( $\Phi_{CT}$ ). Em negrito, resultados com significância estatística  $p < 0.05$ .

	Varição da variabilidade	Porcentagem da variabilidade	$\Phi_{SC}$	$\Phi_{ST}$	$\Phi_{CT}$
<b>Microssatélites <math>F_{ST}</math></b>					
Entre grupos	0,013	1,27%	-	-	0,01266
Entre populações dentro de um grupo	-0,00143	- 0,14%	-	<b>0,01128</b>	-
Dentro das populações	1,02187	98,87%	-0,00140	-	-
<b>Microssatélites <math>R_{ST}</math></b>					
Entre grupos	0,31080	-0,23%	-	-	-0,00229
Entre populações dentro de um grupo	2,88532	2,13%	-	<b>0,01897</b>	-
Dentro das populações	133,14863	98,10%	0,02121	-	-
<b>DNAmt <math>F_{ST}</math></b>					
Entre grupos	-0,12690	-12,42%	-	-	-0,12418
Entre populações dentro de um grupo	0,15862	15,52%	-	0,03104	-
Dentro das populações	0,99018	96,90%	0,13808	-	-

Dentre os haplótipos encontrados a partir das sequências da região controle do DNA mitocondrial, o mais frequente (H2) é compartilhado por 54 indivíduos, representando 52,4%

dos exemplares analisados. Em frequência menor foi evidenciado o haplótipo (H1), representando 32% dos espécimes analisados. Os haplótipos H1 e H2 são compartilhados entre todos os grupos amostrais. O haplótipo H3 foi o menos frequente e se apresentou em 15,3% dos indivíduos, o qual foi compartilhado entre os grupos Soltura Sul, Zoológico e CETAS (Figura 6).



**Figura 6.** Rede de haplótipos de um fragmento de 558 pb da região controle do DNA mitocondrial, em exemplares de *Amazona vinacea* de quatro grupos amostrais. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo. Cada grupo amostral é representado com uma cor distinta e estão proporcionalmente mostrados dentro dos círculos. As linhas entre os haplótipos indicam diferença de 1 par de bases (1 passo mutacional).

#### 4.6 Inferências Demográficas

Análises de *bottleneck* indicaram excesso de heteroziguidade sob o modelo IAM e TPM. Apenas para o modelo SMM não foi observado excesso de heteroziguidade nos grupos estudados (Tabela 14).

Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima,  $D^*$  e  $F^*$  das sequências da região controle do DNA mitocondrial para todos os indivíduos não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Os testes também não foram significativos para os grupos amostrais Soltura Sul, Zoológico, CETAS e Minas Gerais separadamente (Tabela 15). A diferença nucleotídica aos pares (*mismatch distribution*) foi realizada para cada grupo amostral e para a espécie como um todo. A curva de distribuição, obtida nessa análise, mostrou-se bimodal o que indica um padrão de população estável (Figura 7).

**Tabela 14.** Classificação do teste de *Wilcoxon signed-rank* do equilíbrio de mutação e deriva estimado para sete locos de microssatélites para cada grupo amostrado de *Amazona vinacea* e para a espécie como um todo.

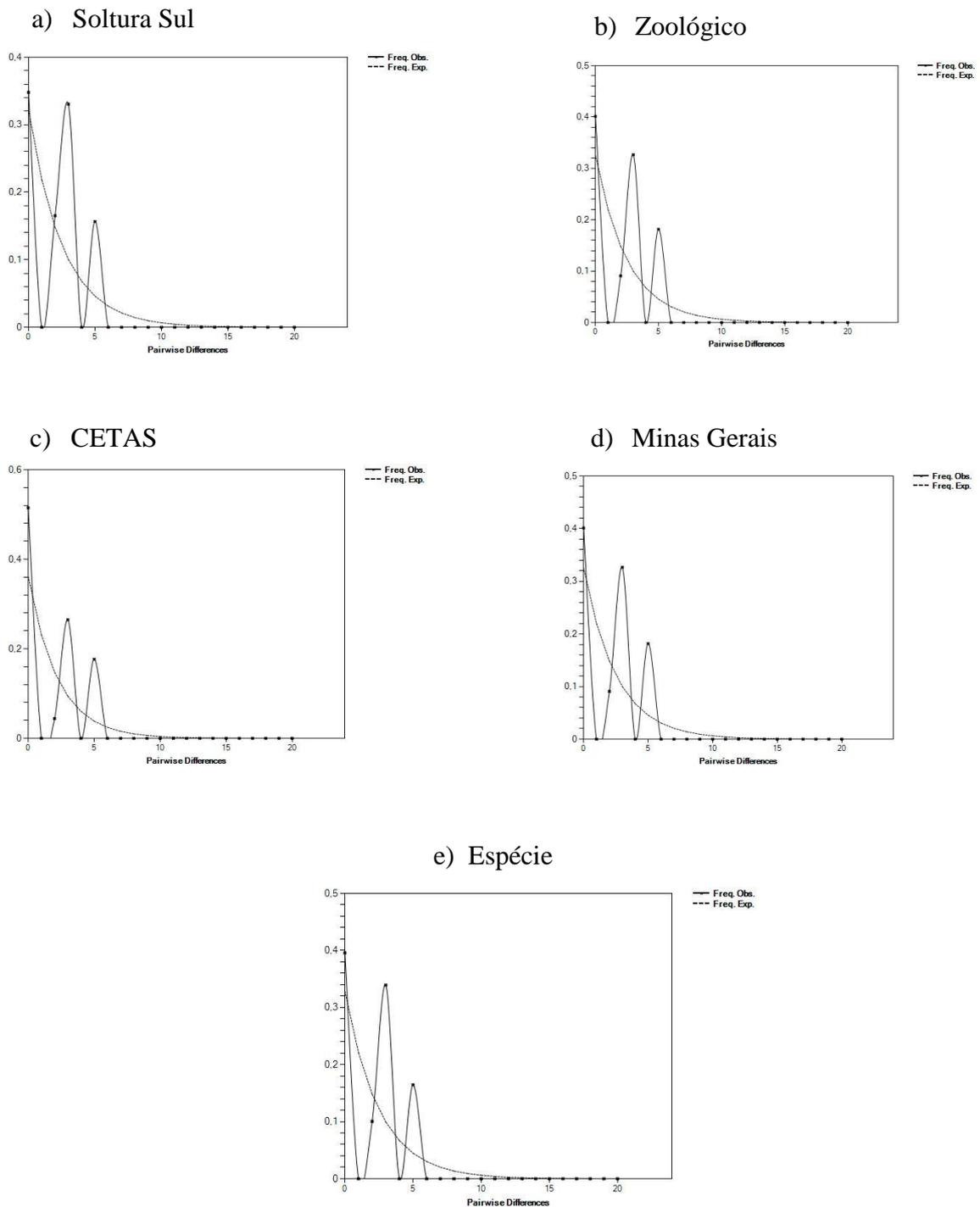
Grupo Amostral	Teste de <i>Wilcoxon signed-rank</i>			<i>Mode shift</i>
	IAM	TPM	SMM	
Soltura Sul	<b>0,00781</b>	0,53125	1,00000	Sim
Zoológico	<b>0,00781</b>	0,59375	0,98828	Sim
CETAS	<b>0,00391</b>	<b>0,03906</b>	0,94531	Sim
Minas Gerais	0,34375	0,97266	0,99609	Sim
Espécie	<b>0,00391</b>	<b>0,00781</b>	0,98047	Sim

Modelo de alelos infinitos (IAM), modelo de duas fases (TPM) e modelo de mutação passo a passo (SMM). Os valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) estão em negrito. Sim: distribuição normal em forma de L.

**Tabela 15.** Índices de neutralidade D de Tajima ( $D_T$ ),  $F_s$  de  $F_u$  ( $F_s$ ),  $D^*$  e  $F^*$  para cada grupo amostrado de *Amazona vinacea* e para a espécie como um todo e os níveis de significância (p). Todos os valores de p não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ).

Grupo Amostral	$D_T$	p ( $D_T$ )	$F_s$	p ( $F_s$ )	$D^*$	p ( $D^*$ )	$F^*$	p ( $F^*$ )
Soltura Sul	2,09606	0,98200	4,95606	0,95700	1,10424	n.a	1,64958	n.a
Zoológico	1,78777	0,96900	4,19749	0,95900	1,13769	n.a	1,54940	n.a
CETAS	0,62339	0,76100	2,53382	0,88900	1,20628	n.a	1,20313	n.a
Minas Gerais	0,45766	0,71800	2,46884	0,87300	1,23376	n.a	1,15600	n.a
Espécie	2,38511	0,98500	6,28357	0,97800	1,03428	n.a	1,74186	n.a

n.a: valor de p não apresentado especificamente



**Figura 7.** Gráfico de distribuição das diferenças nucleotídicas aos pares (*mismatch distribution*) para haplótipos encontrados em amostras de *Amazona vinacea* para a espécie como um todo. A distribuição esperada de diferenças par-a-par, de acordo com o modelo de expansão populacional de linha súbita é mostrada em linha contínua e a distância observada pela linha pontilhada.

#### 4.7 Análise de Parentesco

Os SSRs empregados apresentaram valores não combinados de não exclusão de um primeiro candidato pai (NE-1P) e segundo candidato pai (NE-2P) de  $3,8 \times 10^{-3}$  e  $1,92 \times 10^{-4}$ , respectivamente.

Dos sete estimadores de parentesco utilizados no programa Coancestry (Wang, 2011), os estimadores LynchRd (estimador de momento) e TrioML (estimador de verossimilhança) apresentaram menor variância média (Tabela 16) e, dessa forma, mostram-se os ideais para o conjunto amostral estudado. O valor do coeficiente de parentesco médio “ $r$ ” baseado no estimador LynchRd foi de -0,0076 e no TrioML foi de 0,09512. Valores negativos associados a estimadores de momento indicam ausência de relacionamento entre indivíduos. Assumindo que  $r$  (TrioML) = 0,5, 0,25, 0,125 e  $< 0,125$  seriam valores esperados entre pais e filhos ou irmãos completos, meio irmãos, primos de primeiro grau, e indivíduos não relacionados, respectivamente, essas médias são próximas ao valor de indivíduos não relacionados.

A partir dos dados de 160 espécimes de *A. vinacea*, foram geradas 12.720 combinações par-a-par entre todos os indivíduos amostrados. Ambos os estimadores de “ $r$ ” associados às categorias de parentesco geradas no programa ML-Relate indicaram que mais de 83% das combinações par-a-par resultaram em indivíduos não relacionados, 13% em meio-irmãos ou primos (parentes de 2º grau), 2,4% irmãos completos e 0,96% em pais e filhos. Os dados de cada grupo amostrado são evidenciados na Tabela 17.

Sob uma perspectiva para formação de possíveis casais para reprodução em cativeiro entre os animais mantidos em zoológicos (grupo amostral Zoológico), foram compilados 204 diferentes combinados par-a-par entre indivíduos não relacionados (U) de *A. vinacea* a partir

dos resultados da sexagem molecular (macho e fêmea), dos diferentes estimadores de parentesco e da categoria de cada relacionamento.

**Tabela 16.** Média e variância de valor de parentesco entre exemplares de *Amazona vinacea* calculadas a partir de sete estimadores.

	<b>TrioML</b>	<b>Wang</b>	<b>LynchLi</b>	<b>LynchRd</b>	<b>Ritland</b>	<b>QuellerGt</b>	<b>DyadML</b>
<b>Média</b>	0,09512	-0,01667	-0,00763	-0,00676	-0,00722	-0,00572	0,10149
<b>Variância</b>	0,01663	0,03313	0,04451	0,01661	0,01906	0,03551	0,01789

**Tabela 17.** Porcentagem das combinações par-a-par relacionada às categorias de parentesco entre os grupos amostrados de *Amazona vinacea*.

<b>Grupo Amostral</b>	<b>FS</b>	<b>HS</b>	<b>PO</b>	<b>U</b>	<b>Total</b>
<b>Soltura Sul</b>	3,07% (60)	11,78% (230)	0,87% (17)	84,3% (1646)	1953
<b>Zoológico</b>	1,72% (8)	9,68% (45)	1,29% (6)	87% (404)	465
<b>CETAS</b>	1,16% (10)	10,7% (92)	0,46% (4)	87,57% (754)	861
<b>Minas Gerais</b>	1,81% (5)	9,78% (27)	5,07% (14)	83,3% (230)	276
<b>Espécie</b>	2,4 % (305)	13,63% (1734)	0,96% (122)	83% (10559)	12720

Com base nos coeficientes dos estimadores de parentesco, na categoria de relacionamento gerada pelo ML-Relate e no teste de paternidade gerado pelo programa Colony, foram inferidos os possíveis pais de um indivíduo (V42) nascido no Parque Nacional das Araucárias. Como grupo controle foram utilizados dados do *studbook* de uma família conhecida (pais e filhos) de *A. vinacea* que estava em criadouro até ser reintroduzida no Parque Nacional das Araucárias. O programa Colony atribuiu com 100% de precisão os filhos que possuíam pais conhecidos (Tabela 18). Embora a probabilidade de que o indivíduo V42 tenha como pais os indivíduos V40 e V9 seja de 90%, esse valor diminui quando outro indivíduo do grupo amostral passa ser a suposta mãe ou o suposto pai (Tabela 19).

