



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Dissertação

**Prospecção de marcadores microssatélites, análise de
variabilidade e estrutura genética populacional da arara-azul-
grande *Anodorhynchus hyacinthinus* (Latham, 1790) com ênfase
na região do mosaico dos Carajás/PA**

Helder Elias da Silva



Versão Corrigida

Botucatu-SP

2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Prospecção de marcadores microssatélites, análise de
variabilidade e estrutura genética populacional da arara-
azul-grande *Anodorhynchus hyacinthinus* (Latham, 1790)
com ênfase na região do mosaico dos Carajás/PA**

Mestrando: Helder Elias da Silva

Orientador: Prof. Dr. Danillo Pinhal

Co-orientadora: Dra. Flávia Torres Presti

Versão Corrigida

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para a obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Genética)**

Botucatu-SP

2015

*Dedico essa dissertação a todos os biólogos conservacionistas
que dedicam suas vidas para tentar evitar que muitas espécies desapareçam.*

Agradeço:

Primeiramente a Deus, por ter me dado a vida e me amparado durante toda a vida, mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos os meus familiares, em especial aos meus pais e meu irmão por todos os ensinamentos e apoio durante todos esses anos.

Às minhas avós e ao meu avô que me deixaram muito cedo, mas nunca irei me esquecer dos momentos em que passamos.

Ao Prof. Dr. Danillo Pinhal pela orientação, oportunidade, paciência, incentivo e também por todas as conversas e broncas quando foi necessário.

À Dr. Flávia Torres Presti pela orientação, amizade, paciência, apoio e por todas as oportunidades recebidas.

A todos os professores da pós-graduação, graduação, cursinho, ensino médio e fundamental que de alguma forma contribuíram para minha formação para que eu pudesse chegar até aqui, com destaque para o PH que por sua vez fez com que eu me encantasse e escolhesse a biologia.

Aos Professores Ivan G. Maia e Sílvia M. Nishida por todas as contribuições como parte de minha banca examinadora do exame geral de qualificação.

A todas as pessoas do Laboratório de Genética e Evolução Animal do qual faço parte pelas conversas, risadas e incentivos, onde cada um contribuiu da sua maneira para a minha formação e crescimento pessoal: Valquíria, Prof^ª. Adriane, Prof^ª. Lígia, Talita, Bruna, Marcão, Messi, Pedro (Batata), Saskia, Bianca, Paula, Camila, Mix e Mariana.

A todos os colegas, professores e funcionários do departamento de Genética e de Morfologia pelas conversas e pela motivação e/ou pelo auxílio em etapas do meu projeto. Em especial para Vanusa e o Bruno pela ajuda em metodologias importantes do meu projeto.

À Prof^a Dr. Cristina Miyaki e aos integrantes do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelas amostras de sangue gentilmente cedidas para esse estudo.

A todos os integrantes do Projeto Arara Azul, principalmente ao Cézar (pelas conversas, ensinamentos e pelo treinamento de escalada em árvores), à Kalyenny e à Neiva Guedes pela oportunidade do estágio e pelo exemplo em idealizar um projeto de conservação tão importante.

À Grace por todas as conversas, ensinamentos e pela ajuda nas coletas das amostras.

A todo o pessoal do REGENEC pela oportunidade de debater e conhecer pessoas que atuam na área de Genética da Conservação e a todas as amizades feitas durante o Congresso (Hugo, Coni, María, Júlio, Victor, Pia, Sol, Thiony, Carolina, Andiara, Aline, entre outros).

Ao Sr. Luis sementeira, Mutum, Fred, Grace, Mayla, Fernando, Sr. Zé Galdino e todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na campanha de coleta de dados e de amostras na região dos Carajás.

Ao IBAMA pelas autorizações de coleta e transporte das amostras.

Ao ICMBio pelo apoio nos trabalhos envolvendo a arara-azul-grande.

Ao fotógrafo João Marcos Rosa pelas suas fotos sensacionais que puderam ser utilizadas nesse trabalho.

Ao CBMEG da UNICAMP e todos os seus integrantes, em especial à Prof^a Anete P. De Souza pela oportunidade de desenvolver parte da metodologia de meu trabalho através de uma disciplina teórico-prática.

Ao Maelson, Isa, Léo, Tamara, César, André, Pedro, Danilão, Higor, Rafa, Patrícia, Vinícius pela amizade, incentivo e força em todos os momentos.

À Biologia XLV integral, por todos os momentos que passamos juntos e pela contribuição na minha vida pessoal.

A todos os meus amigos das mais variadas jornadas da minha vida.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado no período de vigência do projeto.

À Vale por patrocinar e auxiliar financeiramente o projeto de conservação da arara-azul-grande no Carajás, na qual estou incluído.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

**"Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças"**

Charles Darwin

Resumo

A arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), maior psitacídeo do mundo, é uma espécie considerada em vulnerabilidade de extinção (IUCN) principalmente devido à perda de *habitat* e ao tráfico ilegal. Para estabelecer estratégias que visem a conservação da espécie considerar a composição genética de suas populações é muito importante. Comumente para o estudo da diversidade genética e estrutura genética populacional são utilizados marcadores moleculares que podem ser prospectados no genoma, dentre os quais destacam-se os locos microssatélites. Atualmente, entretanto, não há locos microssatélites polimórficos espécie-específicos identificados em *A. hyacinthinus*. Esta espécie pode ser encontrada em três regiões possivelmente isoladas, o que evidencia a necessidade de medidas de manejo integradas para a preservação do pool gênico da espécie. Assim, os objetivos principais desse trabalho foram: (i) desenvolver *primers* para locos microssatélites em *A. hyacinthinus*, e (ii) analisar a diversidade e a estrutura genética populacional da espécie. Como resultado seis locos espécie-específicos foram prospectados (AnH6, AnH10, AnH17, AnH33, AnH23 e AnH34), dos quais cinco mostraram-se polimórficos em *A. hyacinthinus*. Além disso, os seis pares de *primers* mostraram potencial aplicabilidade para estudos populacionais em outras sete espécies de psitacídeos neotropicais. Nas análises populacionais, *A. hyacinthinus* apresentou um baixo índice de variabilidade genética em comparação à reportada para outros psitacídeos. Esse resultado indica que a baixa variabilidade encontrada não deve ter relação com a utilização restrita de locos heterólogos em trabalhos anteriores, pois foram utilizados tanto locos espécie-específicos quanto locos heterólogos nas análises do presente estudo, sugerindo que esta é uma característica intrínseca da espécie. Além disso, considerando-se a análise de estruturação genética pelo agrupamento bayesiano dos dados de microssatélites, não foi encontrada estruturação genética entre subpopulações de quatro regiões [Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), Pará (PA) e nordeste (NE)]. Em contrapartida, os índices de R_{st} indicaram a existência de alta diferenciação genética entre PN e NE, além de moderada diferenciação genética entre PN e PS e entre PA e NE, baixa diferenciação entre PA e PS e ausência de diferenciação entre PS e NE. Entretanto, os valores dos índices de F_{st} evidenciaram, diferentemente ao R_{st} , moderada diferenciação encontrada entre os grupos PS e NE, entre PA e PS, e a ausência de diferenciação entre PA e NE. Nesse sentido, os *primers* desenvolvidos no presente trabalho e os dados da composição genética das subpopulações analisadas podem auxiliar na elaboração de programas de conservação e de planos de manejo para a arara-azul-grande.

Abstract

Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*), the largest parrot in the world, is considered vulnerable to extinction (IUCN) mainly due to *habitat* loss and illegal trade. To establish strategies for the conservation of the species must be regarded the genetic makeup of their populations. Commonly for the study of genetic diversity and population genetic structure are used molecular markers, highlighting specially the microsatellite loci, which in turn need to be isolated for population studies. However, currently there is no polymorphic microsatellite loci identified in *A. hyacinthinus*. Additionally, the species is distributed in three apparently isolated areas, thus requiring integrated management in order to preserve the gene pool of the species. Thus, the main objectives of this study were: (i) the development of *primers* for microsatellite loci in *Anodorhynchus hyacinthinus*, and (ii) the analysis of the diversity and population genetic structure of all areas of occurrence of the species. Six loci species-specific prospected were obtained (AnH6, AnH10, AnH17, AnH23, AnH33 and AnH34) and five of these primers proved to be polymorphic. In addition, these six pairs of primers showed potential applicability for population studies after they were tested in seven Neotropical parrot species. Regarding the population analyzes using both specific and heterologous loci, *A. hyacinthinus* presented a low level of genetic variability compared to other parrots, thereby indicating that the low variability found should not be related to the use of only heterologous loci in previous studies, suggesting that this is an intrinsic characteristic of this species. Moreover, considering in the analysis of genetic structure by Bayesian clustering of microsatellite data it could not be found genetic structure between subpopulations of four regions [North Pantanal (NP), South Pantanal (SP), Para (PA) and northeast (NE)]. In contrast, R_{st} indices indicated the existence of high differentiation between NP and NE and moderate genetic differentiation between NP and SP and between PA and NE and low differentiation between PA and SP, except for SP and NE. However, the values of F_{st} indexes evidenced (differently to R_{st}) moderate differentiation between the SP and NE groups and the PA and SP groups as well as none differentiation between the PA and NE groups. In that sense, the new primers for polymorphic microsatellite loci developed in the present work and the genetic screening of wild populations may help to support conservation programs and management plans for the Hyacinth macaw.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	10
Figura 2. Mapa da distribuição de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	10
Figura 3. Unidades de Conservação do Mosaico de Carajás.....	12
Figura 4. Ninho da arara-azul-grande em <i>Sterculia pruriens</i> (axixá).....	13
Figura 5. Análise biométrica de filhote de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	23
Figura 6. Locais da campanha de coleta de amostras no mosaico de Carajás/PA.....	24
Figura 7. Gráfico do agrupamento bayesiano para indivíduos do mosaico de Carajás.....	45
Figura 8. Gráfico do agrupamento bayesiano entre todas as subpopulações.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da amostragem total utilizada nas análises populacionais.....	25
Tabela 2. Lista dos primers heterólogos, <i>motifs</i> correspondentes, espécie e os autores que descreveram os <i>primers</i>	32
Tabela 3. Relação de amostras de <i>A. hyacinthinus</i> coletadas em campanha realizada durante a época reprodutiva da espécie na região do mosaico de Carajás no Pará.....	35
Tabela 4. Nomenclatura, sequência, <i>motifs</i> de repetição e parâmetros obtidos para cada <i>primer</i> espécie-específico sintetizado.....	40
Tabela 5. Caracterização dos locos microssatélites desenvolvidos para arara-azul-grande....	41
Tabela 6. Espécies testadas e resultados da amplificação cruzada para os seis <i>primers</i> desenvolvidos para arara-azul-grande.....	38
Tabela 7. Teste e caracterização dos <i>primers</i> heterólogos de <i>Ara chloropterus</i> em <i>A. hyacinthinus</i>	42
Tabela 8. . Informações sobre o número amostral (N), número de alelos (n), H_o e H_e para cada loco que foram utilizados para análises populacionais de <i>A. hyacinthinus</i>	43
Tabela 9. Análise da estruturação genética atribuída pelo índice F_{st} entre todas as regiões de ocorrência de <i>A. hyacinthinus</i>	44
Tabela 10. Análise da estruturação genética atribuída pelo índice R_{st} entre todas as regiões de ocorrência de <i>A. hyacinthinus</i>	44

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Biodiversidade.....	1
1.2. Principais ameaças à biodiversidade.....	2
1.3. Genética aplicada à conservação biológica.....	4
1.4. Aves.....	6
1.5. Os Psittacidae.....	6
1.6. A arara-azul-grande.....	8
1.7. Caracterização da área de estudo: o mosaico de Carajás.....	11
1.7.1. FLONAS (Florestas Nacionais) no mosaico de Carajás.....	12
1.7.2. Canaã dos Carajás.....	13
1.8. Marcadores microssatélites.....	14
1.9. Estruturação Genética.....	18
1.10. Motivações.....	19
2. Objetivos	22
2.1. Gerais.....	22
2.2. Específicos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Amostragem.....	23
3.2. Extração de DNA.....	24
3.3. Quantificação e análise da qualidade e integridade do DNA amostral.....	25
3.4. Construção de biblioteca enriquecida em microssatélites.....	26

3.5. Teste de amplificação e de polimorfismo.....	30
3.5.1. Locos desenvolvidos para <i>A. hyacinthinus</i>	30
3.5.2. Locos heterólogos.....	31
3.6. Amplificação cruzada em outras espécies de psitacídeos.....	33
3.7. Caracterização dos locos específicos e heterólogos.....	33
3.8. Análise de estruturação populacional.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Coleta de amostras.....	35
4.2. Análises das sequências candidatas a microssatélites.....	36
4.3. Caracterização dos locos específicos prospectados para <i>A. hyacinthinus</i>	36
4.4. Amplificação cruzada em outras espécies de psitacídeos utilizando <i>primers</i> desenvolvidos para <i>A. hyacinthinus</i>	37
4.5. Amplificação cruzada em <i>A. hyacinthinus</i> de <i>primers</i> desenvolvidos para outras espécies de psitacídeos.....	37
4.6. Análise da variabilidade genética.....	38
4.7. Estruturação genética.....	39
5. Discussão.....	43
5.1. Prospecção e caracterização dos marcadores microssatélites.....	46
5.2. Variabilidade genética.....	48
5.3. Estruturação genética.....	50
5.4. Implicações para conservação.....	55
6. Conclusões Gerais.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	60

1. Introdução

1.1. Biodiversidade

Biodiversidade, de acordo com o Artigo 2 da Convenção sobre Diversidade Biológica (MMA, 2002), pode ser compreendida como a variabilidade de todos os organismos vivos, abrangendo os ecossistemas terrestres, marinhos, e outros ecossistemas aquáticos, incluindo seus complexos, bem como a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas. Dessa maneira, o termo refere-se tanto à riqueza quanto à abundância relativa das diferentes categorias biológicas, incluindo a totalidade dos recursos bióticos, genéticos e de todos os seus componentes.