**Tabela 18.** Análise dos estimadores de parentesco. Filho, pai ou mãe, estimadores de parentesco LynchRd, TrioML e ML-Relate e categoria de parentesco entre pais e filhos conhecidos e indivíduo (V42) nascido na natureza. PO: parent-offspring

Filhos	Pai/Mãe	LynchRd	TrioML	MI-Relate	Categoria
V42	V40	0,6793	0,3888	0,5417	PO
V42	V9	0,3520	0,2505	0,5165	PO
V1mg	V24mg	0,2223	0,4772	0,5000	PO
V1mg	V23mg	0,7219	0,6336	0,3633	PO
V2mg	V24mg	0,4097	0,5753	0,5000	PO
V2mg	V23mg	0,6366	0,5555	0,3094	PO
V4mg	V24mg	0,8125	0,6926	0,5000	PO
V4mg	V23mg	0,2832	0,4252	0,2861	PO
V5mg	V24mg	0,4934	0,6302	0,5000	PO
V5mg	V23mg	0,4508	0,4791	0,5000	PO

**Tabela 19.** Probabilidade de parentesco. Filho, possível pai, possível mãe e probabilidade do indivíduo ser filho do casal.

Filho	Possível Pai	Possível Mãe	Probabilidade
V42	V40	V9	0,9066
V42	V40	#	0,0593
V42	#	V9	0,0253
V1mg	V24mg	V23mg	1,0000
V2mg	V24mg	V23mg	1,0000
V4mg	V24mg	V23mg	1,0000
V5mg	V24mg	V23mg	1,0000

#: qualquer outro indivíduo ser pai ou mãe

## 5 DISCUSSÃO

À medida que pressões sobre as populações naturais aumentam, também aumenta a importância do manejo genético para conservação de espécies selvagens reintroduzidas e de populações cativas (Haig *et al.*, 2016). Abordar questões relativas à diversidade e estruturação genética, inferências demográficas, relações de parentesco e a provável retenção futura da variação genética, é fundamental para gerar subsídios para realizar o manejo baseado em melhores medidas e ações de conservação. Ainda hoje, poucos estudos que integram dados empíricos sobre variação genética de populações reintroduzidas e cativas foram realizados, os quais combinam dados genéticos atuais com previsões demográficas e genéticas a longo prazo em programas de conservação de espécies ameaçadas (Witzenberger & Hochkirch 2011).

O presente trabalho representa o primeiro estudo onde foi demonstrado como essas questões podem ser abordadas através da aplicação de métodos moleculares a fim de auxiliar uma abordagem integrada à conservação de uma espécie ameaçada de extinção - *Amazona vinacea*.

### 5.1 Isolamento de DNA e Sexagem molecular

O uso de sangue para isolamento de DNA em indivíduos de *Amazona vinacea* representou uma forma não destrutiva de amostragem biológica, fato extremamente pertinente em trabalhos direcionados à conservação, especialmente em espécies consideradas ameaçadas de extinção (Collar *et al.* 1992; IUCN, 2017). Adicionalmente, amostras de sangue de aves geralmente levam à obtenção de DNA de excelente qualidade e quantidade, como descrito para *A. vinacea*, já que os eritrócitos destes animais são nucleados sendo, portanto, uma rica fonte de DNA nuclear.

Na área de conservação biológica, como, por exemplo, no manejo de populações silvestres ou em cativeiro, a correta identificação do sexo dos animais é de grande importância. Em aves Psittaciformes, nem sempre é possível identificar o sexo somente pela observação de caracteres morfológicos e/ou comportamentais e a identificação de machos e fêmeas pode ser difícil até mesmo em espécies que apresentam dimorfismo sexual, já que tais características muitas vezes são sutis ou aparecem somente após o período de maturidade sexual (Pough *et al.*, 1999). Atualmente, a ferramenta molecular mais amplamente aplicada para a sexagem de aves refere-se ao gene *CHDI*. Encontrado no cromossomo Z, o gene *CHDI-Z* ocorre, portanto, em ambos os sexos, enquanto o gene *CHDI-W* localiza-se no cromossomo W, presente somente nas fêmeas (Griffiths *et al.*, 1998).

No presente trabalho, a sexagem molecular, baseada na amplificação de um íntron que difere em tamanho entre os genes *CHDI-Z* e *CHDI-W*, resultou na identificação de um único fragmento de DNA em machos (genótipo homozigoto) e de dois fragmentos distintos em fêmeas (genótipo heterozigoto), como originalmente descrito por Griffiths *et al.*, 1998. Resultados similares têm sido também obtidos para distintas espécies de aves (Miyaki *et al.*, 1998; Anciães & Del Lama, 2002; Faria *et al.*, 2007; Monceau *et al.*, 2013; García-Navas *et al.*, 2015).

A identificação do sexo em aves monomórficas, como *Amazona vinacea*, é fundamental para o sucesso reprodutivo de exemplares da espécie mantidos em cativeiro, pois permite a realização de análises etológicas associadas ao comportamento social e reprodutivo e também a identificação de possíveis pares isossexuais (Grando, 2002; Raso & Werther, 2004; Faria *et al.*, 2007). Tais observações podem nortear programas conservacionistas, como o desenvolvido pela ONG Instituto Espaço Silvestre, por meio do correto pareamento de casais.

## 5.2 Variabilidade Genética

Os SSRs analisados nos indivíduos de *A. vinacea* apresentaram de 8 a 18 alelos, com média da heterozigosidade observada de 0,755. Comparativamente, em *Amazona guildingii*, os mesmos SSRs apresentaram de dois a nove alelos por loco e a média de heterozigosidade observada foi de 0,610 (Russelo, *et al.*, 2001; Russelo *et al.*, 2005). Tal diferença no nível da variabilidade genética também pôde ser observada para outras espécies de psitacídeos. Em *Amazona aestiva*, o número de alelos variou de 5 a 16 e a média de heterozigosidade observada foi de 0,729 (Leite *et al.*, 2008) e, em *Amazona brasiliensis* o número de alelos variou de 5 a 12 e a média de heterozigosidade observada foi de 0,610 (Fernandes, *et al.*, 2015) (Tabela 20).

**Tabela 20.** Comparação dos níveis de diversidade genética entre diferentes espécies de psitacídeos do gênero *Amazona*.

Espécie	N	Ho	Referência
<i>Amazona vinacea</i>	8 a 18	0,755	Presente estudo
<i>Amazona guildingii</i>	2 a 9	0,610	Russelo <i>et al.</i> 2001, 2005
<i>Amazona aestiva</i>	5 a 16	0,729	Leite <i>et al.</i> 2008
<i>Amazona brasiliensis</i>	5 a 12	0,610	Fernandes <i>et al.</i> 2015

Embora, geralmente, o grau de polimorfismo encontrado em SSRs heterólogos seja baixo em psitacídeos (Taylor & Parkin, 2007), os valores de heterozigosidades médias, observadas e esperadas, e o número de alelos por locos mostraram-se elevados. O alto polimorfismo observado pode estar associado ao uso de *primers* desenvolvidos para espécies filogeneticamente próximas. Galbusera *et al.* (2000), ao testarem amplificação heteróloga de SSRs em 13 espécies de passeriformes, concluíram que há uma relação negativa significativa entre a amplificação de SSRs e a distância evolutiva entre as espécies originais e testadas.

A presença de alelos privados foi identificada apenas no grupo amostral Soltura Sul, com somente um alelo privado associado ao marcador AgGT83. Embora alelos privados sejam encontrados em populações distintas entre as quais o fluxo gênico é reduzido ou inexistente, os dados obtidos também podem estar associados à perda de alelos privados, como resultado de um evento gargalo ou alteração no tamanho demográfico populacional. Em todas as estimativas calculadas, os valores de heterozigosidade observada foram menores que o esperado, com resultados de FIS positivos, sugerindo uma pequena deficiência de heterozigotos nos grupos amostrados. A deficiência de heterozigotos pode estar associada ao efeito gargalo ou ao efeito de Wahlund (Selkoe & Toonen, 2006; Meeûs, 2018). Como não sabemos se os indivíduos amostrados pertenciam originalmente a uma mesma população natural ou se eram provenientes de subdivisões populacionais, as deficiências de heterozigotos observadas podem ser devidas às misturas involuntárias de animais de populações separadas que foram encaminhados a diferentes locais após apreensão.

Os valores médios dos índices de diversidade genética inferida a partir de dados **associados ao primeiro domínio da região controle do DNA mitocondrial** ( $h = 0,6042 \pm 0,0282$ ;  $\pi = 0,003658 \pm 0,002294$ ) mostraram-se similares aos obtidos para outra espécie de psitacídeo ameaçado de extinção - *Anodorhynchus hyacinthinus* (Presti, *et al*, 2015; Almeida, *et al.*, 2019). A menor variabilidade genética encontrada na região controle do DNA mitocondrial quando comparada com locos de SSRs pode ser explicadas por duas hipóteses:

- (i) Diferenças na taxa de mutação de cada marcador. Embora a região controle do DNA mitocondrial apresente polimorfismo e seja bastante utilizada em estudos populacionais, essa ainda é mais conservada quando comparada com locos de SSRs (Frankham *et al.*, 2002).

- (ii) Eventos demográficos podem ter levado a uma redução na diversidade genética, avaliada por ambos os marcadores utilizados (Frankham *et al.*, 2002). Entretanto, o tamanho efetivo populacional estimado por meio da análise do DNA mitocondrial (dada sua característica haplóide e herança materna) é menor do que o inferido por meio de marcadores microssatélites e, portanto, uma maior diversidade genética pôde ser identificada nos locos de SSRs.

A modificação no tamanho populacional de *Amazona vinacea* pode estar associada ao endemismo das florestas atlânticas. Como essa formação florestal encontra-se bastante descaracterizada e reduzida, a espécie encontra-se em rápido e contínuo declínio populacional (Abe, 2004). Estima-se que entre os anos 1984 e 1991 houve uma redução de aproximadamente 38% das florestas atlânticas do Paraguai devido ao desmatamento e estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre número reduzidos de *A. vinacea* e diminuição de florestas de Araucárias (BirdLife Internacional, 2009). Segundo Lippe *et al.* (2006), a velocidade em que ocorrem as flutuações demográficas também pode causar efeitos na variação genética - por exemplo, maior diversidade genética pode ficar retida quando o declínio populacional é drástico. Dessa forma, é possível que seus efeitos genéticos ainda não sejam detectáveis e que a espécie possa reter uma significativa proporção da diversidade genética das gerações anteriores.

É importante ressaltar que não há na literatura dados sobre a variação genética de populações silvestres de *A. vinacea* e, dessa forma, não é possível avaliar se os indivíduos amostrados representam a real diversidade genética dos indivíduos encontrados atualmente em vida livre. Estudos futuros em populações naturais poderão gerar dados comparativos que possam levar a melhores inferências sobre a diversidade genética da espécie.

### 5.3 Estrutura Genética

A análise Bayesiana de estrutura genética populacional resultou em melhor combinação de dois grupos gênicos. Entretanto, não foram observados agrupamentos distintos entre indivíduos, o que pode indicar que os animais amostrados apresentam genótipos misturados e baixa estruturação genética. Tais resultados são congruentes ao *assignment test*.

De acordo com Wright (1978), índices  $F_{ST}$  com valores abaixo de 0,05 indicam pequena diferenciação genética; entre 0,05 e 0,15 moderada diferenciação; entre 0,15 e 0,25, grande diferenciação; e para valores acima de 0,25, diferenciação muito elevada. Índices significativamente baixos de diferenciação foram detectados entre Soltura Sul e CETAS, Soltura Sul e Minas Gerais, Zoológico e Minas Gerais referentes aos dados de SSRs. Por outro lado, uma moderada diferenciação foi observada entre Soltura Sul e CETAS com base na região controle do DNA mitocondrial. Demais valores não foram estatisticamente significativos. Os resultados de  $R_{ST}$  indicam moderada diferenciação genética apenas entre Zoológico e CETAS e Zoológico e Minas Gerais; os demais grupos não foram estatisticamente significativos. Os índices estatísticos utilizados foram baseados em modelos de mutações distintas para locos de SSRs, sendo o  $F_{ST}$  associado ao IAM e o  $R_{ST}$  associado ao SMM. Conforme observado, valores de  $R_{ST}$ , sob o modelo SMM, geralmente são mais elevados que os valores de  $F_{ST}$  (Slatkin, 1995; Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Todas as simulações das análises de variância molecular (AMOVA), tanto para índices  $F_{ST}$  quanto  $R_{ST}$  dos locos de SSRs e da região controle do DNA mitocondrial, indicaram que a maior porcentagem da variabilidade genética se encontra dentro dos grupos amostrados quando comparada com a diversidade interpopulacional. Entretanto valores estatisticamente significativos de  $F_{ST}$  foram reportados para todas as simulações apenas com locos de SSRs,

enquanto valores estatisticamente significativos para o índice  $R_{ST}$  foram obtidos apenas quando os grupo Soltura Sul e Minas Gerais foram analisados em conjunto. Tais resultados também indicam baixa diferenciação genética entre os grupos amostrados.

De acordo com os dados gerados, duas hipóteses podem ser levantadas: (i) As populações naturais de *A. vinacea* podem estar conectadas através da dispersão e do fluxo gênico entre indivíduos e, dessa forma, as diferenças genéticas entre estes grupos são menores; (ii) Eventos de expansão geográfica ou colonização recente de populações naturais de *A. vinacea* podem levar a uma homogeneização momentânea das populações.

Em algumas espécies de aves voadoras, a dispersão é facilitada pela capacidade de voo, fazendo com que até mesmo grandes distâncias não sejam uma barreira ao fluxo gênico (Allendorf & Luikart, 2007). Além disso, os padrões de dispersão podem ser determinados pela necessidade de encontrar alimentos e locais para nidificação. Segundo Straube *et al.* (2004), *A. vinacea* realiza grandes movimentos sazonais na região do Paraná, podendo esse comportamento estar associado a variações anuais de produção de pinhão (um dos principais alimentos da espécie) ou de outra fonte alimentar. Já no Rio Grande do Sul, há registros de dispersão pós-reprodução - a espécie não é avistada no mês de março e reaparece no mês de abril, onde permanece o ano todo (Abe, 2004). Embora não exista na literatura informações sobre movimentos migratórios para outros locais de ocorrência da espécie no Brasil, Paraguai e Argentina (Cockle *et al.*, 2007; Carrara, *et al.*, 2008), pode-se inferir que exista fluxo gênico entre populações de *A. vinacea*, fator que resultaria em baixa estruturação populacional. Baixa diferenciação genética associada ao fluxo gênico já foi verificada em outras espécies de aves que potencialmente podem voar longas distâncias, como o papagaio verdadeiro *Amazona*

*aestiva* (Leite *et al.*, 2008), o ganso *Anser anser* (Pellegrino *et al.*, 2015) e o borrelho *Charadrius alexandrinus* (Küpper *et al.*, 2012).