Segundo Mora et al. (2011), estima-se a existência de 8,7 milhões de espécies eucarióticas em todo o mundo, sendo que cerca de 86% das espécies existentes na Terra ainda necessitam ser descritas, ou seja, somente aproximadamente 1,24 milhões de espécies de eucariotos foram catalogadas até o momento. Considerando-se todos os países, apenas dezessete concentram aproximadamente 70% da biodiversidade conhecida do planeta. Dentre esses países, classificados como megadiversos, o Brasil apresenta uma das maiores taxa de biodiversidade do planeta concentrando ao menos 9,5% do número total de espécies identificadas com uma estimativa em torno de 170 a 210 mil espécies. Quando somadas as espécies ainda não descritas o país possui uma potencial estimativa de 13,1% da média da biota mundial, o que corresponde a cerca de 1,8 milhões de espécies (Lewinsohn & Prado, 2005).

O Brasil possui sete biomas, o Pantanal, o Cerrado, a Caatinga, os Pampas, a Mata das Araucárias, a Floresta Tropical Atlântica e a maior floresta tropical úmida do mundo (Amazônia). Esta última é considerada a maior reserva da diversidade biológica mundial. Entretanto, os dois biomas mais ameaçados atualmente e considerados *hotspots* de biodiversidade são a Mata Atlântica e o Cerrado. A definição de *hotspot* consiste em uma área com ao menos 1.500 espécies endêmicas de plantas, e que tenha perdido mais de 3/4 de sua vegetação original (Primack & Rodrigues, 2002). Estas áreas são consideradas prioritárias para a conservação pois caracterizam-se por abrigar um número enorme da diversidade biológica com um alto índice de endemismo de espécies, e encontram-se nas regiões mais devastadas do planeta. Por isso, o fator endemismo é chave, uma vez que as espécies restritas a uma determinada área estão mais vulneráveis à extinção do que aquelas distribuídas em diferentes áreas (Mittermeier et al., 1999). Assim, estima-se que, em conjunto, todos os 34 *hotspots* tropicais identificados mundialmente, abriguem cerca de 44% das espécies de

plantas, 28% das de aves, 30% das de mamíferos, 38% dos répteis e 54% dos anfíbios, embora ocupem uma área total que corresponde a apenas 1,4% da superfície terrestre (Mittermeier et al., 1999).

1.2. Principais ameaças à Biodiversidade

A extinção é um processo natural que ocorre em períodos de catástrofes ambientais, mudanças climáticas e alterações locais (introdução de animais exóticos, doenças, competição, etc.). A partir do século XVIII, na Primeira Revolução Industrial, a ciência ingressou em um constante processo de evolução, que desencadeou uma série de novas tecnologias que transformaram de forma rápida a vida do homem, sobretudo, no modo de produzir mercadorias. Com a crescente ocupação humana e o aumento no uso de combustíveis fósseis, os recursos naturais foram sendo utilizados de uma forma desordenada e o ambiente natural foi sendo progressivamente deteriorado. Dessa forma, do ano de 1600 até os dias atuais muitos organismos foram extintos na natureza.

Desde o surgimento da vida na Terra foram constatados cinco grandes episódios de extinção em massa de espécies, causados quase sempre por eventos naturais cataclísmicos, mas o nível de extinção provocada pelas atividades humanas atingiu um patamar que chega a superar a taxa natural de extinção das espécies. Calcula-se que uma média entre 100 e 1.000 espécies são extintas por século, sendo que a taxa de extinção de aves e mamíferos atualmente é de aproximadamente 10.000 espécies por século, superando em 100 a 1.000 vezes a taxa natural de extinção (Townsend et al., 2009). Com isso, as atividades humanas estão provocando um nível de extinções tão elevado que uma sexta grande extinção global está bem encaminhada (Pimm et al., 1997).

A principal causa da extinção de espécies é a destruição de seus *habitat* naturais pela ação antrópica (Primack & Rodrigues, 2002). Nesse contexto, os *habitat* tem sido afetados de três modos principais: (i) pelo desmatamento, provocado pelo desenvolvimento urbano ou industrial e para a produção de alimentos (agronegócio e pecuária) ou para outros fins como a exploração de madeira, (ii) pela degradação dos *habitat* através da poluição (lixo e poluentes atmosféricos) e (iii) pela perturbação direta através das mais variadas atividades humanas, como por exemplo o tráfico de animais.

Em relação ao desmatamento, as taxas atuais nos trópicos são de cerca de 1% ou mais por ano, e como consequência, mais da metade dos *habitat* dos animais silvestres foram destruídos na maioria dos países tropicais (Townsend et al., 2009). Além disso, os *habitat*

remanescentes disponíveis para as espécies ficaram mais fragmentados do que em épocas geológicas anteriores (fragmentação dos *habitat*). Esse processo pode contribuir para a extinção local de espécies, pois resulta na divisão da população original em uma metapopulação de subpopulações semi-isoladas (Townsend et al., 2009). Dessa maneira, esse processo, caso persista, pode culminar na diminuição do tamanho médio dos fragmentos, no aumento da distância entre os fragmentos e no chamado "efeito de borda" (Burgman et al., 1993) que podem levar a um empobrecimento na qualidade dos *habitat*. Nas bordas dos fragmentos (efeito de borda) os impactos da fragmentação sobre a diversidade das espécies são mais acentuados, pois as espécies que habitam o interior dos fragmentos encontram nas bordas *habitat* desfavoráveis para sobreviverem. Em contrapartida, espécies especialistas de bordas encontram *habitat* com condições mais favoráveis nessas regiões (Stouffer & Bierregaard 1995b, Brown & Hutchings 1997).

Do mesmo modo, a poluição pode afetar a biodiversidade de várias maneiras, desde a mudança climática local através dos gases poluentes emitidos por indústrias e automóveis até fenômenos como a chuva ácida que impacta direta e indiretamente a sobrevivência de várias espécies assim como o uso indiscriminado e continuado de pesticidas (Townsend et al., 2009). Em contrapartida, a perturbação dos *habitat*, embora muito menos grave que os fatores anteriores, pode afetar algumas espécies que são sensíveis ao simples contato provocado por atividades humanas como a recreação, o ecoturismo e a pesquisa em ambientes naturais (Townsend et al., 2009).

Além da perda de *habitat*, o tráfico ilegal de animais silvestres, por retirar animais da natureza, é uma das principais ameaças às espécies que possuem algum grau de ameaça de extinção. Essa modalidade de tráfico só é superada em movimentação de dinheiro pelo tráfico de drogas e o tráfico de armas (Giovanini, 2000).

O comércio ilegal de plantas, animais e seus subprodutos é considerado um comércio negro global e com crescente mercado, e conforme a Interpol, chega a movimentar mais de US\$ 20 bilhões por ano. No Brasil, estima-se que sejam retiradas anualmente cerca de 38 milhões de espécimes de animais pertencentes à biodiversidade brasileira (RENCTAS, 2001). Adicionalmente, algumas redes criminosas organizadas internacionais têm sido associadas ao tráfico de animais selvagens utilizando-se das rotas de contrabando de drogas para transportar ilegalmente animais selvagens através de fronteiras internacionais (Warchol, 2004). No Brasil, tem-se a estimativa de que pelo menos 40% de todos os embarques de drogas ilegais estejam associados ao tráfico de vida selvagem (Faiola, 2001). Além disso, o país encontra-se

em uma situação de risco nesse quesito, levando-se em consideração que, no ano de 2001, se encontrou no terceiro lugar entre os países com maior número de animais envolvidos no tráfico ilegal (Webb, 2001). Em consequência disso, o comércio de animais silvestres ilegal atrai os criminosos pois é tão ou mais rentável do que o tráfico de drogas ou de armas. Em contrapartida, nessa modalidade de crime a taxa de apreensão é menor e as penas aplicadas ao infrator são usualmente muito mais brandas para crimes de tráfico de animais selvagens quando comparado ao tráfico de drogas ou de armas (Alacs et al., 2009). Segundo a IUCN (2004) o tráfico de animais silvestres tem incidência estimada de 33% sobre mamíferos, 30% sobre aves e 6% sobre anfíbios que possuem algum grau de ameaça de extinção. Ao mesmo tempo, o tráfico atua como facilitador na introdução de espécies exóticas que podem levar doenças às espécies nativas (Smith et al., 2006) ou podem ocasionalmente tornar-se espécies invasoras (Weigle et al., 2005).

Além desses motivos, a introdução de espécies invasoras mediadas pelo homem podem ocorrer acidentalmente através do transporte através de navios, aviões, entre outros ou intencionalmente com a finalidade de controlar pragas, servir de alimento, produzir novos produtos agrícolas ou criar novas oportunidades recreativas (Townsend et al., 2009). Nesse sentido, a introdução de espécies exóticas é um dos grandes problemas que pode afetar diretamente a biodiversidade local, pois por não possuírem predadores naturais, podem expandir em número gradativamente. Caso se adaptem ao novo ambiente, essas espécies exóticas podem levar a um declínio das populações naturais por ameaçarem as espécies locais, muitas vezes endêmicas, ao obterem vantagem na competição pelos mesmos recursos (território, abrigo e alimentos). Dessa maneira, atualmente a invasão de espécies exóticas é a segunda maior causa de perda de biodiversidade em escala global, ficando somente atrás da destruição dos *habitat* (Pimentel et al., 2001).

1.3. Genética aplicada à conservação biológica

Com a finalidade de minimizar o impacto dessas ameaças é fundamental conhecer a biodiversidade de espécies e todas as interações entre elas. A Biologia da Conservação surgiu para tentar compreender os impactos da atividade antrópica sobre as espécies, as comunidades e os ecossistemas bem como criar formas práticas para prevenir extinções e para tentar a reintegração das espécies ameaçadas ao seu ecossistema funcional (Primack & Rodrigues, 2002). O estandarte principal da Biologia da Conservação é o estudo da diversidade biológica que pode ser compreendida em três níveis: espécies, variação genética e ecossistemas

(Primack & Rodrigues, 2002). Assim, a diversidade de espécies animais e vegetais por si só já merece ser conservada, dada sua importância para a alimentação e para a descoberta de novos medicamentos e, por extensão, para a manutenção da vida humana. Dentre os fatores que propiciam a diversidade dos organismos destaca-se a diversidade genética, sendo fundamental para proporcionar uma maior adaptação a um meio ambiente que sofre alterações constantes e para garantir o sucesso reprodutivo de espécies em longo prazo. Adicionalmente, a maioria das populações são impactadas por fatores genéticos antes de serem extintas (Spielman et al., 2004; Frankham, 2005).

Nesse contexto, a área de Genética da Conservação surgiu há cerca de 20 anos e tem sido fundamental para o estabelecimento de programas de conservação (Primack & Rodrigues, 2002). Essa área de estudo alia teoria e técnicas da genética buscando reduzir os riscos de extinção, sobretudo em espécies ameaçadas (Frankham et al., 2002). Os dados genéticos, quando combinados com estudos ecológicos, comportamentais e demográficos podem ajudar a melhorar o conhecimento sobre a biologia de espécies ameaçadas, de tal modo que devem ser usados para dar suporte a outras áreas do conhecimento (Sherwin et al., 2000). Nesse sentido, podem ser utilizados diretamente em diversas práticas de conservação, como para auxiliar programas de reprodução *in situ* e *ex situ*. A conservação *ex situ* pode ser utilizada para promover reservas demográficas ou genéticas, para incrementar populações naturais já existentes ou para estabelecer novas populações ou ainda para providenciar um refúgio para espécies que não possuem condições imediatas de sobrevivência na natureza (Townsend et al., 2009). A conservação *in situ* consiste em conservar a espécie no seu *habitat* específico, tentando diminuir os impactos antrópicos (Primack & Rodrigues, 2002). Além disso, existem ferramentas da genética molecular, como os marcadores moleculares, que possibilitam várias estratégias de estudo como: estimar a diversidade genética e possíveis diferenças entre populações, verificar a ocorrência de estruturação genética entre populações de uma mesma espécie, identificar espécies crípticas, identificar o sexo de espécies que não apresentam dimorfismo sexual aparente, traçar a filogenia molecular ou a filogeografia de um grupo específico de organismos, identificar unidades evolutivamente significativas e unidades de manejo e ainda identificar a origem geográfica de um indivíduo, dando suporte ao controle do tráfico ilegal de animais, plantas e de outros organismos (Miyaki, 2001; Solé-Cava, 2001; Presti, 2006; 2011; Gusmão et al., 2006; Tavares et al., 2006).