Adicionalmente, eventos de expansão geográfica ou colonização recente de populações naturais podem levar a alterações no tamanho populacional, o que poderia provocar desequilíbrio genético entre deriva e mutação, fazendo com que a estruturação não reflita as reais taxas de fluxo gênico (Beaumont & Balding, 2004). Dessa maneira, a baixa estruturação genética observada em *A. vinacea* poderia estar relacionada ao fato de que os indivíduos atuais da espécie ainda podem guardar semelhança com a população ancestral, dado que ainda não houve tempo suficiente para que diferentes grupos/populações se diferenciem.

As duas hipóteses apresentadas não são auto excludentes - os níveis de diversidade genética observados e a baixa estruturação populacional entre exemplares dos quatro grupos amostrais (Soltura Sul, Zoológico, CETAS e Minas Gerais) podem refletir tanto a capacidade de voo de *A. vinacea* como expansão populacional recente da espécie, características que indicam que, para fins da conservação, medidas devem ser tomadas em relação a todas as regiões de distribuição geográfica da espécie.

Além disso, a rede de haplótipos evidenciou compartilhamento de haplótipos nos diferentes grupos amostrais estudados. Tal resultado pode ser reflexo de fluxo gênico entre populações naturais ou retenção de polimorfismos ancestrais. Em termos de conservação, como pode existir baixa estrutura genética populacional entre os grupos analisados, seria importante preservar essa estrutura, uma vez que essa espécie pode se organizar como uma metapopulação (baixa estruturação e alto fluxo gênico) (Avise, 2000).

Por outro lado, existem outros fatores que podem estar afetando os resultados obtidos - baixo número amostral e origem dos indivíduos. Apesar do cenário proposto, é importante

ressaltar que os indivíduos amostrados foram retirados da natureza e, como animais oriundos do tráfico ilegal, foram apreendidos pelo poder público (IBAMA ou Polícia Ambiental) e não há registro de seus locais de origem. Assim, não há como ter certeza de que esses indivíduos pertençam à mesma ou a diferentes localidades geográficas. Entretanto, com base nas rotas mais comuns do tráfico de aves, estruturadas sobre uma rede que visa o transporte de animais do interior do Brasil e para fora do país, é possível que os grupos capturados de *A. vinacea* reflitam sua origem geográfica. Animais capturados nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país comumente são direcionados para centros urbanos próximos. O mesmo ocorre com aves traficadas no Sul e Sudeste do Brasil de onde, muitas vezes, partirão para abastecer o comércio ilegal internacional (Rencas, 2002; Kuhnen *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2013).

#### **5.4 Inferências Demográficas**

A avaliação de possíveis alterações demográficas de *A. vinacea* foi realizada a partir de comparações entre métodos estatísticos, os quais buscam informações de déficit de heterozigiosidade (*bottleneck*), das frequências mutacionais de testes segregantes (*D* de Tajima), de distribuição haplotípica (*F<sub>s</sub>* de Fu) e de distribuição das diferenças par-a-par das sequências nucleotídicas (*mismatch distribution*).

A análise de *bottleneck* indicou significativo excesso de heterozigiosidade em relação à heterozigiosidade esperada no equilíbrio entre mutação e deriva em três grupos amostrados (Soltura Sul, Zoológico e CETAS), com base no modelo evolutivo IAM. Esse excesso também foi observado em um grupo (CETAS) e para a amostragem total de indivíduos analisados, com base no modelo evolutivo TPM, sugerindo mudanças recentes em seu tamanho efetivo. A discrepância entre IAM e TPM pode estar relacionada a diferentes modelos de mutação para detectar eventos de gargalo genético. Dados empíricos sugerem que o modelo TPM é o modelo

mais apropriado para locos de SSRs (Ellegren, 2000; Ellegren, 2004), enquanto os resultados de IAM devem ser interpretados com cautela, uma vez que esse modelo não é muito informativo (Cournuet & Luikart, 1996). Entretanto, o resultado encontrado com uso desse modelo para os SSRs utilizados no presente estudo, sugerindo expansão populacional em *A. vinacea*, não é concordante com o dado obtido a partir das sequências da região controle do DNA mitocondrial.

Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima  $F_s$  de Fu,  $D^*$  e  $F^*$  de Fu e Li, obtidos a partir dos dados de sequência da região controle do DNA mitocondrial, resultaram em valores não significativos ( $p > 0,05$ ), os quais podem indicar ausência de modificações no tamanho populacional, fraca seleção ou seleção neutra (Simonsen *et al.*, 1995; Ramirez-Soriano *et al.*, 2008). Ou seja, os grupos amostrais estudados se encontram em equilíbrio neutro entre mutação e deriva. Além disso, o padrão bimodal da *mismatch distribution* não indica sinal de expansão para os grupos amostrais estudados e para a espécie como um todo. Dessa forma, é provável que populações naturais de *A. vinacea* estejam estáveis ao longo do tempo, em equilíbrio entre mutação e deriva. Os resultados obtidos com os testes de neutralidade e *mismatch distribution*, associados ao baixo número de haplótipos e ausência de haplótipos exclusivos, indicam que os grupos amostrados de *A. vinacea* não passaram por um processo de crescimento populacional recente pois, segundo Avise *et al.* (1994), populações que passaram por um rápido crescimento populacional tendem a acumular novas mutações.

Embora tais resultados possam parecer contraditórios, marcadores moleculares distintos refletem informações genéticas diferentes (variação alélica em um loco específico *versus* variação na sequência de DNA) e podem resultar em estimativas diferentes em relação a, por exemplo, níveis de variabilidade, estrutura genética e inferências demográficas. Além disso, cada marcador difere em relação a suas taxas de mutações - a estimativa de taxa de mutação

para SSRs dinucleotídeos é maior que a do DNA mitocondrial (Weber & Wong, 1993, Marshall & Baker, 1998, Frankhan, 2000). Assim, é possível que sinais de expansão ainda não sejam detectáveis para a região controle do DNA mitocondrial em *A. vinacea*.

Além disso, é importante lembrar que o tempo de geração de *A. vinacea* é longo. O adulto só se torna reprodutivamente maduro entre 5 e 7 anos e, em geral dois filhotes chegam à idade adulta (MMA, ICMBio - Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios, 2011). Portanto, os resultados obtidos também podem refletir essa característica da espécie, dado que o tempo necessário para que eventos demográficos resultem em algum efeito pode ser mais longo.

## **5.5 Microssatélites e Estimadores de Parentesco**

Os marcadores moleculares SSRs são amplamente empregados nas estimativas de parentesco entre indivíduos (Jones *et al.*, 2010; Wang, 2011; Städele & Vigilant, 2016; Flanagan *et al.*, 2019) e, no presente estudo, foram utilizados sete SSRs. Embora a literatura sugira utilizar maior número de locos para aumentar a eficiência na determinação das relações de parentesco e para diminuir a variância dos índices (geralmente utiliza-se entre 20 e 30 marcadores), estudos com populações selvagens de animais geralmente baseiam-se em um número menor de marcadores. Uma das razões é a ausência de marcadores espécie-específicos e o uso de marcadores heterólogos pode resultar em padrões monomórficos (Ellegran *et al.*, 1997). Entretanto, vários trabalhos já demonstraram a eficácia do uso de 5 a 12 marcadores SSRs em estimativas de parentesco entre indivíduos (Russello & Amato, 2004; Costa-Urruia, *et al.*, 2012; Rollins, *et al.*; 2012; Woolaver *et al.*, 2013; Flanagan *et al.*, 2019). Além disso, os SSRs utilizados no presente trabalho apresentaram o conteúdo da informação polimórfica relativamente alto, o que é desejável em análises de parentesco.

Segundo a literatura, é geralmente aceito que não há um estimador de parentesco superior a outros, embora características do conjunto amostral e do próprio marcador molecular utilizado possam afetar o desempenho dos estimadores (Van de Casteele *et al.*, 2001; Wang, 2011). Dessa forma, uma análise dos desempenhos dos estimadores de parentesco genético, em situações em que o número e/ou o grau de polimorfismo é limitado, torna-se importante para auxiliar na classificação dos melhores estimadores de acordo com as características do grupo amostral (Blouin, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que a utilização e comparação de dois estimadores permitem realizar inferências com maior robustez e segurança em relação ao nível de parentesco em diferentes espécies de aves (Miño, *et al.*, 2009; Diegues *et al.*, 2011; Bergner, *et al.*, 2014). No presente trabalho, os estimadores de parentesco LynchRd (momento) e TrioML (verossimilhança) apresentaram a menor variância média (0,01661 e 0,01663) quando comparados com outros estimadores disponíveis no programa Coancestry e mostraram-se ideais para o conjunto amostral estudado e para os marcadores utilizados. Os valores dos coeficientes médios obtidos dos dois estimadores ( $r = -0,00676$  e  $MLr = 0,09512$ ) indicam que a maioria dos indivíduos não são relacionados. Esse dado é congruente quando os dois estimadores foram associados as diferentes categorias de parentesco geradas pelo programa ML-Relate.

Os índices de verossimilhança (ML-Relate) entre os pares para cada categoria de parentesco foram significativos e indicaram que a maioria dos indivíduos de *A. vinacea* não são relacionados - uma porcentagem alta (83%) de pareamentos aleatórios foi observada entre indivíduos não aparentados, sendo essa porcentagem ainda maior para os grupos amostrais Zoológico e CETAS (87% e 87,57%, respectivamente). Em porcentagens menores, foi

evidenciado que 13,63% e 2,4% das combinações par-a-par indicam a categoria de relacionamento entre meio-irmãos e irmãos completos, respectivamente. Enquanto apenas 0,96% das combinações ocorrem entre pais e filhos. Combinações par-a-par para a categoria pais e filhos em cada grupo amostral indicaram maior relação no grupo Minas Gerais (5,07% das relações), onde há dados do *studbook* de *A. vinacea* de que um casal (V23mg e V24mg) são pais conhecidos de quatro indivíduos (V1mg, V2mg, V3mg e V4mg) nascidos em um criadouro em Minas Gerais, os quais foram mantidos no mesmo até serem reintroduzidos no Parque Nacional das Araucárias. Os resultados do teste de paternidade dessa família conhecida de *A. vinacea* foram compatíveis com os dados do *studbook* fornecidos pelo criadouro.

Análises de parentesco são consideradas desafiadoras em situações em que nenhum dos pais são conhecidos (Städele & Vigilant, 2016). Geralmente, os mesmos princípios de compartilhamento de alelos e de exclusão podem ser aplicados, mas a atribuição de pais e filhos se torna mais complicada pois a identidade dos alelos materno e paterno na descendência é desconhecida. Diferentes abordagens já foram utilizadas para atribuir parentesco em populações naturais onde pouca ou nenhuma relação entre pais-prole eram conhecidas (Jones *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2013). No presente trabalho, foi investigada a paternidade de um indivíduo nascido na natureza no Parque Nacional das Araucárias, por meio da comparação dos resultados gerados com os dados dos indivíduos que possuíam informações sobre seus pais. Os resultados indicam que o indivíduo V42 é mais proximamente relacionado ao casal V9 (fêmea) e V40 (macho) e mais distante geneticamente de outros indivíduos. Além disso, esses indivíduos compartilham um alelo privativo (alelo 256 no loco AgGT83) o qual está presente apenas em alguns indivíduos do grupo amostral Soltura Sul. É importante ressaltar que esse é o primeiro registro de um filhote nascido na natureza após o programa conservacionista ter sido implementado pela ONG Instituto Espaço Silvestre.

## 5.6 Implicações para Conservação

### 5.6.1 Indivíduos cativos de *Amazona vinacea*

Os dados genéticos do presente trabalho são importantes para subsidiar estratégias de manejo de grupos de indivíduos que não apresentam genealogias conhecidas, como é o caso dos indivíduos cativos de *A. vinacea* para os quais não há dados disponíveis nos criadouros sobre suas relações de parentescos e origem geográfica.

É fundamental conhecer as relações de parentesco entre fundadores para minimizar a reprodução entre indivíduos aparentados, evitando ou reduzindo a depressão endogâmica e a perda de diversidade genética (Montgomery *et al.*, 1997; Frankham, 2008). Portanto, a análise de indivíduos de maneira a identificar quais são os animais menos aparentados em relação a outros é um caminho importante para se definir a estrutura do manejo genético e reprodutivo que poderá ser implementado em programas de reprodução *ex situ* de *A. vinacea*. Indivíduos com índices de parentescos baixos são valiosos para o manejo, uma vez que esses carregam menos alelos em comum (Frankham *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2010).

Através de simulações computacionais, Ballou & Lacy (2008) demonstraram que, dentre uma série de procedimentos de manejo, a minimização do grau de parentesco entre indivíduos é a melhor maneira para reter a variação genética populacional. Assim, esse procedimento busca o acasalamento daqueles indivíduos que apresentam os menores graus de parentescos em relação à média da população.