1.4. Aves

O Brasil é considerado um dos países mais ricos em espécies de aves no mundo, ao lado de Colômbia e Peru, com uma estimativa de 1.901 espécies (CBRO, 2014). Isso equivale à aproximadamente 57% das espécies de aves registradas em toda América do Sul, das quais mais de 10% são endêmicas do Brasil (Sick, 1997). Apesar disso, as intervenções humanas afetaram muitas espécies de aves que habitam os ecossistemas naturais brasileiros. Dessa forma, algumas espécies beneficiaram-se com as alterações dos seus *habitat* e conseguiram expandir suas populações a outras localidades antropizadas, como o bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*), enquanto outras até foram extintas da natureza como o mutum-do-nordeste (*Mitu mitu*) e a ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*). Nesse contexto, considerando-se a região neotropical, o Brasil é o país que apresenta o maior número de espécies de aves ameaçadas (Collar et al., 1997) sendo que os biomas com o maior número de espécies de aves e os maiores níveis de endemismo são a Amazônia (1.300 espécies e 20% de taxa de endemismo) (Mittermeier et al., 2003) e a Mata Atlântica (1.020 espécies e 18% de taxa de endemismo) (MMA, 2000) seguido pelo Cerrado (837 espécies e 4,3% de taxa de endemismo) (Silva & Bates, 2002). A caatinga vem logo depois com 510 espécies de aves e 2,9% de taxa de endemismo (Silva et al., 2003) e os Campos sulinos com 476 espécies e taxa de endemismo de 0,4% (MMA, 2000). Além disso, o Pantanal possui 463 espécies de aves, mas nenhuma espécie é considerada endêmica (Tubelis & Tomas, 2003) e aproximadamente 130 espécies de famílias tipicamente marinhas encontram-se nos ambientes costeiro e marinho, mas nenhuma delas são endêmicas do Brasil (Sick, 1997). Adicionalmente, 92% das aves brasileiras são consideradas espécies residentes, enquanto que apenas 8% são migrantes (Sick, 1997).

1.5. Os Psittacidae

Dentre as aves existentes destaca-se a Ordem Psittaciformes que compreendem aproximadamente 360 espécies distribuídas em 92 gêneros. Seus representantes mais conhecidos são as araras, papagaios, periquitos, maritacas, tiritas, cacatuas, calopsitas, entre outros (Sick, 1997; Collar, 1997; Rowley, 1997). A principal sinapomorfia compartilhada pelos táxons pertencentes a essa Ordem é a forma do bico, onde a maxila superior é curva e envolve a maxila inferior (Sibley e Alquist, 1990).

Os Psittaciformes encontram-se distribuídos praticamente por todo o globo com concentração das espécies nas zonas tropicais. Provavelmente, a partir desse centro de origem, as espécies se irradiaram até as áreas subtropicais e frias como a Patagônia (Sick, 1997).

Morfológicamente, suas características gerais são: cabeça larga e robusta com uma musculatura mandibular e lingual muito desenvolvida, bico alto e recurvado e maxila bem móvel, tornando-os especialistas para quebrar e descascar sementes. Além disso, possuem um tarso muito curto com o quarto dedo (dedo externo) deslocado para trás junto ao "hálux" (pé zigodáctilo) que auxilia na escalada de superfícies e na manipulação dos alimentos. Possuem uma visão apurada com duas foveas para focalizar imagem na retina. Adicionalmente, possuem plumagens com cores exuberantes e, no geral, apresentam ausência de dimorfismo sexual aparente (Sick, 1997).

A Ordem Psittaciformes é constituída por três famílias (Psittacidae, Strigopidae e Cakatuidae). Em nível taxonômico a família Cakatuidae atualmente abrange 21 espécies e caracteriza-se principalmente por possuir uma crista móvel e tamanho superior à maioria dos Strigopidae e Psittacidae. Além disso, as espécies estão restritas à região da Australásia (exceto a Nova Zelândia), estendendo-se desde as Filipinas e o leste da Indonésia até a Nova Guiné (White et al., 2011). Já a família Strigopidae é endêmica da Nova Zelândia constituída por três gêneros *Nestor*, *Strigops* e o fóssil *Nelepsittacus* (Christidis & Boles, 2008). Entretanto, com base em estudos filogenéticos recentes a família Psittacidae não é monofilética, mas pode ser considerada um grupo irmão dos gêneros *Strigops* e *Nestor* exclusivos da Nova Zelândia (Barrowclough et al., 2004).

Dentre os Psittacidae destacam-se as diversas espécies de araras, seus maiores representantes. As araras pertencem aos gêneros *Ara* e *Anodorhynchus* (Sick, 1997). O gênero *Ara*, compreende atualmente oito espécies (Collar, 1997; Oliveira-Marques, 2006) e *Anodorhynchus* três: *A. glaucus* (criticamente em perigo), apesar de ser considerada extinta por muitos pesquisadores por não ser avistada na natureza há mais de 60 anos e ainda por não ser mais encontrado exemplares em cativeiro, *A. leari* (ameaçada de extinção) e *A. hyacinthinus* (vulnerável à extinção) (IUCN, 2014). Estudos filogenéticos utilizando sequências nucleares e mitocondriais mostram que as araras provavelmente não formam um grupo monofilético (Tavares et al., 2006), uma vez que o gênero *Ara* é mais próximo filogeneticamente ao gênero que inclui a espécie *Nandayus nenday* (periquito-de-cabeça-preta) do que em relação ao gênero *Anodorhynchus*.

O Brasil apresenta representantes somente da família Psittacidae com uma estimativa de 86 espécies distribuídas em 26 gêneros (CBRO, 2014), o que torna o país o mais rico do planeta em número de espécies pertencentes a essa família. Essa riqueza de espécies ratifica a

denominação dada ao Brasil pelos portugueses, à época do seu descobrimento, de "Terra dos Papagaios" (Sick, 1997).

Entretanto, em termos populacionais os Psittacidae são um dos grupos que possuem o maior número de espécies ameaçadas de extinção (BirdLife International, 2000). A principal ameaça às espécies do grupo é a perda de habitat, embora haja outros fatores que influenciam decisivamente na redução populacional das espécies, tais como o tráfico ilegal de indivíduos, a introdução de espécies competidoras ou exóticas, a endogamia e o desmatamento das árvores utilizadas para nidificação (Juniper & Parr, 1998; Presti, 2011).

Com base neste cenário, tornam-se prioritários estudos que contribuam para o desenvolvimento de estratégias visando à conservação desse grupo de aves e sua sobrevivência em longo prazo.

1.6. A arara-azul grande

A arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) é considerada o maior representante da família Psittacidae, alcança até um metro de comprimento da ponta do bico à ponta da cauda e não apresenta dimorfismo sexual aparente (Sick, 1997; Guedes 1993). Além disso, os indivíduos podem ser considerados sedentários, isto é, permanecem no mesmo local praticamente o ano inteiro e não fazem grandes migrações. São aves com características muito conspícuas, sendo conhecidas por serem curiosas, vocalizarem bastante e apresentarem uma rara beleza, devido a sua cor azul cobalto e seu porte (Figura 1), além de serem altamente sociais, vivendo em família, grupos ou bandos (Guedes, 1993).

Com relação à estratégia reprodutiva, o sistema de acasalamento de *A. hyacinthinus* é predominantemente do tipo monogâmico social, tendo em vista que o acasalamento extra-par já tenha sido relatado na espécie e a confecção dos ninhos é um aspecto fundamental (Guedes, 1993; Presti, 2011). Nesse contexto, a arara-azul-grande não é capaz de iniciar uma cavidade para estabelecer um ninho, porém com a utilização do bico pode aumentá-la rapidamente, a partir de pequenas cavidades, geralmente iniciadas por espécies de pica-paus ou pela a quebra de um galho que expõe o cerne da árvore ou até mesmo iniciadas pela ação de fungos e cupins. Dessa maneira, podem ser denominadas "engenheiras ambientais", pois possuem a capacidade de confeccionar o seu próprio ninho, e por esta razão, podem auxiliar indiretamente 17 espécies que também utilizam as cavidades construídas pela arara-azul-grande para se reproduzir (Guedes, 1993). A maioria dos ninhos no Pantanal e no Pará são encontrados em apenas um gênero de árvore (*Sterculia*) e as espécies são *Sterculia apetala*

(manduvi) e *Sterculia pruriens* (axixá) respectivamente (Guedes, 1993; Pinho & Nogueira, 2003; Presti et al., 2009). Na região nordeste nidifica em paredões rochosos (Collar, 1997). A sazonalidade reprodutiva dos casais pode ser anual ou bianual (Guedes, 1993). No Pantanal, as fêmeas das araras-azuis-grandes podem colocar de 1 a 3 ovos (em média dois ovos), mas quase sempre só um dos filhotes consegue sobreviver, uma vez que a postura dos ovos é assincrônica, levando a uma alta taxa de eclosão dos ovos, mas em contrapartida ocasiona uma alta mortalidade dos filhotes (Guedes et al., 2000). Os filhotes são altriciais e permanecem nos ninhos sob cuidados parentais por volta de 107 dias (Guedes, 1993). A taxa de mortalidade é maior em recém-nascidos e diminui em conformidade com o crescimento dos filhotes. Assim, durante todo o período de crescimento são vulneráveis à predação (baratas, formigas carnívoras, tucano, gaviões, corujas, felinos, entre outros) e ao parasitismo (sarna, piolho, ácaros, entre outros) (Guedes et al., 2000). Depois de alçar voo os jovens ainda dependem dos cuidados parentais para conseguirem se alimentar até a separação definitiva dos pais que varia de 12 a 18 meses (Guedes, 1993). Adicionalmente, o nascimento de machos e fêmeas na natureza tem ocorrido próximo à proporção de 1:1 (Miyaki et al., 1999).

No Brasil, estima-se a existência de 6.500 indivíduos em vida livre (Anon, 2004) distribuídos em três regiões: no Pará (leste da região amazônica e oeste de Altamira), no nordeste do país (região de convergência entre Tocantins, Piauí, Maranhão e Bahia) e no Pantanal (Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), região na qual se encontra a maioria dos indivíduos (Collar, 1997; Guedes et al., 2008). Recentemente também foram constatados registros de indivíduos da espécie no noroeste de Minas Gerais e no nordeste de Goiás. (Birdlife International, 2013) (Figura 2).

No que tange à alimentação, a arara-azul-grande pode ser considerada uma espécie especialista, uma vez que a sua dieta se baseia quase que exclusivamente em frutos de palmeiras. Dessa forma, no Pantanal Matogrossense, a espécie consome o fruto de duas palmeiras: a bocaiúva (*Acrocomia totai*) e o acuri (*Scheelea phalerata*). Na região de encontro do Piauí, de Tocantins, do Maranhão e da Bahia, a espécie se alimenta do endosperma e do mesocarpo da piaçava (*Atalea funifera*) e do catolé (*Syagrus cearensis*). Já na região de Carajás e Altamira, o que se sabe até o momento é que a espécie se alimenta de inajá (*Maximiliana regia*), de babaçu (*Orbignya phalerata*), de tucum (*Astocarym sp*), de gueroba (*Syagrus oleracea*), de poucos frutos de acuri ou bacuri (*Scheelea phalerata*) e de macaúba ou bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) (Munn et al., 1989; Guedes, 1993; Presti et al., 2009).



Figura 1. *Anodorhynchus hyacinthinus*, a maior espécie de arara do mundo pousada sobre a abertura de um provável ninho localizado na região do mosaico de Carajás no Pará. Fotos: João Marcos Rosa



Figura 2. Mapa da distribuição de *Anodorhynchus hyacinthinus*. As regiões de cor cinza indicam os registros recentes de avistamento de indivíduos da espécie (adaptado Birdlife International, 2013).