Em programas de reprodução em cativeiro, geralmente estabelece-se uma classificação de machos e fêmeas que apresentam do menor para o maior grau de parentesco. Essa lista pode ser estática (em que usam-se os dados de parentesco inicialmente determinados, até que um número específico de casais seja formado), dinâmica (em que os dados de parentesco são

continuamente recalculados após cada possível acasalamento, supondo que filhotes aumentarão o parentesco entre alguns dos indivíduos inicialmente analisados), classificatória (em que ocorre a retirada sucessiva de indivíduos mais aparentados e subseqüentes classificações até formar um grupo de animais que possam produzir descendentes com menor parentesco médio) ou simultânea (baseada nos indivíduos que produzem maior prole) (Ivy & Lacy, 2012). Os locos microssatélites analisados no presente estudo demonstram que estes são eficientes para aplicação em testes de parentesco e, portanto, podem ser usados para geração de listas de classificação de machos e fêmeas de *A. vinacea* mantidos em cativeiro com base em seus graus de parentesco.

Estratégias conservacionistas que visam manter a heterozigosidade da prole, selecionando os indivíduos baseado na proporção de seus locos heterozigotos, também podem ser adotadas em programas de reprodução em cativeiro (Ruiz-Lopes *et al.*, 2009). Pode-se ainda usar como critério uma estratégia de manutenção de alelos raros ou de importância adaptativa (Hugues, 1991). A escolha da melhor estratégia deve basear-se em características específicas de cada espécie, como sistema de acasalamento, tamanho populacional, estrutura social e tempo de geração (Witzenberg & Hochkirch, 2013).

O sucesso de outros programas de recuperação de populações de aves ameaçadas indica que esforços voltados à reprodução em cativeiro devem ser prioritários a fim de evitar a sua extinção. Diferentes programas de reprodução em cativeiro de aves ameaçadas de extinção no Brasil, como *Crax blumenbachii* (Diegues, 2011), *Aburria jacutinga* (Oliveira-Junior, 2012) e *Pauxi mitu* (Davanço, 2012), têm sido baseados em dados genéticos com o objetivo de reduzir a perda da diversidade genética. Dado o *status* de ameaça de *Amazona vinacea* e o potencial declínio de suas populações naturais, é extremamente importante o desenvolvimento de um

programa conservacionista baseado em inferências genéticas para exemplares de cativeiro. Ressalta-se que, após um possível manejo reprodutivo em cativeiro, é importante que esses grupos de indivíduos passem por novos monitoramentos genéticos para avaliar se as estratégias aplicadas se mostraram adequadas para a manutenção da diversidade genética na espécie.

### **5.6.2 Reintrodução de *Amazona vinacea* no Parque Nacional das Araucárias**

Animais apreendidos pela Polícia Ambiental ou pelo IBAMA necessitam ser inicialmente alojados, alimentados e receber cuidados médicos-veterinários, especialmente devido os maus tratos e ao estresse a que foram geralmente submetidos. Posteriormente, há necessidade de serem incluídos em programas de manejo e reprodução em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução (Branco, 2008).

O termo “soltura” pode ser considerado genérico e tal ação ocorre comumente no Brasil, sendo praticada, tanto pelo poder público como por criadouros. A soltura refere-se simplesmente ao ato de libertar indivíduos em áreas selecionadas por meio de alguns critérios, para que os mesmos tenham chance de sobrevivência fora das condições de cativeiro. Por outro lado, reintrodução refere-se à tentativa de se estabelecer uma espécie em uma área que anteriormente fazia parte de seu histórico, mas da qual foi extirpada ou se tornou extinta, com finalidades específicas e controladas (IBAMA, 2006).

O Instituto Espaço Silvestre utiliza como critérios para reintrodução de exemplares de *A. vinacea* as diretrizes e manuais da IUCN, como: (1) levantamento clínico e diagnóstico dos indivíduos, (2) treinamentos comportamentais que os preparam para a vida na natureza, (3) soltura em local onde a espécie já existiu, mas em que foi extinta (Parque Nacional das Araucárias) e (4) monitoramento pós-soltura. Um outro critério das diretrizes da IUCN refere-

se à análise genética dos indivíduos a serem reintroduzidos visando minimizar os riscos de extinção das espécies. Entretanto, sua aplicação não é obrigatória e, dado que o *status* genético de *A. vinacea* era desconhecido quando o programa de conservação da espécie foi iniciado, este não foi adotado.

Trabalhos de reintrodução de aves no país já foram feitos com espécies da família Psittacidae. Como exemplo, podem ser citados: a reintrodução de espécimes de papagaios-verdadeiros, *A. aestiva*, numa área do pantanal no Mato Grosso do Sul (Seixas e Mourão, 2000) e em uma área de Caatinga na Bahia (Saidenberg, 2010); a reintrodução do periquito-de-testa-vermelha, *Aratinga auricapilla*, na Bahia (Lima & Santos, 2005); e a translocação e reintrodução de ninhegos da arara-azul-grande, *Anodorhynchus hyacinthinus*, em uma área do Pantanal do Mato Grosso do Sul (Vargas, *et al.*, 2001). Embora esses trabalhos também sigam as normativas da IUCN, o *status* genético dos espécimes reintroduzidos não foi avaliado. Além disso, os registros dos dados obtidos em programas de reintrodução no Brasil ainda são escassos, com publicações na forma de livros, projetos, trabalhos acadêmicos e resumos em congressos superando a porcentagem de artigos científicos. Essa situação gera dificuldade de acesso e divulgação dos dados levantados. Tal cenário indica que há um número reduzido de ações que, efetivamente, considerem dados genéticos em programas de reintrodução de espécies no Brasil.

No presente trabalho, ao combinar diferentes análises genéticas, foi possível fornecer uma imagem relativamente ampla do *status* genético da população fundadora de *A. vinacea* no Parque Nacional das Araucárias, onde foi possível detectar alta variabilidade genética, baixa estrutura genética populacional, principalmente entre os grupos amostrais Soltura Sul e Minas Gerais, cujos indivíduos foram apreendidos em diferentes regiões geográficas do Brasil (região

Sul e Sudeste). Além disso, foi também possível evidenciar um reduzido nível de parentesco entre indivíduos amostrados.

Frente à ausência de dados acerca da diversidade genética de populações naturais de *A. vinacea* na literatura, à pressão de tomadas de decisões rápidas para minimizar o potencial risco de extinção da espécie e à possibilidade iniciar uma nova população em local onde a espécie existiu naturalmente (Parque Nacional das Araucárias) somados aos dados genéticos apresentados no presente trabalho - que demonstra baixa estruturação populacional - pode-se considerar que o programa conservacionista gerido pelo Instituto Espaço Silvestre esteja sendo realizado de maneira adequada. Dado que a população original nessa área havia sido extinta, pode-se considerar que as medidas que vêm sendo aplicadas em relação à reintrodução de exemplares sejam categorizadas como “introdução conservacionista” (colonização assistida ou substituição ecológica) (IUCN, 2014).

Entretanto, ressalta-se que, mesmo que existam conjuntos de populações de *A. vinacea* que apresentem migração de indivíduos e conseqüente fluxo gênico entre si, estas ainda podem apresentar características próprias como alelos únicos. Além disso, um possível aumento na fragmentação de habitats pode levar à uma redução no fluxo gênico e, conseqüentemente, a longo prazo, ao surgimento de diferenças populacionais mais evidentes. Dessa forma, análises genéticas devem ser aplicadas em novos exemplares que possam ser potencialmente selecionados para reintrodução no Parque Nacional das Araucárias visando a identificação de seus níveis de diversidade genética e parentesco. Análises genéticas em indivíduos nascidos nesse ambiente natural, associadas ao monitoramento dos indivíduos reintroduzidos, também podem contribuir para avaliar a eficiência do programa conservacionista, ou seja, o nível de restabelecimento (sucesso de reintrodução).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Como resultado de diversas ações antrópicas, como a fragmentação de habitat e o intenso tráfico ilegal, diversas espécies de psitacídeos se encontram categorizadas em diferentes níveis de ameaça segundo a IUCN. Assim, algumas medidas para conservação de espécies têm sido propostas. No entanto, problemas como falta de objetivos bem definidos e/ou falta de conhecimentos acerca de características biológicas e genéticas de populações naturais e de cativeiro podem levar à ineficiência destas práticas conservacionistas.

O presente estudo é o primeiro a analisar parâmetros genéticos em indivíduos cativos e reintroduzidos da espécie *A. vinacea*. Além disso, ainda não existem dados a respeito da variabilidade genética, estrutura genética populacional e níveis de parentesco de suas populações naturais. Os dados obtidos mostraram que a utilização em conjunto de diferentes marcadores moleculares (SSRs e DNA mitocondrial) foi eficiente para avaliar a variação e estrutura genética dos grupos amostrados, o que reforça que estes marcadores podem ser instrumentos aplicáveis com sucesso em práticas conservacionistas.

De forma geral, os dados do presente trabalho apontam que *A. vinacea* não apresenta vulnerabilidade genética quando comparada com outros psitacídeos ameaçados de extinção, dado que foi detectada uma baixa estrutura genética populacional e baixos níveis de indivíduos aparentados, o que indica que esses animais possuem aptidão para sobreviver a variações ambientais.

As informações aqui obtidas, além de poderem ser aplicadas junto ao programa conservacionista desenvolvido no Parque Nacional das Araucárias, são também importantes para uso em futuros trabalhos na área da conservação de outros grupos cativos e de populações naturais de *A. vinacea*.

## **Capítulo II**

### **Produção Técnica**

**Elaboração de materiais didáticos - Papagaio-de-peito-roxo: por que conservar?**

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil, a maioria das pesquisas e a produção de conhecimento científico é realizada dentro de Universidades (Suzigan & Albuquerque, 2011). Segundo Guimarães (2009), a circulação do conhecimento científico em nossa sociedade se apresenta sob dois modos distintos. De um lado, temos a circulação do conhecimento no interior da comunidade científica e, nesse cenário, o locutor e o destinatário são especialistas em cada domínio da ciência. A outra forma de comunicação científica envolve um percurso que busca atingir diferentes setores da sociedade ou a sociedade como um todo e, assim, tem como destinatário o público que espera o resultado da ciência por meio da denominada “divulgação científica” (Guimarães, 2009).

A divulgação científica tem como premissa democratizar o acesso científico e estabelecer condições para a chamada “alfabetização científica” (Silva, 2006). Comunicar a ciência e a tecnologia está atrelado à possibilidade de propiciar elementos básicos para a compreensão e ação do mundo contemporâneo (Lima, 2016). Tal comunicação pode incluir os cidadãos no debate sobre temas especializados e que podem impactar sua vida e seu trabalho, a exemplo de transgênicos, células tronco, mudanças climáticas, energias renováveis, degradação e conservação ambiental (Souza & Rocha, 2017).

A divulgação dos resultados de pesquisa científicas, ou o escopo mais relevante destas, pode ser realizada por meio de uma linguagem simples por meio de, por exemplo, palestras, oficinas ou artes cênicas e também por intermédio da elaboração de diferentes materiais como apostilas, textos de jornais/blogs, cartilhas e vídeos (Azevedo & Scarpa, 2017, Almeida *et al.*, 2018). Além disso, esses materiais podem ser utilizados em escolas como metodologias alternativas a uma aula tradicionalmente expositiva, de modo a motivar a interação dos alunos

pelo conteúdo proposto e favorecer a construção do conhecimento (Candotti, 1999, Robert & Simmons, 2010).

O presente trabalho (Capítulo I) evidenciou informações importantes sobre a biologia do psitacídeo ameaçado de extinção *Amazona vinacea* (papagaio-de-peito-roxo) e da problemática associada à degradação ambiental e ao tráfico ilegal. Além disso, os resultados gerados forneceram uma representativa amostragem de seu *status* genético, o que poderá contribuir com estratégias conservacionistas para a espécie. Entretanto, programas conservacionistas podem obter mais chances de sucesso se envolverem ações multidisciplinares e integradas, especialmente voltadas à conscientização da população humana local para a importância da manutenção de nossa biodiversidade. Uma das formas de conscientização e envolvimento refere-se a projetos de educação ambiental e geração de materiais de divulgação científica.

## **2. OBJETIVO**

A elaboração de materiais de divulgação científica foi o principal objetivo deste trabalho, tendo como tema a biologia, fatores de risco, características genéticas e ações para conservação de *A. vinacea*, gerando assim ferramentas educativas para subsidiar atividades que tenham por fim conscientizar a população (crianças, jovens e adultos) da importância da conservação dessa espécie de ave ameaçada de extinção.

### 3. DESENVOLVIMENTO

Dois materiais didáticos, correspondentes a uma cartilha educativa e a um vídeo (áudio-book), foram elaborados visando o ensino e aprendizagem das problemáticas associadas à conservação de *A. vinacea*. Ambos os materiais, denominados de *Papagaio-de-peito-roxo: por que conservar?*, foram desenvolvidos com uma linguagem apropriada à divulgação científica (popularização da ciência), definida como o uso de processos e recursos para a comunicação da informação científica e tecnológica ao público em geral (Albagli, 1996).

Inicialmente, foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre ações de divulgação científica e *A. vinacea* através da busca de livros textos e artigos científicos e materiais produzidos pelo Instituto Espaço Silvestre (<https://www.espacosilvestre.org.br>) para determinar conteúdos já abordados e a forma como estes foram divulgados. Em seguida, foram definidos os conceitos a serem abordados na cartilha e áudio-book a serem produzidos. As imagens utilizadas nestes materiais foram originalmente criadas (Figura 8) ou retiradas de sites de uso livre e imagens. Durante o processo de criação dos personagens, foi dada atenção especial à fala destes, para que não fosse prejudicado o processo de comunicação, utilizando assim uma linguagem simples e de fácil entendimento (Figura 9). Após elaboração do texto e da diagramação das figuras, os materiais passaram por revisão conceitual e científica.



**Figura 8.** Exemplo de ilustrações que compõem a cartilha educativa *Papagaio-de-peito-roxo: por que conservar?*



**Figura 9.** Gravação do áudio-book intitulado *Papagaio-de-peito-roxo: por que conservar?*

#### 4. RESULTADOS

A cartilha educativa (ISBN: 978-85-917599-6-5) e o vídeo, intitulados *Papagaio-de-peito-roxo: por que conservar?*, foram elaborados contendo uma narrativa e ilustrações que abordam aspectos da biologia de *A. vinacea*, suas relações inter e intraespecíficas, mecanismos que levam à extinção, incluindo conteúdos sobre genética e ações para a conservação da espécie. Adicionalmente, a cartilha apresenta atividades de caráter lúdico, como testes e jogos, com o objetivo de melhor fixar o conhecimento apresentado e divertir os leitores (Anexo 2). Os conteúdos foram abordados de forma clara e acessível, visando atingir especialmente o público jovem, com a intenção de despertar o interesse pela preservação de nossa biodiversidade.

A disponibilização dos materiais gerados será feita digitalmente, de forma gratuita, em parceria com a Agência de Divulgação Científica e Comunicação do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (AgDC) por intermédio de sua página (<https://www.agdc.ibb.unesp.br>) e Canal YouTube (<https://www.youtube.com/channel/UCVsAhL-CW0k81uCuJmyMq9A>). Neste canal, o material pode ser acessado na *playlist* ([https://www.youtube.com/playlist?list=PLnrfyF0fDZrUJgVTq7WOR1VjuWX3r1c\\_](https://www.youtube.com/playlist?list=PLnrfyF0fDZrUJgVTq7WOR1VjuWX3r1c_)).

## 5. PERSPECTIVAS

Os materiais educativos produzidos podem ser considerados instrumentos de popularização da ciência e podem ser importantes ferramentas de ensino e conscientização. Dado seu caráter lúdico e de fácil compreensão, podem promover o processo de sensibilização da população para a importância da conservação de espécies ameaçadas de extinção, em especial, *A. vinacea*.

Futuramente, os dois materiais serão também divulgados na página do Instituto Espaço Silvestre (<https://www.espacosilvestre.org.br>) e disponibilizados fisicamente (cartilha impressa e gravação do áudio-book em CD) para geração de um kit educativo a ser encaminhado para o Instituto Espaço Silvestre para uso em atividades de educação ambiental que a entidade já desenvolve. Tais atividades deverão ser especialmente focadas nas comunidades de Passos de Maia e Ponte Serrada e professores da região, municípios abrangidos pelo Parque Nacional das Araucárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, L.M. 2004. *Caracterização do habitat do papagaio-de-peito-roxo Amazona vinacea (Kuhl, 1820) no município de Tunas do Paraná, região metropolitana de Curitiba, Paraná*. Dissertação de Mestrado. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 87 p.
- Albagli, S. 1996. *Divulgação Científica: informação científica para a cidadania?* Ciência e Informação 25: 396-404.
- Allendorf, W.A. & Luikart, G.H. 2007. *Conservation and Genetic of Populations*. Blackwell Publishing, Malden, Massachussets.
- Allendorf, F. W., England, P. R., Luikart, G., Ritchie, P. A., & Ryman, N. (2008). *Genetic effects of harvest on wild animal populations*. Trends in ecology & evolution, 23(6), 327-33.
- Almeida, T.R.A., Presti, F.T., Cruz, V.P., Wasko, A.P. 2019. *Genetic analysis of the endangered Hyacinth Macaw (Anodorhynchus hyacinthinus) based on mitochondrial markers: different conservation efforts are required for different populations*. Journal of Ornithology. 1 – 10
- Almeida, C.S., Freire, M., Bento, L., Jardim, G., Ramalho, M., Dahmouche, M. 2018. *Ciência e teatro: um estudo sobre as artes cênicas como estratégia de educação e divulgação da ciência em museus*. Ciência & Educação. 24: 375 – 393.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miler, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology, 403-410 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
- Alves, R., Lima, J., Araujo, H. .2013. *The live bird trade in Brazil and its conservation implications: An overview*. Bird Conservation International. 23: 53 – 65.

- Anciães, M. & Del Lama, S.N. 2002. *Sex identification of pin-tailed manakins (Ilicura militaris: pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies.* Ornitologia Neotropical. 13: 159 – 165.
- Azevedo, N.H. & Scarpa, D.L. 2017. *O contato com materiais de divulgação científica pode influenciar as concepções de natureza da ciência?* In XI Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* Chapman and Hall, New York, 511 pp.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species.* Harvard University Press. Cambridge, 447 pp.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition).* Sinauer, Sunderland, MA, 684 pp.
- Ballou, J.D. & Lacy, R.C. 1995. *Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigree populations.* In: Ballou J.D.; Gilpin, M.; Foose, T.J. (eds). Population Management for Survival and Recovery. Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation. Columbia University Press, New York.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. 2002. *The estimation of population differentiation with microsatellite markers.* Molecular Ecology. 11: 155 – 165.
- Bandelt, H., Forster, P., & Röhl, A. 1999. *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.* Molecular Biology and Evolution, 16(1), 37–48.
- Beaumont, M.A. & Balding, D.J. 2004. *Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans.* Molecular Ecology 13: 969-980.

- Bencke, G.A., Maurício, G.N., Develey, P.F., Goerck, J.M. 2006. *Áreas importantes para a conservação das aves no Brasil: parte I- estados do domínio da Mata Atlântica*. São Paulo, SAVE Brasil, 492p.
- Bergner, L.M., Jamieson, I.G., Robertson, B.C. 2014. *Combining genetic data to identify relatedness among founders in a genetically depaupered parrot, the Kakapo (Strigops habroptilus)*. Conservation Genetics 15: 1013-1020.
- Blouin, M.S. 2003. *DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations*. Trends in Ecology and Evolution 10: 503 – 511.
- Branco, M.A. 2008. *Políticas públicas e serviços públicos de gestão e manejo da fauna silvestre nativa resgatada. Estudo de caso*. Prefeitura da Cidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.
- Browne, R.A., Collins, E., Anderson, D.J. 2008. *Genetic structure of Galapagos population of the yellow warbler*. The Condor, 549-553.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. 1992. *Single loco and multiloco DNA fingerprint*. In: Hoebel, A.R. (ed.). Molecular Genetics Analysis of Population. A Practical Approach. Oxford University Press, New York, 225-269.
- Bruford, M. W., Cheesman, D.J., Coote, T., Green, H.A.A., Haines, S.A., O’Ryan, C., Williams, T.R. 1996. *Microsatellite and their application to conservation genetics*. In: Smith, T.B., Wayne, R.K (Eds.). Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford University Press, New York. Pp: 278 - 297.
- Candotti, E. 1999. *Ciência na educação popular. O papel do cientista na educação científica*. Jornal da ciência, Rio de Janeiro. 407: 15 – 23.
- Caparroz, R., Miyaki, C., Baker, A.J. 2009. *Contrasting phylogeographic patterns in mitochondrial DNA and microsatellite: evidence of female philopatry and male-biased gene flow among*

- regional populations of the blue-and-yellow macaw (Psittaciformes: Ara ararauna) in Brazil.*  
The Auk, 359-370.
- Carrara, L.A., Faria, L.C.P., Matos, J.R., Antas, P.T.Z. 2008. *Papagaio-de-peito-roxo Amazona vinacea (Kuhl) (Aves: Psittacidae) no norte do Espírito Santo: redescoberta e conservação.* Revista Brasileira de Zoologia 25: 154-158.
- Carroll, S. P., Jørgensen, P. S., Kinnison, M. T., Bergstrom, C. T., Denison, R. F., Gluckman, P., Tabashnik, B.E. (2014). *Applying evolutionary biology to address global challenges.* Science, 346(6207), 1245993.
- Ceballos, G., Ehrlich, P., Barnosky, A.D., Garcia, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M. 2015. *Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction.* Science Advances 1: 1 – 5.
- Cockle, K., Capuzzi, G., Bodrati, A., Clay, R., Castilho, H., Velázquez, M., Areta, J.I., Fariña, N., Fariña, R. 2007. *Distribution, abundance, and conservation of Vinaceous Amazon (Amazona vinacea) in Argentina and Paraguay.* Journal of Field Ornithology, 78: p. 21-39
- Collar, N.J. 1997. *Family Psittacidae (Parrots).* In: del Hoyo, J., Elliot, A.E. & Sargatal, J. (Eds.) Handbook of the Birds of the World, vol. 4. Sandgrouse to Coochos. Lynx Edicions, Barcelona, 280-477.
- Cournet, J.M. & Luikart, G. 1996. *Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data.* Genetics 144: 2001 – 2014.
- Costa-Urrutia, P., Abub, C., Secchi, R., Lessa, E.P. 2012. *Population genetic structure and social kin associations of Franciscana Dolphin, Pontoporia blainvillei.* Journal of Heredity, 103, 92-102.

- Dantas, G.P., Meyer, D., Godinho, R., Ferrand, N., Morgante, J.S. 2012. *Genetic variability in mitochondrial and nuclear genes of Larus dominicanus (Charadriiformes, Laridae) from the Brazilian coast*. Genetics and Molecular Biology. 874-885.
- Davanço, P.V., Francisco, M.R. 2012. *Utilização de locos de microssatélites para a identificação de híbridos e manejo genético de uma espécie de ave brasileira extinta na natureza: o mutum-de-alagoas, Pauxi mitu (Aves, Cracidae)*. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos.
- Diegues, S. & Galetti, P.M.J. 2011. *Variação genética em uma população cativa de mutum-do-sudeste (Crax blumenbachii, Spix 1825) (Cracidae) como subsídio para manejo e conservação*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A. 2009: *Geneious*. Available from <http://www.geneious.com>
- Earl, D.A. & vonHoldt, B.M., 2012. *STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method*. Conservation Genetics Resources. 359 - 361
- Eberhard, J.R., Wright, T.F. & Bermingham, E. 2001. *Duplication and Concerted Evolution of the Mitochondrial Control Region in the Parrot Genus Amazona*. Molecular Biological Evolutionary, 1330–1342.
- Edgar, R.C. 2004. *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Research, 1792-1797.
- Ellegren, H. 2000. *Microsatellite mutations in the germline: implicatins for evolutionary inference*. Trends in Genetics 16:551 – 558.

- Ellegran, H. 2004. *Microsatellites: simple sequences with complex evolution*. Nature Reviews Genetics 5: 435 – 445.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study*. Molecular Ecology 14:2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. 1992. *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics, 479-491.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. 2005. *Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics, 47-50.
- Faria, L.P., Carrara, L.A., Rodrigues, M. 2007. *Sexual size dimorphism in henna-capped foliage-gleaner Hylocryptus restirostris (Wied) (Aves, Furnariidae)*. Revista Brasileira de Zoologia 24: 207-212.
- Flanagan, S.P & Jones, A.G. 2019. *The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond*. Molecular Ecology. 28: 544 – 567.
- Frankham, R., Briscoe, D.A., Ballou, J.D. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2008. *Fundamentos da genética da conservação*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 262 pp.
- Feral, J.P. 2002. *How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 121-145.

- Fernandes, G.A., Caparroz, R. 2013. *DNA sequence analysis to guide the release of blue-and-yellow macaws (Ara ararauna, Psittaciformes, Aves) from the illegal trade back into the wild*. *Molecular Biology* 40: 2757 – 2762.
- Fernandes, G.A., Dobkowski-Marinho, S., Santos, V.F., Lima-Resende, C.A., Silva, H.E., Rodrigues, F.P., Caparroz, R. 2019. *Development and characterization of novel microsatellite locos for the Blue-fronted Amazon (Amazona aestiva, Psittaciformes, Aves) and cross-species amplification for other two threatened Amazona species*. *Molecular Biology Reports* 1377 – 1382.
- Forshaw, J.M. 1989. *The Parrots of the World*, 3 ed., Lansdowne Press, Willoughby.
- Fu, X.Y. 1997. *Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection*. *Genetics* 147: 915-925
- Fu, X. Y. & Li, W.H. 1993. *Statistical tests of neutrality of mutations*. *Genetics* 133: 693-709.
- Galbusera, P., Dongen, S.V., Mathysen, E. 2000. *Cross-species amplification of microsatélites primers in passerine birds*. *Conservation genetics* 1: 163-168.
- García-Navas, V., Ferrer, E.S., Cáliz-Campal, C., Bueno-Enciso, J., Barrientos, R., Sanz, J.J., Ortego, J. 2015. *Spatiotemporal and genetic contingency of extrapair behavior in a songbird*. *Animal Behaviour*. 106: 157 – 169.
- Gilpin, M.E. & Soulé, M.E. 1986. *Minimum viable populations: the processes of species extinctions*. In: Soulé, M. E. (ed.) *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland 13–34.
- Grando, A.P. 2002. *Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP.

- Griffiths, R., Double, M., Orr, K.C.Y., Dawson, R.J.G. 1998. *A DNA test to sex most birds*. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Guimarães, E. 2009. *Linguagem e Conhecimento: Produção e Circulação da Ciência*. *Revista do Laboratório de Estudos Urbanos do Núcleo de Desenvolvimento da Criatividade* 2: 5 – 14.
- Haavie, J., Saetre, G.P., Moum T. 2000. *Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage colour in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes*. *Molecular Ecology* 9: 1137 – 1148.
- Haig, S.M., Miller, M.P., Bellinger, R., Draheim, H.M., Mercer, D.M., Mullins, T.D. 2016. *The conservation genetics juggling act: integrating genetics and ecology, science and policy*. *Evolutionary applications* 9(1): 181 – 195.
- Hancock, J.M. 1999. *Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. In: Goldstein, D.B., Schlotterer, C. (eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford. Pp: 1-9.
- Harpending, R.C. 1994. *Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution*. *Human Biology*, 561-600.
- Harrison, H.B., Saenz-Agudelo, P., Planes, S., Jones, G.P., Berumen, M.L. 2013. *Relative accuracy of three common methods of parentage analysis in natural population*. *Molecular Ecology*. 22: 1158 – 1170.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Handbook of the Birds of the World and BirdLife International. 2017. *Handbook of the Birds of the World and BirdLife International digital checklist of the birds of the world*, version 9.1. <https://datazone.birdlife.org/species/taxonomy>. Accessed 17 Jan 2019.