Em virtude de apresentar esse conjunto de características biológicas intrínsecas supracitadas, *A. hyacinthinus* é naturalmente mais susceptível à mudanças do seu *habitat*, principalmente no que diz respeito à alteração de suas áreas de alimentação e dos seus sítios reprodutivos. De acordo com a BirdLife International (2014), a espécie é considerada ameaçada e está incluída na categoria "vulnerável à extinção". Além disso, considerando-se as três regiões de ocorrência da espécie, somente no Pantanal há um programa, denominado Projeto Arara Azul, que prima pelo monitoramento da espécie a longo prazo. Dessa maneira, quase tudo o que se sabe sobre a espécie foi estudado nessa região (Guedes, 2004), enquanto as demais áreas permanecem com pouca informação disponível.

1.7. Caracterização da área de estudo: o mosaico de Carajás

Embora no presente estudo tenham sido consideradas todas as regiões de ocorrência da espécie, uma ênfase maior foi dada à região do Pará em relação às demais por estar sob intensa pressão antrópica e pelo pouco conhecimento biológico disponível até o presente momento, especialmente no que diz respeito à composição genética dessa subpopulação. Além disso, como a coleta das amostras ocorreu no mosaico de Carajás segue adiante uma descrição detalhada dessa área de estudo.

Na região de Carajás, no estado do Pará, encontra-se o mosaico de florestas de Carajás que tem como principal cobertura florestal a “Floresta Ombrófila Densa Aberta” com variações locais, principalmente relacionadas a variações de relevo (Cavalcanti, 1986). Nessa região existe ainda uma peculiar cobertura vegetal: as áreas de canga, com fisionomias de savanas (Secco & Mesquita, 1983) também denominada “Savana Metalófila”, “Campo rupestre” ou simplesmente “Vegetação de canga”. Estão localizadas no alto da serra formando ilhas, entre as altitudes de 600 e 750 m e as áreas de mata são interrompidas por clareiras naturais onde há afloramento rochoso de ferro. Situado na mesma altitude dos platôs, a Savana Metalófila apresenta um regime térmico diferente. Durante o dia, a superfície recebe diretamente a incidência da radiação solar e a temperatura torna-se mais quente do que sobre a floresta. Durante a noite, a situação se inverte, pelo resfriamento mais rápido fazendo com que a temperatura destas áreas seja mais baixa na madrugada.

A Serra dos Carajás apresenta um clima tropical chuvoso tipo "Awi" (classificação de Köppen) com seca de inverno e forte período de estiagem coincidindo com o inverno do hemisfério sul e as precipitações flutuam entre 2.000 e 2.400 mm anuais. A temperatura média anual está em torno de 23°C a 25°C. O período mais quente do ano está no terceiro

trimestre (julho a setembro). O mês mais frio é fevereiro. A umidade relativa média está em torno de 80 %. O mês com menor precipitação é agosto.

1.7.1. FLONAS (Florestas Nacionais) no mosaico de Carajás

De acordo com o ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) a área de vegetação nativa contínua encontrada na região compreende um conjunto de terras reconhecidas por lei como áreas protegidas de diferentes categorias de Unidades de Conservação (UCs), denominado mosaico de Carajás. Este está representado pelas seguintes UCs: FLONAs de Carajás, Tapirapé-Aquiri e Itacaiúnas, Reserva Biológica (REBIO) de Tapirapé e Área de Proteção Ambiental (APA) do Igarapé Gelado. Adjunto a este conjunto de UCs encontra-se a terra Indígena Xikrin do Cateté (Figura 3).



Figura 3: Mapa mostrando as Unidades de Conservação do Mosaico de Carajás (ICMBio, adaptada).

Floresta Nacional é uma área com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em método para exploração sustentável de florestas nativas de acordo com a Lei Federal nº 9.985, de 18/07/2000.

Com base nesse cenário, no sudeste do Pará, a arara-azul-grande pode ser encontrada nessas áreas que são protegidas, sobretudo ao longo do rio Itacaiúnas que é limítrofe entre a FLONA Tapirapé-Aquiri e a FLONA Carajás, bem como em áreas bastante modificadas pela atividade antrópica como a FLONA Itacaiúnas.

1.7.2. Canaã dos Carajás

No entorno da Serra Sul na FLONA Carajás encontra-se o município de Canaã dos Carajás que nasceu a partir de um assentamento agrícola e sua economia se baseia na cultura do arroz, milho e feijão. Porém, sua população estimada em 31.062 habitantes (IBGE, 2013) usufrui da pecuária como o seu principal sustento e, portanto, praticamente toda a área do município foi desmatada dando lugar a plantações agrícolas e pastos (Figura 4).



Figura 4. Ninho da arara-azul-grande em *Sterculia pruriens* (axixá) encontrado dentro de uma propriedade rural em Canaã dos Carajás. Foto: Mayla Barbirato

Nesse município também encontram-se áreas particulares pertencentes à empresa VALE S.A., nas quais está sendo implantado o Projeto Ferro Carajás S11D. Esse é um projeto que visa implantar um complexo minerário na região da Serra dos Carajás, na subdivisão denominada Serra Sul, para exploração do minério de ferro do bloco D do corpo geológico S11 (S de Sul). Suas instalações estão situadas na área do município de Canaã dos Carajás no Pará e outra parte está situada em território da FLONA Carajás (VALE, 2012). Por essa razão, são necessários estudos que visem aliar o desenvolvimento econômico com medidas de conservação para essa região. Dentro desse contexto está inserida a arara-azul-grande que ocupa uma área que coincide com áreas desmatadas para pastagem e com cercanias das instalações do S11D. Assim, torna-se necessária a execução de pesquisas e monitoramento para demarcação de áreas prioritárias para a conservação da espécie nessa região.

1.8. Marcadores microssatélites

Marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões codificantes ou não codificantes do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Existem muitos tipos de marcadores moleculares que são utilizados de acordo com os objetivos de uma pesquisa. Um exemplo é a técnica de RAPD, onde um único *primer* que possui uma sequência arbitrária é utilizado para delimitar a reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificar regiões desconhecidas no genoma da espécie em estudo. Entretanto, para estudos que visam amplificar regiões mais específicas do DNA são utilizados pares de *primers* mais específicos como os marcadores mitocondriais, SNPs e microssatélites. Os marcadores em questão são baseados em polimorfismos nas regiões amplificadas que contêm as sequências do DNA. Por outro lado, os marcadores como o DNA mitocondrial que apresentam herança materna, e portanto, não possuem padrão mendeliano são utilizados principalmente para a elucidação de relações filogenéticas e da origem geográfica de uma espécie, estimação de tempo de expansão populacional e de distâncias genéticas, avaliação dos efeitos de dispersão preferencial sexo-específica em relações populacionais e discriminação de subpopulações (Awise, 1995; 2000; Harpending & Rogers, 2000, Eriksson et al., 2006). Em contrapartida, marcadores nucleares como os SNPs e os microssatélites são utilizados principalmente em estudos que visam determinar a composição alélica de uma população, permitindo a identificação de indivíduos e para testes de paternidade.

Adicionalmente, podem ser utilizados para estimar distâncias genéticas e discriminação de subpopulações (Garrigan & Hammer, 2006).

Os microssatélites são compostos por unidades de sequências de 1 a 6 pb repetidas em *tandem* (Tautz, 1989) e estão presentes tanto nas regiões codificantes quanto nas não-codificantes do genoma (Zane et al., 2002). Essas regiões genômicas são conhecidas por apresentarem na maioria das vezes o maior conteúdo de informação de polimorfismo dentre todos os marcadores moleculares (O'Reilly & Wright, 1995). Isso em função das altas taxas de mutação encontradas nos locos microssatélites em relação a outras partes do genoma, que variam de 10^{-2} a 10^{-6} por geração (Dallas, 1992; Dib et al., 1996; Sia et al., 2000; Weber & Wong, 1993).

Adicionalmente, esse tipo de marcador possui diversas características intrínsecas que facilitam a sua utilização, tais como pequeno tamanho total (100 pb), permitindo sua amplificação via PCR e apresentam um único loco padrão com herança co-dominante, o que permite a comparação de populações com base nas suas frequências alélicas (Bruford et al., 1996). Além disso, são também variáveis quanto ao número de repetições de suas sequências (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTRs).

Os microssatélites não são regularmente distribuídos no genoma e uma variação de sua distribuição ocorre dependendo do táxon analisado (Chambers & MacAvoy, 2000). De forma geral, estes são encontrados principalmente nas regiões não-codificantes do genoma, enquanto que nas regiões codificantes sua presença é relativamente rara (Li et al., 2002). Nesse sentido, nas regiões não-codificantes do genoma as sequências de microssatélites são abundantes e observa-se normalmente a ausência de pressão seletiva, sendo considerados marcadores genéticos neutros. Em contrapartida, nas regiões codificantes do genoma as sequências de microssatélites são relativamente escassas e observa-se a presença de pressão seletiva, sendo considerados marcadores genéticos funcionais, e por esta razão mutações nas sequências repetitivas dessas regiões comumente estão associadas às doenças (Li et al., 2004). Isso pode ser atribuído à forte seleção negativa contra mutações de *frameshift* nas regiões codificantes (Metzgar et al., 2000). Apesar disso, ao considerar regiões reguladoras do genoma, sobretudo nas regiões 5'UTRs e 3' UTRs, os microssatélites são mais abundantes do que em relação a outras regiões genômicas nas plantas e bactérias (Li et al., 2004).

Para tentar explicar a presença de repetições microssatélites nos genomas de todos os eucariotos foram propostos vários modelos. O modelo que melhor explica a maioria das mutações que acontece nos locos microssatélites é o *Stepwise Mutation Model* (SMM) (Ohta

e Kimura, 1973), em que o mecanismo de mutação de um alelo se resume na perda ou no ganho de apenas uma unidade de repetição. Outro modelo, o *Two phase mutation model* (TPM) (Di Rienzo et al., 1994), incorpora o processo mutacional que ocorre no SMM, embora também considera a ocorrência de mutações de uma magnitude maior. Nesse modelo, uma vez que a mutação ocorreu têm-se uma probabilidade p de ser uma mutação considerada de uma única etapa, e uma probabilidade de $1-p$ de ser uma mutação considerada multi-passo (apresenta vários passos). Adicionalmente, têm-se o modelo de alelos infinitos (Kimura & Crow, 1964) que considera um cenário extremo que as mutações pode proporcionar infinitas possibilidades de estados alélicos para um determinado loco. Entretanto, um novo estado alélico inexistente na população é considerado para cada novo alelo mutante que possa aparecer.

As principais aplicações desse tipo de marcador são estudos forenses, em estrutura genética de populações e em conservação e/ou gestão de recursos biológicos, análises de paternidade e construção de mapas genéticos (Jarne & Lagoda, 1996). Nesse contexto, conhecer a diversidade genética torna-se importante para garantir a preservação de uma espécie, principalmente em populações que se encontram dispersas e/ou fragmentadas (Primack & Rodrigues, 2002). Entretanto, para organismos que apresentam uma frequência muito baixa de microssatélites no genoma, como as aves ou as plantas (Primmer et al., 1997; Zane, 2002) torna-se necessário um grande número de locos microssatélites, principalmente em estudos para avaliar as distâncias genéticas entre as populações (Parker et al., 1998; Cooper et al., 1999). Portanto, a utilização desses marcadores é bastante informativa para genotipagem de indivíduos de uma população e para a caracterização da sua diversidade, embora sejam marcadores neutros e, portanto, não podem ser utilizados para inferir as pressões por seleção natural que atuam diretamente sobre as populações.

Em contrapartida, a principal limitação desse marcador é o fato de que precisam ser isolados, sendo que na maioria das espécies não há microssatélites prospectados (Zane et al., 2002). Para que isso seja possível, geralmente a prospecção de sequências candidatas a microssatélites envolve o desenvolvimento de bibliotecas genômicas, que podem ser enriquecidas ou não, com posterior clonagem e sequenciamento dos fragmentos. Em razão disso, todo o processo de prospecção trata-se de um trabalho laborioso e de elevado custo. Dessa forma, utiliza-se muitas vezes *primers* desenvolvidos para uma espécie filogeneticamente próxima da espécie de interesse (*primers* heterólogos), a fim de reduzir o custo e o tempo das pesquisas (Parker et al., 1998). Além disso, não há garantia de que o alto

polimorfismo observado para uma espécie será encontrado em espécies relacionadas, uma vez que os níveis de polimorfismo normalmente diminuem quanto maior é a distância filogenética entre as espécies em questão (Presti, 2011).