- Huang, Z., & Ke, D. (2016). *Structure and evolution of the Phasianidae mitochondrial DNA control region*. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 350-354.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2006. *Lista das espécies da fauna ameaçada de extinção*. Relatório de atividades das ASM - Áreas de Soltura e Monitoramento de Animais Silvestres.
- IUCN. 2014. *Comissão para a Sobrevivência de Espécies IUCN Diretrizes de Manejo Ex situ para a Conservação de Espécies*. Disponível em: <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-064-Pt.pdf>
- IUCN - *Red List of Threatened Species*. 2017. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 25 de agosto, 2017.
- Ivy, J.A., Lacy, R.C. 2012. *A comparison of strategies for selecting breeding pairs to maximize genetic diversity retention in managed populations*. *Journal of Heredity* 103: 186 – 196.
- Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A. 2010. *A practical guide to methods of parentage analysis*. *Molecular Ecology Resources*. 10: 6:30.
- 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*.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2007. *Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment*. *Molecular Ecology*. 1099 – 1106.
- Kimura, M. & Crow J.F. 1964. *The number of alleles than can maintained in a finite population*. *Genetics*. 49: 725 – 738.

- Kimura, M. & Ohta, T. 1978. *Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations*. Proceedings of Natural Academy of Sciences of the USA. 75: 2868 – 2872.
- Kuhnen, V.V, Remor, J.O., Lima, R.E.M. 2012. *Breeding and trade of wildlife in Santa Catarina state, Brazil*. Brazillian Journal of Biology.
- Leite, K.C.E., Seixas, G.H.F., Berkunsky, I., Collevatti, R.G., Caparroz, R. 2008. *Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (Amazona aestiva, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite locos: implication for conservation*. Genetics and Molecular Research 7: 819:829.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. Bioinformatics, 1451-1452.
- Lima, P.C., & Santos, S.S. 2005. *Reprodução de uma população reintroduzida de Aratinga auricapilla (Kuhl, 1820) Aves: Psittacidae, em área de Cerrado no Leste da Bahia, Brasil*. Ornithologia 1: 13-18.
- Lima, G.S. 2016. *O professor e a divulgação científica: apropriação e uso em situações formais de ensino*. Tese de doutorado. Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lippe, C., Dumont, P., Bernatchez, L. 2006. *High genetic diversity and no inbreeding in the endangered Copper Redhorse, Moxostoma hubbsi (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time*. Molecular Ecology 15: 1769-1780.
- Lynch, M., Walsh, B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA.

- Lynch, M., Ritland, K. 1999. *Estimation of pairwise relatedness with molecular markers*. Genetics 152: 1753 – 1766.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M., Sherman, W.B. 1998. *Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks*. Journal of Heredity 89: 238-247.
- Küpper, C., Edwards, S.V., Kosztolányi, A., Alrashidi, M.A., Burke, T., Herrmann, P., Amat, J.A., Amezian, M., Rocha, A., Hötter, H., Inanov, A., Chernicko, J., Szekely, T. 2012. *High gene flow on a continental scale in the polyandrous Kentish plover Charadrius alexandrinus*. Molecular Ecology 21: 5864-5879.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. 1998. *Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations*. Molecular Ecology 7: 639 – 655.
- Meeûs, T.D. 2018. *Revisiting FIS, FST, Wahlund Effects, and Null Alleles*. Journal of Heredity 446 – 456.
- Miyaki, C.Y., Griffiths, R., Orr, K., Nahum, L.A., Pereira, S.L., Wjntal, A. 1998. *Sex identification of parrots, toucans and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies*. Zoo Biology. 17: 415 – 423.
- Mercer, D.M., Haig, S.M., Roby, D.D. 2013. *Phylogeography and population genetic structure of double-crested cormorants (Phalacrocorax auritus)*. Conservation Genetics, 823-836.
- Milligan, B.C. 2003. *Maximum-likelihood estimation of relatedness*. Genetics. 163: 1153 – 1167.
- Miño, C.I., Sawyer, R.C.B., 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.

- Monceau, K., Cézilly, F., Moreau, J., Montreuil, S., Wattier, R. 2013. *Colonisation and Diversification of the Zenaida Dove (Zenaida aurita) in the Antilles: Phylogeography, Comtemporary Gene Flow and Morphological Divergence*. Plos One 8 (12): e82189.
- Montgomery, M.E., Ballou, J.D., Nurthen, R.K., England, P.R., Briscoe, D.A., Frankham, R. 1997. *Minimizing kinship in captive breeding programs*. Zoo Biology. 16: 377 – 389.
- MMA, ICMBio. 2011. *Plano Nacional para Conservação de Papagaios da Mata Atlântica*. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-papagaios/pan-papagaios.pdf> . Acesso em: 25 de agosto, 2015.
- Oliveira-Marques, A. R. 2010. *Caracterização da estrutura genética populacional das araras vermelhas Ara chloropterus e Ara macao (Psittaciformes, Aves)*. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Oliveira-Junior, P.R.R. 2012. *Monitoramento Genético da População ex situ de jacutinga (Aburria jacutinga, Aves, Cracidae) como subsídio para a conservação da espécie*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C., Fuerst, P.A. 1998. *What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker*. Ecology 79: 361-382.
- Peakall, R. & Smouse P.E. 2012. *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update*. Bioinformatics 28, 2537-2539.
- Peel, D., Ovenden J.R., Peel S.L. 2004. *NEESTIMATOR: Software for Estimating Effective Population Size, Version 1.3*. Queensland Government: Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane, Queensland.

- Pellegrino, I., Cucco, M., Follestad, A., Boos, M. 2015. *Lack of genetic structure in greylag goose (Anser anser) populations along the European Atlantic flyway*. PeerJ 3e1161: DOI 107717/peerj.1161.
- Pemberton, J. 2004. *Measuring inbreeding depression in the wild: the old ways are then best*. Trends in Ecology and Evolution. 613 - 615
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.J. 1999. *Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data*. The Journal of Heredity 90: 502- 503.
- Pough, F.H, Janis, C.M. & Heiser, J.B. 2008. *A vida dos vertebrados*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 718 pp.
- Prestes, N.P., Martinez, J., Kilpp, J.C., Batistela, T., Turkievicz, A., Rezende, E., Gaboardi, V.T.R. 2014. *Ecologia e Conservação de Amazona vinacea em áreas simpátricas com Amazona petrei*. Ornithologia 6: 109-120.
- Presti, F.T., Guedes, N.M.R., Antas, P.T.Z., Miyaki, C.Y. 2015. *Population genetic structure in hyacinth macaws (Anodorhynchus hyacinthinus) and identification of the probable origin of confiscated individuals*. Journal of Heredity.
- Prichard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Genetics 155: 170-181.
- Primack, R.B., Rodrigues, E. 2002. *Biologia da conservação*. Londrina: E. Rodrigues, 83 pp.
- Queller, D.C., Goodnight, K.F. 1989. *Estimating relatedness using genetic markers*. Evolution 43: 258 – 275.

- Ramirez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F. 2008. *Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottlenecks With Recombination*. *Genetics*. 179 (1): 555 – 567.
- Raso, T.F., Werther, K. 2004. *Sexagem cirúrgica em aves silvestres*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56: 187 – 192.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. *GENEPOP: Population genetic software for exact tests and ecumenicism*. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. 2002. *1º. Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre*. Brasília, Brasil. Disponível em <http://www.rentas.org.br/trafico-de-animais/>
- Rice, W.R. 1989. *Analyzing tables of statistical tests*. *Evolution* 43: 223-225.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 752 pp.
- Ritland, K. 1996. *Estimators for pairwise relatedness and inbreeding coefficients*. *Genetics Research* 67: 175-186.
- Ritland, K. 1999. *Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding*. *Genetical Research* 67: 175-185.
- Robert, L & Simmons, B. 2010. *The History and Philosophy of Environmental Education*. In Bodzin, A.M., Klein, B.S., Weaver, S. (Eds). *The inclusion of Environmental Education in Science Teacher Education*. 3 - 16. New York, NY: Springer.
- Rollins, L.A., Browning, L.E., Holleley, C.E., Savage, J.L., Russel, A.F., Griffith, S.C. 2012. *Building genetic networks using relatedness information: a novel approach for the estimation*

- of dispersal and characterization of group structure in social animals*. *Molecular Ecology* 21: 1727-1740.
- Ruiz-Lopes, M., Roldan, E.R.S., Espeso, G., Gomendio, M. 2009. *Pedigrees and microsatellites among endangered ungulates: what do they tell us?* *Molecular Ecology* 18: 1352-1364.
- Russello, M.A., Calcagnotto, R., DeSalle, R., Amato, G. 2001. *Characterization of microsatellite locos in the endangered St. Vicent Parrot, Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes* 1: 162-164.
- Russello, M.A., Lin, K., Amato, G., Caccone, A. 2005. *Additonal microsatellite locos for the endangered St. Vicente Parrot, Amazona guildingii*. *Conservation Genetics* 6: 643-645.
- Russello, M.A., Saranathan, V., Buhrman-Deever, S., Eberhard, J., Caccone, A. 2007. *Characterization of polymorphic microsatellite locos for the invasive monk parakeet (Myiopsitta manachus)*. *Molecular Ecology Notes* 7: 990-992.
- Schuelke, M. 2000. *An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments*. *Nature Biotechnology*. 18: 233 – 234.
- Saidenberg, A.B. 2010. *Soltura e Reprodução de Amazona aestiva em Tremedal – BA*. Reintrodução de Psitacídeos 28-31.
- Seixas, S.G.H.F. & Mourão, G.M. 2000. *Assessment of restocking blue-fronted amazona (Amazona aestiva) in the Pantanal of Brazil*. *Revista Brasileira de Ornitologia* 8:73-78.
- Selkoe, K.A. & Toonen, R.J. 2006. *Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellites markers*. *Ecology Letters*. 9(5): 615 – 629.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 912 pp.
- Silva, H.C. 2006. *O que é divulgação científica?* *Ciência & Ensino*, v 1, n.1.

- Smith, T. B., & Bernatchez, L. 2008. *Evolutionary change in human-altered environments*. *Molecular Ecology*, 17(1), 1-8.
- Slatkin, M. 1995. *A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency*. *Genetics*. 139: 457 – 462.
- Souza, P.H.R. & Rocha, M.B. 2017. *Análise da linguagem de textos de divulgação científica em livros didáticos: contribuições para o ensino de biologia*. *Ciência & Educação*. 23: 321 – 340.
- Städele, V. & Vigilant, L. 2016. *Strategies for determining kinship in wild populations using genetic data*. *Ecology and Evolution*. 6 (17): 6107 – 6120.
- Straube, F.C., Uber-Filho, A., Kajiwarra, D. 2004. *Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná*. In: S.B. Mikichi & Bérnilis (Eds). Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná.
- Suzigan, W. & Albuquerque, E.M. 2011. *The underestimated role of universities for the Brazilian system of innovation*. *Brazilian Journal of Political Economy*, 1 (121): 3 – 30.
- Taylor, T.D., Parkin, D.T. 2007. *Characterization of 13 microsatellite locos for the Moluccan cockatoo, *Cacatua moluccensis*, and Cuban Amazon, *Amazona leucocephala*, and their conservation and utility in other parrot species (*Psittaciformes*)*. *Conservation Genetics* 8: 991-994.
- Tajima, F. 1989. *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism*. *Genetics* 585-595.
- Tautz, D. 1989. *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers*. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Urban-Filho, A., Straube, F.C., Carrano, E. 2008. *Papagaio-de-peito-roxo (Amazona vinacea)*. In: Machado, A.B.M., Drummond, G.M., Paglia, A.P. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira*

Ameaçada de Extinção. Brasília/Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas. v. 2.

Van de Casteele, T., Galbusera, P., Matthysen, E. 2001. *A comparison of microsatellite based pairwise relatedness estimators*. *Molecular Ecology*. 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.

Vargas, F.C., Faria, P.J., Guedes, N.M.R. 2001. *Incubação artificial, translocação e reintrodução de ninhegos de arara-azul (Anodorhynchus hyacinthinus) no Pantanal de Miranda – MS*. Em F.C. Straube, editor. *Ornitologia sem fronteiras*. Curitiba.

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

Wang, J. & Santure, A.W. 2009. *Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy*. *Genetics*. 181(4): 1579 – 1594.

Wang, J. 2011. *Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients*. *Molecular Ecology Resources* 11:141-145.

Warzecha, J., Fornal, A., Oczkiewicz, M., Bugno-Poniewierska, M. 2018. *A molecular characteristic of the Anatidae mitochondrial control region – a review*. *Annals of Animal Science*, 18(1), 3-15.

Weir, B.S., Anderson, A.D., Hepler, A.B. 2006. *Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges*. *Nature Reviews Genetics*. 7: 771 – 780.

- Witzenberg, K.A. & Hochkirch, A. 2011. *Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species*. *Biodiversity and Conservation*. 20: 1843 - 1861.
- Witzenberg, K.A. & Hochkirch, A. 2013. *Evaluating ex situ conservation projects: genetic structure of the captive population of the Arabian sand cat*. *Mammal Biology* 78: 379 – 382.
- Wright, S. 1978. *Variability Within and Among Natural Populations. Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Wright, T.F., Toft, C.A., Hoeflich, E.E., Elizondo, J.G., Albornoz, M., Ferraro, A.R., Surez, F.R., Sanz, V., Trujillo, A., Beissinger, S.R. 2001. *Nest poaching in neotropical parrots*. *Conservation Biology*. 710-720.

## ANEXO 1

**Tabela 1.** Dados dos espécimes de *Amazona vinacea* analisados. Registro da amostra do laboratório, número da anilha, sexo do animal e localidade do destino dos animais.

Registro Amostra	Anilha	Sexo	Localidade
V2	CWM 1269	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V5	VS RFA 4935293 10.0 0085	F	Zoológico Balneário – SC
V6	VS RFA 4935293 10.0 0086	M	Zoológico Balneário – SC
V7	VS RFA 4935293 10.0 0033	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V8	VS RFA 4935293 10.0 0034	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V9	VS RFA 4935293 10.0 0035	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V10	VS RFA 4935293 10.0 0049	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V11	VS RFA 4935293 10.0 0053	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V12	VS RFA 4935293 10.0 0054	F	Zoológico Balneário – SC
V13	VS RFA 4935293 10.0 0055	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V14	VS RFA 4935293 10.0 0056	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V15	VS RFA 4935293 10.0 0057	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V16	VS RFA 4935293 10.0 0058	F	Zoológico Gramado – RS
V17	VS RFA 4935293 10.0 0059	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V18	VS RFA 4935293 10.0 0060	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V21	VS RFA 4935293 10.0 0063	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V22	VS RFA 4935293 10.0 0064	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V23	VS RFA 4935293 10.0 0065	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V24	VS RFA 4935293 10.0 0066	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V25	VS RFA 4935293 10.0 0067	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V26	VS RFA 4935293 10.0 0068	M	Zoológico Gramado – RS

V27	VS RFA 4935293 10.0 0069	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V28	VS RFA 4935293 10.0 0070	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V29	VS RFA 4935293 10.0 0071	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V30	VS RFA 4935293 10.0 0072	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V31	VS RFA 4935293 10.0 0073	M	Zoológico Balneário – SC
V32	VS RFA 4935293 10.0 0075	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V33	VS RFA 4935293 10.0 0079	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V34	VS RFA 4935293 10.0 0081	F	Zoológico Gramado – RS
V35	VS RFA 4935293 10.0 0082	M	Zoológico Balneário – SC
V36	VS RFA 4935293 10.0 0084	F	Zoológico Gramado – RS
V37	VS RFA 4935293 10.0 0092	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V38	VS RFA 4935293 10.0 0089	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V39	VS RFA 4935293 10.0 0087	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V40	VS RFA 4935293 10.0 0088	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V41	3096	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V42	VS RFA 4935293 10.0 0096	F	Nascido – Parque Nacional das Araucárias – SC
V43	VS RFA 4935293 10.0 0099	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V44	Anilha PZMQB 1443 Escore 4 PV=350 grs	M	Zoo Sorocaba
V45	Anilha PZMQB 1450 Escore 2 PV= 300 grs	F	Zoo Sorocaba
V46	Anilha PZMQB 1355 Escore 4 PV=300grs	F	Zoo Sorocaba
V47	Anilha IBAMA ES 157 Escore 4 PV= 350 grs	M	Zoo Sorocaba
V48	Anilha PZMQB 1449 Escore 5 PV=350 grs	F	Zoo Sorocaba
V49	Anilha antiga ilegível Score 5 PV=340 grs	M	Zoo Sorocaba
V50	3408	M	Zoo Guarulhos
V51		F	Zoo Guarulhos
V52	963.007.000.033.997	M	Zoo Curitiba

V53	963.007.000.023.234	F	Zoo Curitiba
V54	963.007.000.026.631	F	Zoo Curitiba
V55	941.000.002.645.186	F	Zoo Curitiba
V56	963.007.000.031.646	M	Zoo Curitiba
V57	963.007.000.034.048	M	Zoo Curitiba
V58	Asa cortada	F	Zoo Curitiba
V59	Asa inteira	F	Zoo Curitiba
V60	982.000.123.169.055	F	Zoo Curitiba
V61	977.200.001.146.968	M	Zoo Curitiba
V62	977.200.001.239.434	F	Zoo Curitiba
V63	977.200.001.233.486	M	Zoo Curitiba
V64	Sem microchip	M	Zoo Curitiba
V65	9.630.070.000.348.890	F	Zoo Curitiba
V68	CDE 2005 017	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V69	CDE 2005 018	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V71	CDE 2005 025	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V72	CDE 2005 030	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V73	VS RDA 036	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V74	CDE 2005 352684 029	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V75	MFR 10.0 038	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V76	VSGPPSC 042	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V77	10 MM 064	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V78	CDE 05-06 070	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V79	CDE 05-06 071	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V80	CDE 05-06 072	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V81	CDE 05-06 077	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC

V82	CDE 05-06 080	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V83	CDE 05-06 081	F	CETAS – SC
V84	CDE 05-06 084	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V85	CDE 05-06 087	F	CETAS – SC
V86	CDE 08-09 352684 1138	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V87	LL OCR 40 212	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V88	LL OCR 40 213	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V89	OCR 10.0 0436	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V90	VS OCR 10.0 483	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V91	VS OCR 10.0 484	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V92	VS OCR 10.0 485	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V93	VS OCR 10.0 486	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V94	CDE 06-07 352684 793	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V95	CDE 08-09 352684 1144	F	CETAS – SC
V96	PCG ZOO SC 3164	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V97	PCG ZOO SC 3165	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V98	PCG ZOO SC 3177	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V99	PCG ZOO 3178	F	CETAS – SC
V100	PCG ZOO 3173	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V101	41039	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V102	VS RFA 4935293 10.0 00074 – 963008000453667	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V103	VS RFA 4935293 10.0 00076 – 963008000453462	F	CETAS – SC
V105	VS RFA 4935293 10.0 00078 – 963008000453464	M	CETAS – SC
V106	VS RFA 4935293 10.0 00080 – 963008000453457	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V107	VS RFA 4935293 10.0 00083 – 963008000453458	F	CETAS – SC
V108	VS RFA 4935293 10.0 00097 – 963008000453452	M	CETAS – SC

V109	VS RFA 4935293 10.0 00098 – 963008000453451	F	CETAS – SC
V110	VS RFA 4935293 10.0 00101 – 963008000495588	F	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V111	VS RFA 4935293 10.0 00102 – 963008000495586	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V112	VS RFA 4935293 10.0 00103 – 963008000495587	M	CETAS – SC
V113	VS RFA 4935293 10.0 00104 – 963008000495589	F	CETAS – SC
V114	VS RFA 4935293 10.0 00105 – 963008000495590	M	Reintrodução Parque Nacional das Araucárias-SC
V115	PB010	M	CETAS – SC
V117	963008000617396	M	CETAS – SC
V118	963008000617397	F	CETAS – SC
V119	963008000617399	F	CETAS – SC
V120	963008000617401	M	CETAS – SC
V121	963008000617402	F	CETAS – SC
V122	963008000617404	F	CETAS – SC
V123	963008000617405	F	CETAS – SC
V124	963008000617406	M	CETAS – SC
V125	963008000617407	F	CETAS – SC
V127	963008000617409	M	CETAS – SC
V128	963008000617410	F	CETAS – SC
V129	963008000617411	M	CETAS – SC
V130	963008000617412	F	CETAS – SC
V131	963008000617413	F	CETAS – SC
V133	963008000617415	F	CETAS – SC
V134	963008000617416	M	CETAS – SC
V135	963008000617417	F	CETAS – SC
V137	963008000617419	M	CETAS – SC
V139	963008000617421	M	CETAS – SC

V140	963008000617422	M	CETAS – SC
V141	963008000617423	F	CETAS – SC
V142	963008000617424	M	CETAS – SC
V143	963008000617425	M	CETAS – SC
V144	963008000617427	F	CETAS – SC
V147	963008000617430	M	CETAS – SC
V148	963008000617432	M	CETAS – SC
V149	963008000617433	M	CETAS – SC
V150	963008000617434	M	CETAS – SC
V151	963008000617435	F	CETAS – SC
V152	IEF100370	F	CETAS – SC
V1MG	963 008 000 394774	M	Fazenda Cachoeira – MG
V2MG	963 008 000 394762	M	Fazenda Cachoeira – MG
V3MG	963 008 000 394775	F	Fazenda Cachoeira – MG
V4MG	963 008 000 394763	M	Fazenda Cachoeira – MG
V5MG	963 008 000 394761	F	Fazenda Cachoeira – MG
V6MG	963 008 000 225893	F	Fazenda Cachoeira – MG
V7MG	963 008 000 225866	F	Fazenda Cachoeira – MG
V8MG	963 008 000 225877	F	Fazenda Cachoeira – MG
V9MG	963 008 000 225888	F	Fazenda Cachoeira – MG
V10MG	963 008 000 225846	M	Fazenda Cachoeira – MG
V11MG	963 008 000 225849	M	Fazenda Cachoeira – MG
V12MG	963 008 000 225899	M	Fazenda Cachoeira – MG
V13MG	963 008 000 225897	F	Fazenda Cachoeira – MG
V14MG	963 008 000 225882	M	Fazenda Cachoeira – MG
V15MG	963 008 000 225884	M	Fazenda Cachoeira – MG

V16MG	963 008 000 225847	F	Fazenda Cachoeira – MG
V17MG	963 008 000 225810	F	Fazenda Cachoeira – MG
V18MG	963 008 000 225865	M	Fazenda Cachoeira – MG
V20MG	963 008 000 225878	F	Fazenda Cachoeira – MG
V21MG	963 008 000 225853	F	Fazenda Cachoeira – MG
V22MG	963 008 000 225891	M	Fazenda Cachoeira – MG
V23MG	963 008 000 225871	M	Fazenda Cachoeira – MG
V24MG	963 008 000 225889	F	Fazenda Cachoeira – MG

---

## ANEXO 2

# Papagaio-de-peito-roxo

## Por que conservar?



Papagaio-de-peito-roxo/ Adriane Pinto Wasko (Editor). Botucatu, AgDC - IBB/UNESP. 2019. 28p. ISBN:

### Autores

Talita Roberto Aleixo de Almeida  
Flávia Torres Presti  
Vanessa Paes da Cruz  
Adriane Pinto Wasko

### Desenhos

Daiana Proença Bezerra  
Diogo Cristo da Silva e Silva

Contato: a.wasko@unesp.br

As imagens foram retiradas de sites onde os direitos autorais são livres. Este material é de caráter educacional e, portanto, sem fins lucrativos.

## APRESENTAÇÃO

Essa cartilha reúne informações sobre o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*). Ao folheá-la, você irá conhecer diferentes características biológicas dessa ave, como: morfologia, comportamento e ecologia.

Você também vai ver as principais ameaças que colocam os papagaios em perigo de extinção e as principais ações conservacionistas para protegê-los. Além disso, há um espaço para atividades didáticas.

Leia, aprenda e se divirta!

Boa leitura!

1

## OLÁ GALERINHA! TUDO BEM?

Primeiramente, eu gostaria de me apresentar a você...

Muito prazer! Meu nome é Kiko e estou muito empolgado para contar um pouco da história da minha vida e da minha espécie para você.



2

# Papagaios

Não sei se você percebeu, mas eu sou um papagaio. Isso mesmo PA-PA-GAI-O. Certo dia, eu estava bem tranquilo na minha árvore quando, de repente, ouvi um grupo de pessoas se aproximando e falando sobre mim bem baixinho. Elas falaram que eu pertencço a uma família de aves chamada **Psittacidae**.

Eu, assim como os outros papagaios, os periquitos e as araras, somos **psitacídeos** porque temos penas coloridas, bico forte e curvo, pés zigodáctilos (isto é, temos dois dedos para frente e dois dedos para trás) e conseguimos imitar vários sons. Legal né?



3



Eu sou muito conhecido como **papagaio-de-peito-roxo**

Mas eu também tenho um outro nome, sabia?

**Amazona vinacea**

↳ Esse é meu "nome científico"!

Tenho penas verdes na minha asa e em outras partes do meu corpo, penas azuis na nuca, penas vermelhas perto do meu bico e nas minhas asas e **penas roxas no meu peito**. Por isso eu recebi o nome de papagaio-de-peito-roxo!

Ah, e não é possível diferenciar quem é macho e quem é fêmea apenas olhando para nós. Isso porque somos muito parecidos. Os seres humanos não conseguem distinguir nossos sexos pela aparência e, por isso, dizem que não apresentamos **dimorfismo sexual**.

4

# Macho ou fêmea

Então, você deve estar se perguntando como é possível saber quem é macho e quem é fêmea!

O sexo de várias aves, como o papagaio-de-peito-roxo, pode ser identificado por meio de uma análise de DNA, chamada "**sexagem molecular**". Com essa técnica, analisa-se uma região do DNA que tem diferenças de tamanho entre machos e fêmeas.

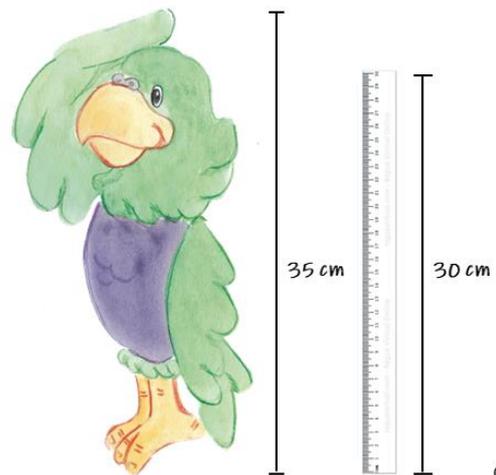
E sabe o que é muito legal? Isso não causa nenhum problema às aves. Precisa somente de uma pena de cada animal que pode ser retirada de sua asa.



5

# Tamanho

Eu, assim como outros indivíduos adultos da minha espécie, tenho 35 cm de comprimento. Imagine que sou um pouco maior que a régua que provavelmente você usa na escola.



6

## Distribuição

Nós, papagaios-do-peito-roxo, vivemos em vários estados do Brasil (do Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul), na **Mata Atlântica** que é um tipo de floresta tropical.