Atualmente existem alguns poucos estudos que isolaram microssatélites em Psittaciformes (Presti & Wasko, 2014). Um deles descreveu oito pares de *primers* que possuem locos polimórficos de microssatélites para *Forpus passerinus* (Hughes et. al., 1998). Outros autores desenvolveram *primers* para dezesseis locos de microssatélite para *Amazona guildingii* (Rusello et. al., 2001, 2005). Caparroz et al. (2003) desenvolveram seis locos para *Ara ararauna* enquanto Adcock et al. (2005) desenvolveram 10 locos polimórficos para *Eclectus roratus* e Martins (2008) isolou seis locos polimórficos para *Ara chloropterus*. Adicionalmente, Chan et al. (2005) caracterizaram 8 *primers* polimórficos para *Cyanoramphus forbesi*, enquanto Kamara et al. (2006) isolou 12 locos polimórficos para o periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*). Além disso, Taylor & Parkin (2007a) desenvolveram 12 *primers* para locos microssatélites em *Psittacus erithacus*, enquanto Taylor & Parkin (2007b) caracterizaram cinco locos microssatélites em *Cacatua moluccensis* e oito locos em *Amazona leucocephala*. Russello et al. (2007) encontraram 12 locos microssatélites polimórficos para a caturrita (*Myiopsitta monachus*), enquanto que Gebhardt & Waits (2008), desenvolveram e testaram *primers* internos para vários locos microssatélites que já foram desenvolvidos para outros psitacídeos. Finalmente, Klauke et al. (2009) caracterizaram sete locos microssatélites polimórficos para a aratinga-da-Patagônia (*Cyanoliseus patagonus*), ao passo que Pillay et al. (2010) isolou 19 locos microssatélites em *Poicephalus robustus* e Miller et al. (2012) isolou utilizando-se de sequenciamento de última geração 14 locos microssatélites polimórficos para *Neophema chrysogaster*.

Dessa forma, como não há descrição na literatura de *primers* para locos microssatélites em *A. hyacinthinus*, o objetivo desse estudo foi desenvolvê-los para a utilização em estudos populacionais e para auxiliar em medidas de conservação da espécie. Adicionalmente, os *primers* desenvolvidos nesse trabalho foram testados quanto à amplificação cruzada em outras espécies de psitacídeos neotropicais.

A prospecção de locos microssatélites específicos representa uma estratégia bastante promissora para estimar a variabilidade genética da espécie. Nesse sentido, estudos que visem investigar a diversidade e estrutura genética de populações da arara-azul-grande, através do uso de microssatélites, serão importantes para auxiliar em planos de manejo e aumentar o conhecimento biológico da espécie.

1.9. Estruturação Genética

Fatores como deriva genética, seleção natural e mutação podem causar alterações nas frequências alélicas e genotípicas entre populações isoladas, de tal maneira que, a longo prazo, estas populações podem acumular mudanças selecionadas positivamente e que culminam, por vezes, no surgimento de uma nova espécie (Ridley et al., 2006). Nesse sentido, o isolamento geográfico promovido pelo surgimento de barreiras, pela fragmentação do habitat ou pela ausência de um habitat específico pode reduzir o deslocamento de indivíduos, dificultando o encontro entre as populações, o que tende a acentuar diferenças genéticas já existentes entre as mesmas. Em contrapartida, o fluxo gênico favorece a homogeneização da composição genética, o que pode reduzir diferenças genéticas existentes entre populações (Crochet, 1996). Desse modo, espécies que possuem mecanismos físicos ou biológicos para se dispersarem eficientemente e ausência de filopatria (tendência de retornar ao local de origem para a reprodução) comumente apresentam elevadas taxas de fluxo gênico e, por conseguinte, uma homogeneização na composição alélica de suas populações. Entretanto, espécies que possuem fatores físicos ou biológicos que limitam sua dispersão e uma alta filopatria, frequentemente apresentam baixos níveis de fluxo gênico entre suas populações (Presti, 2011). Essa condição pode favorecer a fixação de alelos preferenciais para cada população por meio da seleção natural ou deriva genética (Slatkin, 1987). Com isso, populações que apresentam fluxo gênico quase nulo podem apresentar adaptações genéticas locais que se perderiam caso fosse feito um manejo conjunto de suas subpopulações, principalmente em espécies que se encontram ameaçadas de extinção e que já perderam boa parte de sua variedade genética por terem sido afetados por processos como a endogamia ou sofrido um gargalo populacional recente. Desse modo, é fundamental estudar a diferenciação genética entre subpopulações de uma espécie e verificar se as mesmas se encontram estruturadas.

Em estudos de populações naturais, a identificação da estrutura genética pode ser realizada a partir da utilização dos coeficientes de endogamia descritos por Wright (1951) F_{is} , F_{st} e F_{it} . Esses coeficientes são baseados nos níveis de heterozigosidade presentes no indivíduo, na subpopulação e na população total, respectivamente. O F_{it} corresponde à endogamia total da espécie ou desvio de panmixia da população total (devido ao sistema reprodutivo somado ao subdivisão populacional). Já o F_{is} corresponde à endogamia intrapopulacional ou ao desvio da panmixia dentro da subpopulação (devido somente ao sistema reprodutivo). Finalmente o F_{st} corresponde à endogamia devido à subdivisão

populacional (independe do sistema reprodutivo). Por outro lado, o F_{st} é baseado no modelo de alelos infinitos que consiste na criação aleatória de um novo alelo a partir de uma mutação, ou seja, ao aplicar esse modelo para os locos microssatélites as mutações são as responsáveis por alterar o número de unidades de repetições (Oliveira et al., 2006). Todavia, o índice R_{st} é análogo ao F_{st} , embora considere nas análises o modelo de mutação *stepwise mutation model* (perda ou ganho de uma repetição de nucleotídeo por vez) para explicar a evolução dos microssatélites (Slatkin, 1995).

Apesar da importância do conhecimento da estruturação genética populacional em psitacídeos neotropicais, poucos estudos são encontrados na literatura. Leite et al. (2008) analisaram a estrutura genética entre cinco populações de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e a diferenciação populacional pode ser detectada apenas entre as populações mais distantes entre si, enquanto que Caparroz et al. (2009) estudaram o padrão de estruturação genética populacional da arara-canindé (*Ara ararauna*) através de marcadores microssatélites e mitocondriais encontrando um padrão de dispersão diferencial entre os sexos com o macho dispersor responsável pelo fluxo gênico e com a fêmea apresentando um comportamento filopátrico. Por outro lado, Oliveira-Marques (2010) estudou a estruturação genética entre subpopulações de duas espécies (*Ara macao* e *Ara chloropterus*) e encontrou uma baixa estruturação para ambas. Adicionalmente, Faria et al. (2008) e Presti (2011) analisaram a estrutura genética populacional em arara-azul-grande utilizando locos de microssatélites heterólogos e uma amostragem restrita (destacado no próximo tópico).

Nesse contexto, estudos que visem investigar os níveis de variabilidade genética e de estruturação genética em *A. hyacinthinus* são importantes na tentativa de um melhor entendimento dos processos evolutivos atuantes na história recente da espécie bem como para auxiliar em estratégias de conservação.

1.10. Motivações

Estudos da história natural têm mostrado que as araras-azuis-grandes são filopátricas (retornam para o local de origem para a reprodução) (Guedes, 2004) e mesmo tendo uma ampla capacidade de voo aparentemente deslocam-se pouco (Antas, comunicação pessoal). Dessa maneira, acredita-se que qualquer espécie com tamanho populacional reduzido tenha perdido parte de sua variabilidade genética (Frankham et al. 2002). A arara-azul-grande está inserida nesse contexto uma vez que se encontra em uma situação de vulnerabilidade à extinção e possui populações dispersas em diferentes áreas de ocorrência da espécie. Para

estudar as características genéticas de uma população são amplamente utilizados marcadores moleculares. Dentre eles destacam-se os marcadores microssatélites. Entretanto, existem poucos estudos realizados que utilizam esses marcadores para a *A. hyacinthinus*. Entre eles destacam-se Faria et al. (2008) que analisaram a estrutura genética populacional da arara-azul-grande entre subpopulações do Pantanal de Miranda e Abobral/MS e do Piauí e Presti (2006) que através dos valores de F_{st} obtidos a partir de seis locos polimórficos heterólogos encontrou diferenciação genética entre quatro grupos estudados (Pantanal Norte, Pantanal Sul, Norte e Nordeste). Neste mesmo trabalho foi realizado o teste de atribuição para tentar atribuir indivíduos apreendidos de *A. hyacinthinus* para a sua correspondente região de ocorrência bem como foram calculados os índices de similaridade genética de filhotes pertencentes ao mesmo ninho para indicar monogamia genética.

Além desses trabalhos, Presti (2011) obteve uma moderada estruturação genética entre indivíduos de quatro regiões geográficas (Pantanal norte, Pantanal sul, norte e nordeste) por meio dos índices de R_{st} e da análise bayesiana dos dados de microssatélites heterólogos enquanto que os índices de F_{st} e do DNA mitocondrial evidenciaram diferenciação genética entre três regiões (norte e nordeste não diferenciados). Somando a isso, foi indicada a origem de indivíduos apreendidos e de procedência desconhecida além da análise da similaridade genética entre pares de filhotes.

Todos esses estudos utilizaram apenas locos microssatélites heterólogos, tendo em vista que ainda não há locos específicos descritos na literatura para essa espécie. Dessa maneira, o desenvolvimento de locos específicos para a espécie é estratégico para auxiliar em análises populacionais da espécie em conjunto com locos heterólogos e também para detectar possíveis diferenças significativas de eficiência entre eles. Além disso, populações que apresentam baixa variabilidade genética necessitam de mais locos disponíveis para obter melhores resultados, principalmente em análises de estruturação genética entre populações.

Com isso, devido ao aparente isolamento da espécie em essencialmente três grupos geográficos somado às características intrínsecas de cada região, como relevo, vegetação e clima, diferenças na composição genética podem ser encontradas dependendo de cada região. Também, a região foco desse estudo, o mosaico de Carajás, não foi avaliada por estudos prévios quanto a uma possível diferenciação populacional em função do relevo bastante acidentado desta região e à presença de extensas áreas de florestas, que potencialmente podem constituir uma barreira ao deslocamento de indivíduos. Assim, o conhecimento sobre como as populações estão estruturadas geneticamente e o nível de variabilidade que

apresentam é fundamental na busca por um melhor entendimento da história evolutiva e pela preservação da espécie em longo prazo na natureza, principalmente em regiões de risco como o mosaico de Carajás no Pará.

2. Objetivos

2.1. Gerais

- ✓ Desenvolver *primers* para locos microssatélites em *Anodorhynchus hyacinthinus*.
- ✓ Analisar a diversidade e a estruturação genética populacional entre todas as regiões geográficas de ocorrência da espécie.

2.2. Específicos

- Testar a amplificação cruzada para outras espécies de psitacídeos neotropicais através dos locos prospectados para a arara-azul-grande.
- Analisar a eficiência dos locos microssatélites prospectados em comparação aos locos heterólogos utilizados para estudos populacionais em *A. hyacinthinus*.
- Verificar a variabilidade genética intra e interpopulacional em *A. hyacinthinus*.
- Verificar a possível ocorrência de estruturação genética entre indivíduos de *A. hyacinthinus* na região do mosaico de Carajás.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem

Para o registro de indivíduos da espécie foi utilizado o método de busca ativa. Tal método consistiu em percorrer trilhas e estradas que passavam pela área de estudo, com auxílio de binóculos procurando por indivíduos da espécie ou por vestígios, como restos de alimentação e atividades recentes nos ninhos.

Os ninhos foram acessados através da técnica de alpinismo com auxílio de estilingue, chumbada, linhas de nylon, corda fina, cordas de alpinismo, fitas de ancoragem, cadeirinhas, colete, mosquetões, oito e ascensores.

Para as análises genéticas, foram coletadas amostras de sangue de filhotes encontrados em ninhos naturais. Foi coletado aproximadamente 0,1ml de sangue periférico da veia braquial da parte inferior da asa de cada filhote, utilizando seringas e agulhas descartáveis. Após a coleta, as amostras de sangue foram transferidas para microtubos contendo aproximadamente 0,5 ml de etanol absoluto e mantidos à temperatura ambiente. Depois da triagem, os filhotes foram devolvidos ao ninho com segurança (Figura 5).

A campanha de coleta das amostras em campo correspondente à época reprodutiva da espécie (agosto a dezembro) foi realizada entre os dias 23 de setembro e 24 de outubro de 2013. Os trabalhos de campo se concentraram na cidade de Canaã dos Carajás, na FLONA Itacaiúnas e ao longo da mata ciliar do rio Itacaiúnas que estabelece o limite entre a FLONA do Carajás e a FLONA do Tapirapé-Aquiri (Figura 6). Para as análises populacionais foram incluídas amostras coletadas em campanhas anteriores cedidas para o presente trabalho (Tabela 1).



Figura 5. Filhote de *A. hyacinthinus* passando por uma análise biométrica que inclui medições do bico, cauda, papo e asa, pesagem, anilhamento e coleta de sangue. Foto: João Marcos Rosa.



Figura 6. Locais da campanha de coleta de amostras no campo no período reprodutivo de *A. hyacinthinus* no mosaico de Carajás no Pará. A) FLONA Itacaiúnas (Foto: Grace Ferreira da Silva), B) propriedade rural localizada na cidade de Canaã dos Carajás (Foto: Grace Ferreira da Silva) e C) Rio Itacaiúnas (Foto João Marcos Rosa).

3.2. Extração de DNA

O DNA foi isolado seguindo o protocolo de extração utilizando proteinase K e fenol-clorofórmio segundo Bruford et al. (1992). Foram misturados 300 µl de TNE (50 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de EDTA, pH 7,5), 30 µl de Tris HCl 1M pH7,5, 8 µl de SDS 25% e 20 µl de proteinase K (20mg/ml) e acrescentado aproximadamente 2mm² de sangue. O material foi incubado a 37°C durante a noite ou a 55°C por 4 horas. Após a incubação, foi acrescentado um volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), sendo posteriormente misturado e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. A fase superior foi retirada com micropipeta e transferida para um tubo novo. Foram adicionados dois volumes de etanol absoluto e o tubo foi invertido para precipitar o DNA. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado por cinco minutos a 12000 rpm. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 300 µl de etanol a 70% e centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm. Depois de descartado o sobrenadante, o precipitado foi seco *overnight* a temperatura ambiente e ressuspenso em água miliQ autoclavada.

Tabela 1. Dados da amostragem total utilizada nas análises populacionais do presente trabalho.

Subpopulação	Localização	N	Coletor	Ano
Pará (N=33)	Rio Itacaiúnas	1	G.F. Silva, H.E. Silva	2013
	Canaã dos Carájas	2	G.F. Silva, H.E. Silva	2013
		14	F.T. Presti, A. Marques	2007-2008
	Redenção	1	-	-
	Rio Iriri	1	-	-
	Serra Norte	1	-	-
	Pq. Zoobotânico (Parauapebas)	6	G.F. Silva, H.E. Silva	2013
		2	F.T. Presti, A. Marques	2007
		2	-	-
	Fundação Zoobotânica (Marabá)	1	F.T. Presti, A. Marques	2007
	Capitão Poço (Zoológico Dr. Aldomar)	1	-	-
?	1	-	-	
Pantanal Sul (N=7)	Abrobal	3	N.M.R. Guedes	-
	Nhecolândia	2	N.M.R. Guedes	2001-2002
		1	N.M.R. Guedes	-
	Rio Negro	1	N.M.R. Guedes	2001-2002
Pantanal Norte (N=9)	Barão do Melgaço	5	P. Antas	2002-2004
		4	-	2008
Nordeste (N=6)	São Gonçalo de Gurgueia, PI	2	P. Martuscelli, C. Yamashita.	1999
	Região de Peixes e Estreito ,TO	4	-	-
Total		55		

Legenda: ? Procedência da amostra não disponível; - dados não encontrados

3.3. Quantificação e análise da qualidade e integridade do DNA amostral

A quantificação e a verificação de contaminação para todas as amostras de DNA obtidas foram analisadas através do equipamento NanoDrop 1000 (Thermo-Scientific, EUA). Esse equipamento quantifica o pool total de DNA contido em cada amostra individual, além de verificar se há contaminação por proteínas e/ou solventes orgânicos como álcool/clorofórmio/fenol, através da comparação das razões de absorbância da luz na faixa de 260/280nm e 230/280nm, respectivamente.

3.4. Construção da biblioteca enriquecida em microssatélites

A metodologia utilizada para a construção da biblioteca enriquecida em microssatélites utilizando *beads* magnéticas foi a mesma descrita por Billotte et al. (1999), com algumas modificações. Para os procedimentos foi utilizada amostra de sangue coletada na região do Pará cedida pelo Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A seguir estão descritas todas as etapas necessárias em sequência:

Purificação da amostra

Para fazer a purificação da amostra foi feito um tratamento com RNase após a extração do DNA e utilizado uma pequena quantidade do DNA extraído com a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix) para fazer a digestão, eliminando as possíveis impurezas da amostra.

Digestão do DNA

A digestão do DNA genômico total foi realizada com a enzima de restrição *Afa I* (Invitrogen) para gerar fragmentos menores do DNA cujo sítio de restrição é a sequência 5'...GT↓AC...3. Para cada reação foram utilizados os seguintes reagentes:

- 50 µl de água MilliQ autoclavada
- 10 µl de tampão
- 10 µl de espermidina (40 mM)
- 5 µl da enzima *Afa I* (10 u/µL)
- 25 µl de DNA em uma concentração de 250 ng/µl

Posteriormente, cada tubo de 1,5 ml contendo os reagentes foram incubados por 3h a 37°C em estufa. Para a obtenção de um melhor resultado, foi incubado primeiramente por 1h metade do volume da enzima (2,5 µl) e posteriormente foi adicionado igual volume da enzima para terminar o processo de incubação por mais 2h. Em seguida, foi realizado aplicações de cada tubo em gel de agarose a 1% para visualizar qual deles apresentou a melhor digestão. Para isso, o parâmetro utilizado foi a reação que apresentou um arraste uniforme entre 700 e 1200pb.

Ligação dos Adaptadores

Em seguida, foram utilizados os adaptadores Rsa21 (5'-CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA-3') e Rsa25 (5'-TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A-3') ligados aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta com a enzima T4 DNA ligase a fim de garantir que todos os fragmentos tivessem uma terminação única e conhecida. Para essa reação foram utilizados os seguintes reagentes para um tubo de 0,6 ml:

- 12 µl de água MilliQ
- 5 µl de tampão 5X (Invitrogen)
- 1,5 µl de Rsa21 (10µM)
- 1,5 µl de Rsa25 (10µM)
- 2 µl de T4 DNA ligase (Invitrogen) (1u/µL)
- 3 µl do produto de DNA digerido

Depois de adicionar os reagentes o tubo foi colocado no termociclador e incubado por cerca de 2h a 20°C. Posteriormente, Rsa21 foi utilizado como *primer* para uma pré-amplificação via PCR a fim de garantir a ligação dos adaptadores e produzir uma maior quantidade de DNA para a etapa de seleção.

Purificação

Para preparar o DNA para a etapa de seleção de fragmentos de interesse foi utilizado o kit Quiaquick PCR purification (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante.

Seleção dos fragmentos que contém as sequências microssatélites

Para a seleção dos fragmentos de DNA contendo sequências microssatélites foram utilizadas esferas magnetizadas (*beads*) cobertas por estreptavidina, a qual apresenta alta afinidade pela biotina. Assim, os fragmentos digeridos foram hibridados através de repetições de dinucleotídeos (GT e CT) ligados quimicamente à biotina, selecionando fragmentos contendo sequências repetitivas do tipo CA e GA por complementariedade. Em seguida, por meio do emprego de um aparato com ímã promoveu-se a separação e recuperação apenas dos fragmentos que continham essas sequências, através da atração das partículas magnéticas. Além disso, para aumentar a eficiência das *beads* foi realizada uma série de lavagens utilizando soluções de SSC diluídas em diferentes concentrações dependendo da etapa. A

solução 0,5 X foi utilizada para a preparação das *beads*, enquanto a solução 20 X foi utilizada como solução de hibridização dos dinucleotídeos biotinizados e a 0,1 X foi utilizada para ressuspender a solução de hibridização após magnetização das *beads*. Para a solução de SSC 20X utilizou-se de 87,7g de NaCl e 44,1g de Citrato Trisódico Di-hidratado para completar 500 mL de H₂O MilliQ.

Finalmente, as sondas e as partículas magnéticas foram retiradas permanecendo apenas fragmentos de fita única, contendo as sequências repetitivas. Em seguida, foi realizada uma reação de PCR convencional para amplificar os fragmentos selecionados.

Clonagem

No passo seguinte, os fragmentos foram ligados a um vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), o que permitiu gerar grande número de cópias do fragmento do DNA alvo. Para essa reação foram necessários 5 µl de tampão 2X, 1 µl de plasmídeo pGEM-T, 3 µl do produto de amplificação e 1 µl de DNA ligase para completar 10 µl de reação. Posteriormente o produto foi incubado *overnight* a 4°C ou por no mínimo 12h.

Eletroporação

Para a transformação foi utilizado o método de eletroporação em células competentes de *Escherichia coli* (XL1-Blue), plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina, tetraciclina, IPTG e X-Gal. Em seguida, foram incubadas e invertidas a 37 °C por 18 horas em estufa para o crescimento das colônias. Os clones recombinantes foram selecionados diretamente, através da atividade do gene da β-galactosidase (Lac Z). Quando o gene foi expresso (colônia azul) significa que estes clones não foram ligados ao vetor de clonagem e, portanto, devem ser excluídos.

Manutenção dos clones

Para manter o banco de microsatélites para análises posteriores, foram utilizadas placas ELISA com fundo em U ou tubos *ependorf*, sendo colocado em um meio de cultura composto por diversos reagentes que permite o correto crescimento e conservação dos clones denominado 2YT-HMFM com a ampicilina contida respectivamente em cada poço. As colônias brancas foram repicadas individualmente com a ajuda de palitos estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight*, armazenadas em freezer -20°C por 30 minutos e transferidas para freezer -80°C.

Amplificação dos fragmentos clonados

Para comprovar que os clones continham os insertos foi realizada uma reação de PCR com o seguinte programa no termociclador: 95°C por 4 min, 30 ciclos a 94°C por 30s, 52°C por 45s e 72°C por 1 min e 30s e 72°C por 8 min. Para essa reação foram necessários: 13,25 µl de água MilliQ, 2,5 µl de tampão 10X, 2,0 µl de MgCl₂ (25mM), 2,0 µl de dNTP (2,5mM), 1,25 µl de Rsa21 (10µM), 2,0 µl de Taq DNA polimerase e 2,0 µl do inserto clonado para completar um total de 25 µl de reação.

Extração plasmidial

Depois, foi realizada a extração plasmidial utilizando o método da lise alcalina (Birboim & Doly, 1979) e testado o protocolo do kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) para alguns clones, com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para preparo das amostras a serem sequenciadas. Posteriormente, através de pré-coloração por GelRed™ (Biotium) foi feita eletroforese em gel de agarose a 1%, a fim de visualizar de 2 a 4 bandas de tamanhos diferentes entre as amostras a fim de comprovação do sucesso dessa etapa.

Reações de Sequenciamento

Os DNA plasmidiais foram sequenciados conforme indicado para o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, CA, USA). Para a obtenção dos insertos dos clones da biblioteca utilizou-se os primers T7 e SP6 e o sequenciamento foi realizado no sequenciador ABIPrism 3500xL (Applied Biosystems). Para essa reação foram necessários: 3,1 µl de água MilliQ, 2 µl de tampão Save Money, 0,4 µl de Big Dye (v3.1), 0,5 µl de *primer* (5pmol/µl) e 4,0 µl de DNA (200 a 500ng para completar um total de 10 µl de reação). O programa no termociclador foi: 95°C por 1 min, seguido de 26 ciclos (95°C por 20s, 50°C por 20s e 60°C por 4 min). Posteriormente foi feita a purificação das amostras com EDTA/Etanol para eliminar interferentes ou excessos de reagentes provenientes da reação de sequenciamento.

Análises das sequências

Para a identificação, caracterização das regiões de microssatélites e exclusão das sequências do clone e dos adaptadores para cada fragmento foi utilizado o programa Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd.). Posteriormente, utilizou-se o programa Chromatogram Explorer (Heracle BioSoft) para exportar as sequências finais obtidas em formato FASTA. Após esse

procedimento verificou-se no VecScreen (NCBI) - banco de dados que permite a comparação de sua sequência com sequências de vetores – com o propósito de confirmar se a sequência amplificada era semelhante a do vetor de clonagem. Para gerar a sequência consenso (obtida pela comparação das sequências geradas pelos primers T7 e SP6) foi utilizado o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). No site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> verificou-se através da ferramenta Blast se cada sequência obtida possuía similaridade com sequências de organismos filogeneticamente relacionados. Sequências semelhantes à de organismos distantes filogeneticamente poderiam indicar contaminação da colônia ou ausência de especificidade do fragmento amplificado, não devendo ser selecionadas.

Selecionadas as sequências, utilizou-se o programa SSRIT (Temnykh et al., 2001) para encontrar as regiões contendo microssatélites em cada fragmento analisado. Os programas Primer3 plus (Untergasser et al., 2007) e PerlPrimer v1.1.21 (Marshall, 2004) foram utilizados para o desenho dos *primers* para cada fragmento contendo as repetições de microssatélites. O programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) foi utilizado para mensurar todas as propriedades de cada *primer* e para verificar a ocorrência de hairpins (formação de grampo na estrutura do primer), self-dímeros (pareamento entre primers homólogos) e heterodímeros (pareamento do *primer* senso com o *primer* antisenso).