**Veja no mapa:**  
A área original da Mata Atlântica está em amarelo. Em verde, você pode ver o que sobrou dela atualmente.

Somos **endêmicos** desse tipo de floresta, o que significa que vivemos só na Mata Atlântica porque é somente ali que conseguimos nos alimentar, achar as árvores para fazer nossos ninhos e criar nossos filhotes.

7

## Alimentação

E falando em comida... Eu adoro variar a minha dieta. Gosto de comer frutas, flores, folhas e sementes, especialmente os deliciosos **pinhões** da árvore **araucária**.



araucária



pinhão

8

## Reprodução

Ah! Lembrei de algo muito interessante para contar para você! Se um macho de papagaio-de-peito-roxo encontrar uma fêmea de papagaio-de-peito-roxo e rolar aquela "química" entre eles, viverão juntos para sempre! Por isso, somos uma espécie **monogâmica** e, assim, conseguimos cuidar melhor dos nossos filhotes.



Depois que um casal se forma, procura um local para fazer um ninho - geralmente, em buracos de troncos de árvores.

Aí, a mamãe papagaio fica chocando os ovos por 25 dias. O papai papagaio é o responsável em buscar alimentos para sua companheira durante esse período.

9

## Filhotes

Quando termina o período de incubação dos ovos, os filhotinhos nascem e ficam no ninho por 60 dias recebendo os cuidados de seus pais. Eles só se separam dos pais após sete ou oito meses, quando se tornam independentes.



E sabe de outra coisa? Cada papagaio-de-peito-roxo pode viver aproximadamente **30 anos!**



10

## Ameaças

Bom, eu já falei muita coisa legal sobre a minha vida e da minha espécie. Mas agora eu preciso contar algo que não é bom. A minha espécie está em **perigo de extinção**. Isso significa que nós podemos desaparecer da natureza em pouco tempo, se as pessoas não nos ajudarem.

A principal ameaça à nossa sobrevivência é a destruição do lugar onde nós vivemos, chamado de habitat, por conta do **desmatamento** e das **queimadas**.



11

## Tráfico de animais

Há também muitas pessoas que capturam papagaios para vender ou colocar em gaiolas. Acho isso muito triste, pois vários papagaios morrem durante e após a captura devido aos maus tratos sofridos.

Eu já ouvi dizer que pegar animais na natureza e comercializá-los de forma ilegal é considerado crime. Isso é chamado de **tráfico de animais**!



12

## Conservação

Mas sabe de uma coisa? Apesar de tudo o que eu contei sobre as ameaças, tem muita gente legal por aí cuidando de mim, dos meus amigos e da meio ambiente.

Alguns colegas meus foram retirados ilegalmente da natureza mas, graças a denúncias à Polícia Ambiental ou ao Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), eles foram resgatados e levados a um **Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS)**.



Nos CETAS, os animais recebem cuidados para depois serem introduzidos na natureza

13

## Reabilitação

Quando um papagaio-de-peito-roxo é encaminhado para um CETAS, ele realiza vários exames clínicos e, se for considerado saudável, vai passar por um **processo de reabilitação** para voltar à natureza. Ou seja, ele vai ser treinado a voar, buscar alimentos, fugir de predadores e procurar abrigo.

Esse processo é realizado desde 2010 pelo **Instituto Espaço Silvestre**, organização não governamental, que reintroduz os papagaios-de-peito-roxo no **Parque Nacional da Araucárias** em Santa Catarina e assim contribui para a conservação da nossa espécie e da biodiversidade.



14

## Você pode nos ajudar!

Bom galerinha, eu adorei contar essa história para vocês e espero que tenham gostado também.

Ah, lembre-se que você pode nos ajudar! Se você souber de caça ou venda ilegal de animais, faça uma denúncia através da **linha verde do IBAMA: 0800 61 8080**. Além disso, repassem essas informações, conversem com seus amigos e sua família. Vamos juntos construir um mundo melhor!



15

## Para saber mais

Quando identificamos quais animais são machos e quais são fêmeas, é possível avaliar comportamentos biológicos específicos de cada sexo e parear corretamente casais para reprodução em cativeiro.

Assim, identificar corretamente o sexo das aves é muito importante em trabalhos de conservação, principalmente em espécies ameaçadas de extinção, como o papagaio-de-peito-roxo.

Sabe o que determina a formação de machos e fêmeas de espécies de aves, incluindo o papagaio-de-peito-roxo? Os chamados **cromossomos sexuais**! Cromossomos são moléculas de DNA super compactadas

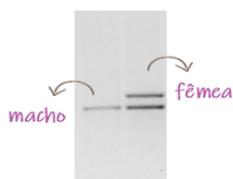


16

Nas aves, as fêmeas têm um cromossomo sexual chamado de Z e outro chamado de W. Os machos têm dois cromossomos sexuais do tipo Z.



Existe um pedacinho do DNA que compõe os cromossomos Z e W dos papagaios-de-peito-roxo que apresenta uma diferença de tamanho e, assim, por meio da "sexagem molecular", podemos distinguir fêmeas e machos.



**Análise de DNA mostrando diferenças entre os sexos**  
As fêmeas apresentam dois fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e os machos apresentam apenas um fragmento de DNA

17

Espero que tenha gostado!

E faça as atividades propostas a seguir!



18

## Atividades Didáticas

19

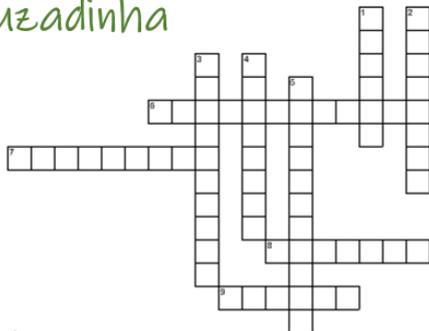
## Caça-palavras

**Papagaios-de-peito-roxo** pertencem ao grupo de aves conhecidas como **psitacídeos**, assim como as **araras** e os **periquitos**. Os papagaios-de-peito-roxo são encontrados em vários estados do Brasil (do Sul da **Bahia** até o **Rio Grande do Sul**) e são **endêmicos** da **Mata Atlântica**. Não apresentam **dimorfismo sexual**, ou seja, não é possível identificar machos e fêmeas por meio da visualização de características externas. São considerados predominantemente **monogâmicos**.

A X I X A P V A M O L L C B A R S I Q O  
 L O L M B Q R D C F N I E M S A B A C P  
 L C X S G U S B A H I A F Ç L B L K F L  
 A T R O A V T X Z H M H G J K Z Y I H U  
 U T P N R U M P A P S I T A C I D E O S  
 X W K H A O B O P Z X C A R E C C G Q O  
 E X J G R Q T P B B N M Ç A P H F H W D  
 S O I F A E D I C F W U L T S G J J E E  
 O Z P P O T N L E D E I K T I F K K R D  
 M O L F O R V J O P R O J A X D L L T N  
 S M W D I E C T I S E P H S Y S Z Ç Y A  
 I B Y X Y W X R Y A T D G D E A X Q U R  
 F V G S R Q Z E T Q Y U O F G P C W I G  
 R N H A H M N B V C X Z P I Q O V E O O  
 O B J O G A S S D F G H J K A I B R P I  
 M A C I T N Â L T A A T A M L G N T A R  
 I V K T R R P O I U T R E W Q Y A Y S J  
 D C L I A T U I O P A S D C V T M P D K  
 Ç F A A P P E R I Q U I T O S R P U A L  
 Z X P R M O N O V Q Z F N M W E O I F P

20

## Cruzadinha



### Vertical

1. A principal \_\_\_\_\_ ao papagaio-de-peito-roxo é a destruição de seu habitat devido a queimadas e desmatamento.
2. Os \_\_\_\_\_ de papagaio-de-peito roxo são cuidados pelos pais durante sete/bito meses.
3. Os papagaios, araras e periquitos pertencem ao grupo de aves conhecidas como \_\_\_\_\_.
4. \_\_\_\_\_ é o nome dado ao desaparecimento de espécies.
5. Os papagaios-de-peito-roxo são considerados \_\_\_\_\_.

### Horizontal

6. Medida de conservação adotada pelo Instituto Espaço Silvestre: \_\_\_\_\_.
7. A árvore \_\_\_\_\_ é principal fonte de alimento do papagaios-de-peito-roxo.
8. Esse alimento é conhecido como \_\_\_\_\_.
9. Alguns papagaios são colocados em \_\_\_\_\_ e vendidos através do tráfico de animais.

21

## Labirinto

Ajude o papagaio-de-peito-roxo chegar na Floresta das Araucárias.



22

# Criptograma

Descubra o enigma.

A	Á	B	C	D	E	É	F	G	H	I	J	K	L
€	£	¥	©	Σ	α	β	π	Ω	∞	μ	°	x	
M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
æ	≠	≥	•	ω	ζ	π	∪	∩	†	ℝ	ℕ	ℋ	

x Σ æ £ ζ Σ M Σ • Σ π € ζ  
 € ≠ ∞ æ € ∞ M ≠ € ≠ € ∪ ∩ ζ Σ ℋ €  
 Σ ¥ ≥ æ Σ ζ ¥ ∞ € x ∞ ℋ € x ≥ M  
 © Σ β ≥ ζ æ € ∞ x Σ π € x α  
 ¥ ζ ∞ æ Σ !

23

# Caça-palavras

A X I X A P V A M O L L C B A R S I Q O  
 L O L M B Q R D C F N I E M S A B A C P  
 L C X S G U S B A H I A F Ç L B L K F L  
 A T R O A V T X Z H M H G J K Z Y I H U  
 U T P N R U M P A P S I T A C I D E O S  
 X W K H A O B O P Z X C A R E C C G Q O  
 E X J G R Q T P B B N M Ç A P H F H W D  
 S O I F A E D I C F W U L T S G J J E E  
 O Z P P O T N L E D E I K T I F K K R D  
 M O L F O R V J O P R O J A X D L L T N  
 S M W D I E C T I S E P H S Y S Z Ç Y A  
 I B Y X Y W X R Y A T D G D E A X Q U R  
 F V G S R Q Z E T Q Y U O F G P C W I G  
 R N H A H M N B V C X Z P I Q O V E O O  
 O B J O G A S S D F G H J K A I B R P I  
 M A C I T N Â L T A A T A M L G N T A R  
 I V K T R R P O I U T R E W Q Y A Y S J  
 D C L I A T U I O P A S D C V T M P D K  
 Ç F A A P P E R I Q U I T O S R P U A L  
 Z X P R M O N O V Q Z F N M W E O I F P

25

# Respostas

24

# Cruzadinha

## Vertical

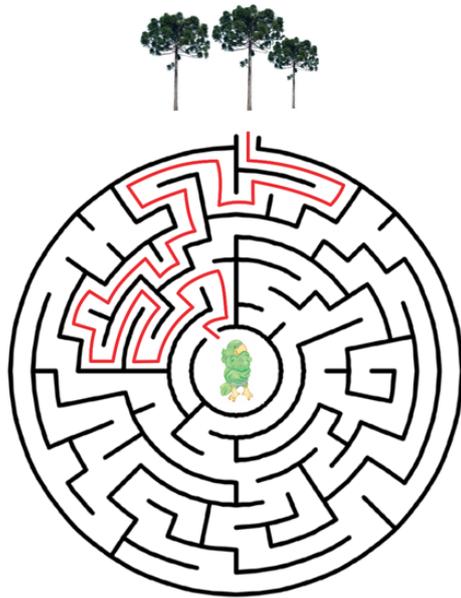
1. A principal **AMEAÇA** ao papagaio-de-peito-roxo é a destruição de seu habitat devido a queimadas e desmatamento.
2. Os **FILHOTES** são cuidados pelos pais durante sete/oito meses.
3. Os papagaios, araras e periquitos pertencem ao grupo de aves conhecidas como **PSITACÍDEOS**.
4. **EXTINÇÃO** é o nome dado ao desaparecimento de espécies.
5. Os papagaios-de-peito-roxo são considerados **MONOGÂMICOS**.

## Horizontal

6. Medida de conservação adotada pelo Instituto Espaço Silvestre: **REINTRODUÇÃO**.
7. A árvore **ARAUCÁRIA** é principal fonte de alimento do papagaios-de-peito-roxo.
8. Esse alimento é conhecido como **PINHÃO**.
9. Alguns papagaios são colocados em **GAIOLAS** e vendidos através do tráfico de animais.

26

## Labirinto



27

## Criptograma

**LEMBRE - SE PEGAR**

$\times \Sigma \text{æ} \text{£} \text{Z} \Sigma \quad \text{M} \Sigma \quad \bullet \Sigma \pi \text{€} \text{Z}$

**ANIMAIS NA NATUREZA**

$\text{€} \neq \infty \text{æ} \text{€} \infty \text{M} \neq \text{€} \neq \text{€} \text{U} \text{p} \text{Z} \Sigma \text{H} \text{€}$

**E COMERCIALIZÁ - LOS**

$\Sigma \text{¥} \geq \text{æ} \Sigma \text{Z} \text{¥} \infty \text{€} \times \infty \text{H} \text{€} \quad \times \geq \text{M}$

**DE FORMA ILEGAL É**

$\text{©} \Sigma \beta \geq \text{Z} \text{æ} \text{€} \infty \times \Sigma \pi \text{€} \times \alpha$

**CRIME**

$\text{¥} \text{Z} \infty \text{æ} \Sigma$

28

### REALIZAÇÃO

Agência de Divulgação Científica e Comunicação (AgDC)

Instituto de Biociências de Botucatu - IBB

Universidade Estadual Paulista - UNESP



### APOIO



REINTRODUÇÃO DO PAPAGAIO-DE-PEITO-ROXO: REABILITAÇÃO, SOLTURA E MONITORAMENTO



Processo no. 2015/16661-1