3.5. Teste de amplificação e de polimorfismo

3.5.1. Locos desenvolvidos para *A. hyacinthinus*

Para o teste de amplificação e da melhor temperatura de anelamento dos *primers* desenvolvidos para *A. hyacinthinus* as condições utilizadas na PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 45°C a 65°C (9 temperaturas) por 40 seg, 72°C por 40 seg, e extensão final de 72 °C por 10 min. Cada reação possuía: 0,2 µl de Taq polimerase (5 U/ µl), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTPs (2,5 mM), 1,2 µl de tampão (10x), 1 µl de DNA e água para completar 12 µl. As temperaturas de anelamento testadas para cada *primer* foram: 45°C, 53°C, 55°C, 57°C, 59°C, 60°C, 61°C, 63°C e 65°C. Aproximadamente 3 µl do produto amplificado foi carregado em gel de agarose a 1,5% para testar a amplificação.

Para a detecção do polimorfismo dos locos foi utilizado o método proposto por Schuelke (2000) para gerar os produtos de amplificação via PCR e o sequenciador 3100 ou 3500 Dx Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para detectar o tamanho dos alelos.

Para evitar erros de genotipagem, pelo menos, uma amostra controle foi utilizada para a confirmação dos tamanhos dos picos dos alelos para cada sequenciador. Cada reação continha 0,1 µl de Taq polimerase (5 U/ µl, Pharmacia), 0,1 µl do *primer forward* marcado com cauda M13 (10 µM), 0,3 µl do *primer reverse* (10 µM), 0,2 µl da fluorescência HEX (10 µM), 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTPs (4 mM), 1,2 µl de tampão (10x), 1,5 µl de DNA e água miliQ autoclavada para completar 12 µl. As condições da PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 57°C a 60°C por 40 seg e 72°C por 40 seg, seguidos de 10 ciclos da cauda M13 a 95°C por 1 min, 55°C por 40 seg e 72°C por 40 seg, e extensão final de 72 °C por 10 min.

3.5.2. Locos heterólogos

Para testar a amplificação cruzada e o nível de polimorfismo em amostras da arara-azul-grande foram utilizados os *primers* heterólogos desenvolvidos para arara-vermelha (*Ara chloropterus*) (Martins, 2008). Os *primers* de arara-canindé (*Ara ararauna*) (Caparroz et al., 2003; Gebhardt & Waits, 2008), papagaio-de-São-Vicente (*Amazona guildingii*) (Russello et al., 2001) e papagaio-do-congo (*Psittacus erithacus*) descritos por Taylor & Parkin (2006a) já foram anteriormente testados quanto a amplificação e o polimorfismo em Presti (2006; 2011).

Assim, para os *primers* de *Ara chloropterus* (Ach8, Ach9, Ach10, Ach14 e Ach15) foi padronizada a temperatura de 56°C para anelamento dos *primers*. O termociclador Mastercycler® pro (Eppendorf) foi utilizado para as reações de PCR com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguido de 10 ciclos da cauda M13 a 94 °C por 30 seg, 53°C por 45 seg e 72°C por 45 seg e extensão final de 72 °C por 10 min e término a 4 °C. Cada reação continha 0,2 µl de Taq polimerase (5 U/ µl), 0,5 µl de cada *primer* e da cauda M13 (10 µM), 0,3 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,8 µl de dNTPs (2,5 mM), 1,0 µl de tampão (10x), 1 µl de DNA (aproximadamente 20 ng/µl) e água miliQ para completar 10 µl.

Todavia, a técnica de genotipagem proposta por Schuelke (2000) foi realizada no sequenciador 3100 ou 3500 Dx Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para 11 *primers* desenvolvidos para espécies filogeneticamente próximas, sendo que seis deles (UnaCT21, UnaCT32, UnaCT43int, UnaCT74, AgGT19 e Peeµ16) também já tinham sido testados quanto ao polimorfismo (Presti, 2006; Presti, 2011) (Tabela 2). Para esse conjunto de *primers* cada reação possuía 4 µl de GoTaq® Hot Start (Promega), 0,2 µl do *primer forward*

com cauda M13 (10 μ M), 0,6 μ l do *primer reverse* (10 μ M) e 0,4 μ l da fluorescência HEX ou FAM (8 μ M), 1 μ l de DNA (20ng/ μ l) e água miliQ autoclavada para completar 10 μ l.

Tabela 2. Lista dos primers heterólogos, *motifs* correspondentes, espécie e os respectivos autores que descreveram os *primers*.

Primer	Motif	Espécie	Autor
Ach8	(AGAT) _n	<i>Ara chloropterus</i>	Martins, 2008
Ach9	(AC) _n	<i>Ara chloropterus</i>	Martins, 2008
Ach10	(GTG) _n	<i>Ara chloropterus</i>	Martins, 2008
Ach14	(GT) _n ...(GTTT) _n	<i>Ara chloropterus</i>	Martins, 2008
Ach15	(GACA) _n (CA) _n	<i>Ara chloropterus</i>	Martins, 2008
Peep16**	(AC) _{x16}	<i>Psittacus erithacus</i>	Taylor & Parkin, 2006a
AgGT19**	(AC) _{x16}	<i>Amazona guildingii</i>	Russello et al., 2005
UnaCT21*	(AC) _{x9}	<i>Ara ararauna</i>	Caparroz et al., 2003
UnaCT32*	(AC) _{x9}	<i>Ara ararauna</i>	Caparroz et al., 2003
UnaCT41int**	(GT) _n (ATGTT)(GT) _n	<i>Ara ararauna</i>	Gebhardt & Waits, 2008
UnaCT43*	(TG) _{x12}	<i>Ara ararauna</i>	Caparroz et al., 2003
UnaCT55*	(GT) _n (AT) _n	<i>Ara ararauna</i>	Caparroz et al., 2003
UnaCT74*	(TG) _{x12}	<i>Ara ararauna</i>	Caparroz et al., 2003

Legendas: *Testado em Presti, 2006; ** Testado em Presti, 2011.

Em contrapartida, para Ach8, Ach9 Ach10, Ach14 e Ach15 a temperatura padronizada para esse conjunto de *primers* foi de 56°C e cada reação continha 4 μ l de GoTaq® Hot Start (Promega), 1 μ l do *primer forward* marcado com cauda M13 (8 μ M), 1 μ l do *primer reverse*

(2 μ M), 1 μ l da fluorescência FAM (8 μ M), 1,2 μ l de DNA (aproximadamente 20 ng/ μ l) e 3,6 μ l de água miliQ para completar 10 μ l de reação. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 52°C a 58°C por 30 seg e 72 °C por 40 seg, seguidos de 8 ciclos da cauda M13 a 95 °C por 40 seg , 53°C por 40seg, 72 °C por 40 seg, e extensão final de 72 °C por 10 min.

3.6. Amplificação cruzada em outras espécies de psitacídeos

Para o teste de amplificação cruzada para amostras de outras espécies de psitacídeos (*Amazona guildingii*, *Amazona ochrocephala*, *Ara severus*, *Ara macao*, *Ara ararauna*, *Ara chloropterus* e *Anodorhynchus leari*) as condições utilizadas na PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 min, 10 ciclos a 95°C por 1 min, *touchdown* de 60°C decrescendo a cada ciclo 0,5°C e 72°C por 40 seg, seguidos de 25 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 40 seg e 72°C por 40 seg, e extensão final de 72°C por 10 min. Cada reação possuía 0,2 μ l de Taq polimerase (5 U/ μ l), 1 μ l de cada *primer* (10 μ M), 0,4 μ l de MgCl₂ (25 mM), 1 μ l de dNTPs (2,5 mM), 1,2 μ l de tampão (10x), 1 μ de DNA e água para completar 12 μ l. Aproximadamente 3 μ l do produto amplificado foi carregado em gel de agarose a 1,5% para testar a amplificação.

3.7. Caracterização dos locos específicos e heterólogos

Após a checagem do produto quanto à quantidade e à qualidade, cerca de 0,2 μ l do marcador molecular GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD (Applied Biosystem) (2fmol) e uma alíquota de 1,0 μ l de cada amostra amplificada foram misturados a Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems®) para completar 10 μ l de reação. A mistura foi analisada em sequenciador automático ABIPrism 3100 e 3500 (Applied Biosystems®). Para analisar os picos e obter os tamanhos dos fragmentos repetitivos para cada alelo foi utilizado o software GeneMarker V2.6.3 (Softgenetics). A verificação do número de alelos por loco, do desequilíbrio de ligação entre os locos, da heterozigidade esperada (He), da heterozigidade obtida (Ho) e do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi obtida pelo programa Genepop 4.2 (Raymond & Rousset, 1995). O programa Cervus (Field Genetics) foi utilizado para estimar o PIC (conteúdo de informação polimórfica) de cada loco. Para avaliar a presença de alelos nulos, erros de genotipagem e *allele dropout* foi utilizado o programa Micro-checker (Brookfield, 1996).

3.8. Análise de estruturação populacional

Para a análise da estrutura genética populacional foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.3 (Prichard et al., 2000) para inferir o número de populações (k) que melhor explica os dados através de um método de agrupamento bayesiano baseado na composição alélica dos locos microssatélites. Os parâmetros utilizados nas análises foram 5.000 passos de *burn-in* e 1.000.000 de interações de MCMC. Cada simulação foi repetida 20 vezes como recomendado por Evanno et al. (2005). Diferentes probabilidades *a priori* para a ocorrência de populações (k variando de 1 a 10) foram testadas para inferir a ocorrência de agrupamento populacional. 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 número atribuído de subpopulações nas análises foi quatro correspondente ao número das regiões que são provenientes os indivíduos amostrais (Pantanal Sul, Pantanal Norte, Nordeste e Pará), o grau de diferenciação entre elas foi avaliado pela estimativa dos índices de fixação F_{st} e R_{st} . Os valores de F_{st} e R_{st} podem variar de 0 a 1. Quanto mais próximo de 1 implica um considerável grau de diferenciação entre as populações. Os valores de F_{st} foram estimados de acordo com Weir & Cockerham (1984), através da análise da variância molecular (AMOVA) das frequências gênicas observadas entre as diferentes populações com base no modelo de mutação de alelos infinitos (Kimura & Crow, 1964). Para as análises dos índices mencionados e o número de migrantes (N_m) foi utilizado o programa Genealex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Para os valores dos índices de F_{st} e R_{st} os resultados foram considerados dessa forma: índices entre 0 e 0,05 - pouca diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 - diferenciação genética moderada, entre 0,15 e 0,25 - alto nível de diferenciação genética e maior que 0,25 - nível muito alto de diferenciação genética (Wright, 1978).

4. Resultados

4.1. Coleta de amostras

Embora a campanha para coleta de amostras no sudeste do Pará tenha compreendido um período relativamente longo (um mês), o número de amostras de sangue de filhotes obtidas foi baixo. Além disso, a idade dos filhotes para cada ninho vistoriado variou bastante. Enquanto em alguns ninhos foram encontrados filhotes com poucos dias de vida, em outros foram encontrados filhotes com cerca de um mês bem ou filhotes maiores que já haviam abandonado o ninho. Adicionalmente, em alguns ninhos foram encontrados somente ovos, enquanto em outros o forro do ninho ainda estava sendo preparado pelos pais para a provável postura dos ovos. Esses dados sugerem que na região do mosaico de Carajás possivelmente as fêmeas que ocupam essa área na época reprodutiva façam a postura dos ovos em períodos distintos. Esses dados divergem do cenário encontrado no Pantanal, em que ocorre uma maior sincronização na postura de ovos entre as fêmeas em um mesmo período reprodutivo (Grace Ferreira da Silva, comunicação pessoal).

Tabela 3. Relação de amostras de *A. hyacinthinus*, e informações acerca dos locais e datas de coleta, bem como dados sobre a fase de crescimento e idade dos indivíduos amostrados em campanha realizada durante a época reprodutiva da espécie na região do mosaico de Carajás no Pará.

Amostra	Local	Indivíduo	Idade (dias)	Data
AA36	Canãa dos Carajás	Filhote	45	24/10/2013
AA38	Canãa dos Carajás	Filhote	30	24/10/2013
LGA1	Zoobotânico/Parauapebas	Adulto	x	14/10/2013
LGA2	Zoobotânico/Parauapebas	Adulto	x	14/10/2013
LGA3	Zoobotânico/Parauapebas	Adulto	x	14/10/2013
LGA4	Zoobotânico/Parauapebas	Adulto	x	14/10/2013
LGA5	Zoobotânico/Parauapebas	Adulto	x	14/10/2013
LGA9	Zoobotânico/Parauapebas	Adulto	x	14/10/2013
LGA10	Rio Itacaiúnas	Filhote	35	02/10/2013

Em função desse cenário, foram encontrados poucos filhotes com idade ideal para a coleta de sangue (acima de 15 dias), o que resultou na coleta de apenas nove amostras no total (duas amostras de sangue correspondentes a filhotes encontrados na região de Canãa dos Carajás/PA, uma amostra de sangue de filhote correspondente à região da mata ciliar do rio Itacaiúnas e seis amostras de sangue de adultos coletados no Parque Zoobotânico em

Parauapebas/PA), enquanto na FLONA Itacaiúnas não foi possível a obtenção de amostras (Tabela 3).

Além das amostras obtidas na campanha no mosaico de Carajás de setembro a novembro de 2013 (Tabela 3), outras amostras de sangue coletadas por pesquisadores colaboradores foram utilizadas para as análises populacionais. Essas perfizeram 24 amostras do Pará, sete amostras provenientes do Pantanal Sul, nove amostras provenientes do Pantanal Norte, além de seis amostras provenientes do nordeste do Brasil (Tabela 1).

4.2. Análises das sequências candidatas a microssatélites

Na construção da biblioteca de microssatélites foram gerados 96 clones, sendo que destes apenas 52 colônias (54,17%) de bactérias transformadas cresceram adequadamente e puderam ter os fragmentos sequenciados. No total de 52 clones contidos na biblioteca, 26 (50%) apresentaram cinco ou menos unidades de repetição de dinucleotídeos por sequência e foram descartados pela menor probabilidade de apresentarem polimorfismo. Além disso, 10 clones foram descartados por apresentarem repetições localizadas no início ou no fim da sequência do fragmento, impossibilitando o desenho dos *primers* (19,2%).

Posteriormente, foram pré-selecionados os 16 fragmentos considerados aptos e seus respectivos *primers* foram desenhados. Desse total, três fragmentos foram preteridos devido à formação de estrutura *hairpin* próximo a extremidade 3' dos *primers*, já que essa condição pode comprometer a integridade destes. Por outro lado, foram escolhidas duas das sete melhores sequências entre as obtidas de fragmentos contendo sete ou oito unidades de repetição e testados os seus respectivos *primers*, porém não foi possível a amplificação em amostras da arara-azul-grande. Dessa forma, foram consideradas nas análises do presente estudo sequências que apresentaram regiões com nove ou mais unidades de repetição. Com isso, restaram seis fragmentos (11,53% do total de 52 clones) que apresentaram nove ou mais unidades repetitivas de dinucleotídeos (*motifs* de repetição) (Tabela 4).

4.3. Caracterização dos locos específicos prospectados para *A. hyacinthinus*

Todos os seis pares de *primers* desenvolvidos para a arara-azul-grande (AnH6, AnH10, AnH17, AnH23, AnH33 e AnH34) produziram fragmentos nas reações de amplificação, os quais foram visualizados em géis de agarose. Esses fragmentos foram então sequenciados para a confirmação da presença dos microssatélites e, ao final, genotipados para determinação dos níveis de polimorfismo e de diversidade genética.

Quanto à avaliação de polimorfismo apenas o primer AnH23 mostrou-se monomórfico (Tabela 5). O número de alelos por loco variou de dois (loco AnH6 e AnH33) a 12 (loco AnH34), levando-se em consideração a variação de amostras utilizadas para cada *primer* avaliado (43 a 57 amostras) (Tabela 5). O *primer* AnH23 considerado monomórfico foi testado para 18 amostras provenientes de diferentes locais de ocorrência da espécie.

A heterozigosidade observada por loco variou de 0,175 (AnH10) a 0,721 (AnH34), com uma média de 0,440 para todos os locos. A heterozigosidade esperada por loco variou de 0,193 (AnH10) a 0,818 (AnH34) com média de 0,509 entre todos os locos (Tabela 5). Todos os locos polimórficos analisados não mostraram evidência de desequilíbrio de ligação, ($p > 0,05$). Dessa maneira, todos esses locos devem ser considerados como marcadores independentes. Nenhum loco encontrou-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,01$), e na análise pelo programa Micro-checker (Brookfield, 1996), não foi verificada a presença de alelos nulos. Além disso, dentre os seis locos estudados, dois (AnH6 e AnH33) foram considerados razoavelmente informativos (PIC entre 0,25 e 0,5) e dois (AnH17 e AnH34) foram altamente informativos (PIC $> 0,5$) (Botstein et al. 1980).

4.4. Amplificação cruzada em outras espécies de psitacídeos utilizando *primers* desenvolvidos para *A. hyacinthinus*

Como resultado da amplificação cruzada para os seis *primers* desenvolvidos para a arara-azul-grande constatou-se amplificação em: *Amazona guildingii* (três *primers*), *Amazona ochrocephala* (um *primer*), *Ara severus* (cinco *primers*), *Ara macao* (quatro *primers*), *Ara ararauna* (cinco *primers*), *Ara chloropterus* (seis *primers*) e *Anodorhynchus leari* (cinco *primers*) (Tabela 6).

4.5. Amplificação cruzada em *A. hyacinthinus* utilizando *primers* desenvolvidos para outras espécies de psitacídeos

Os *primers* desenvolvidos para *Ara chloropterus* (Martins, 2008) foram testados em amostras de *A. hyacinthinus* para checagem quanto ao polimorfismo, nº de alelos, heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 7). Dentre esses cinco pares de *primers* testados todos mostraram-se polimórficos. Vale ressaltar que os *primers* AgGT19, UnaCT21, UnaCT32, UnaCT41int, UnaCT43, UnaCT55, UnaCT74 e Peeμ16 já haviam sido testados quanto ao polimorfismo em *A. hyacinthinus* (Presti, 2006 e 2011) (Tabela 2).

4.6. Análise da variabilidade genética

Os *primers* Ach10, Ach14, Ach15 e UnaCT74 apresentaram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg para $p < 0,01$ e foram descartados das análises populacionais.

Com isso os locos utilizados para análise foram: AnH6, AnH10, AnH17, AnH33 e AnH34 (locos prospectados no presente trabalho); Ach8 e Ach9 (Martins, 2008); AgGT19 (Rusello et al., 2005); Peeu16 (Taylor & Parkin, 2006a); UnaCT21, UnaCT41, UnaCT32 e UnaCT55 (Caparroz et al., 2003), UnaCT41int (Gebhardt & Waits, 2008), perfazendo um total de 14 locos.

Na genotipagem de todos estes locos em *A. hyacinthinus* verificou-se que o número de alelos por loco variou de dois (loco AnH6, AnH33 e UnaCT32) a 12 (loco AnH34), levando-se em consideração a variação no número de amostras utilizadas para cada loco avaliado tanto para uma mesma região quanto entre as regiões (Tabela 8). Todos os locos polimórficos analisados não mostraram evidência de desequilíbrio de ligação considerando $p > 0,05$. Dessa maneira, todos esses locos devem ser considerados como marcadores independentes.

A heterozigosidade observada por loco teve a variação de 0,142 (UnaCT32) a 0,687 (Ach8), com uma média de 0,416 entre todos os locos. A heterozigosidade esperada por loco variou de 0,156 (AnH10) a 0,827 (AnH34) com média de 0,431 entre todos os locos (Tabela 8).

Ao analisar os dados isoladamente para cada região podemos notar que o loco AnH17 mostrou-se monomórfico para o Pantanal Sul (temos $N=4$) enquanto os locos UnaCT32, UnaCT41int e AgGT19 mostraram-se monomórficos para o Pantanal Norte (temos um N amostral de quatro, quatro e sete indivíduos respectivamente). Em contrapartida, o loco UnaCT43 mostrou-se monomórfico para grupo do nordeste (temos $N=3$ indivíduos).

Considerando-se a média total do número de alelos e da heterozigosidade observada é possível notar que a população do Pará apresentou maior variabilidade genética entre as regiões de ocorrência da espécie ($H_o=0,488$ e média de 4 alelos), embora apresente um N amostral médio de 20,21. Em contrapartida, as populações do Pantanal Norte e Pantanal Sul demonstraram possuir os menores índices de variabilidade genética entre as regiões de ocorrência da espécie ($H_o=0,354$ e 0,386) respectivamente e média de 2,357 alelos), embora apresentem um número amostral médio por loco de 5,78 e 6,57 respectivamente.

Além disso, não foi observada uma melhor eficiência em termos de informação de polimorfismo dos locos prospectados para *A. hyacinthinus* quando comparados aos locos heterólogos utilizados no presente estudo.

4.7. Estruturação genética

A partir da análise bayesiana, utilizando 14 locos microssatélites, verificou-se uma maior probabilidade dos indivíduos das quatro diferentes regiões analisadas constituírem uma única população (Figura 8). Do mesmo modo, considerando-se apenas a análise de indivíduos provenientes do Pará a fim de verificar uma possível estruturação dentro dessa região, o maior valor de probabilidade encontrado também sugere a ocorrência de uma única população (Figura 7).

Dessa forma, o índice F_{st} indicou um alto nível de diferenciação genética entre o Pantanal Norte e o nordeste (0,150), um moderado grau de diferenciação genética entre o Pantanal Norte e o Pantanal Sul (0,109), entre o estado do Pará e o Pantanal Norte (0,082), entre o Pará e o Pantanal Sul (0,143) e entre o Pantanal Sul e o nordeste (0,086), exceto na comparação entre os índices de F_{st} entre a amostragem do Pará e o nordeste, onde não foi evidenciada diferenciação (Tabela 9).

Em contrapartida, os índices de R_{st} indicaram pouca diferenciação genética entre o estado do Pará e Pantanal Sul (0,037) entre o estado do Pará e Pantanal Norte (0,018), um moderado grau de diferenciação genética entre o estado do Pará e o Nordeste (0,086) e entre o Pantanal Sul e o Pantanal Norte (0,089) e um alto nível de diferenciação genética entre Pantanal Norte e Nordeste (0,159), exceto para o R_{st} entre o nordeste e o Pantanal Sul que não indicou diferenciação (Tabela 10). O número de migrantes por geração estimado a partir do índice de F_{st} está representado na Tabela 9. Vale ressaltar que o número de amostras utilizadas para essas análises variaram conforme o loco e entre as diferentes regiões, sendo que a amostragem para o Pantanal Norte, Pantanal Sul e nordeste utilizada foi menor do que a do Pará (Tabela 8).

Tabela 4. Nomenclatura, sequência, *motifs* de repetição e parâmetros obtidos para cada *primer* espécie-específico sintetizado.

Primer	Sequência 5'-3'	Motif	%CG	Harpin*	Selfdímero*	Heterodímero*
AnH6_F	AAAGGCAGTTCAGGTGTTGG	(GT)x4(AT)x7(TG)x7	50%	1.01	-3.14	-5.02
AnH6_R	ACACACACGCACATACTCCA	(GT)x4(AT)x7(TG)x7	50%	-	-3.61	-5.02
AnH10_F	CCTATACCCAGCTCCCAACA	(AC)x9	55%	1.59	-6.34	-5.02
AnH10_R	AGCCTTCAGTGGCTCATTGT	(AC)x9	50%	-2.25	-7.81	-5.02
AnH17_F	TTCCCATTTGGATACTTGTTCAG	(AC)x16	40,9%	-0.5	-7.06	-10.4
AnH17_R	ATTGGCAATGGCCTAAACAC	(AC)x16	45%	-2.72	-9.28	-10.4
AnH23_F	TGTGGCATCTGTAAAGAAAGAGG	(AC)x9	43,50%	-1.62	-3.17	-6.21
AnH23_R	GCCTGGGGAGTGATTGTTTA	(AC)x9	50%	0.09	-3.14	-6.21
AnH33_F	GCCTGTGCCAGATGGTAAAT	(TG)x12	50%	-0.65	-5.02	-5.02
AnH33_R	GCCCTAAAATGCTTTCCAA	(TG)x12	40%	0.32	-3.89	-5.02
AnH34_F	GACAGACACATCCGCTTCAA	(TG)x24	50%	0.69	-3.61	-3.43
AnH34_R	AACACACATCTCATATGCAACC	(TG)x24	39,10%	0	-7.82	-3.43

Legendas: * representa o ΔG (energia livre). Quanto mais negativo o valor de ΔG , maior será a ocorrência do evento na reação. Se ΔG for igual a zero, a reação está em equilíbrio. Em contrapartida, se ΔG for maior que zero, o evento só tem probabilidade de ocorrer por influência de um fator externo (temperatura, calor, etc); - ΔG não encontrado

Tabela 5. Nome dos locos, sequência dos *primers*, *motifs* de repetição, tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento (T_a °C), número de amostras utilizadas (N), número de alelos (n), heterozigiosidade observada (Ho), heterozigiosidade esperada (He), heterozigiosidade relativa ao PIC (conteúdo de informação polimórfica) para os *primers* desenvolvidos para arara-azul-grande.

Locus	Sequência dos primers (5'-3')	Motifs de Repetição	Tamanho	T_a °C	N	n	Ho	He	PIC
AnH6	F AAAGGCAGTTCAGGTTGG R ACACACACGCACATACTCCA	(GT) n (AT) n (GT) _n	234-236	60-55°C (td)	44	2	0,500	0,502	0,373
AnH10	F CCTATACCCAGCTCCCAACA R AGCCTTCAGTGGCTCATTGT	(AC) x 9	166-172	57°C	57	3	0,175	0,193	0,179
AnH17	F TTCCCATTGGATATCTTGTGACAG ATTGGCAATGGCCTAAACAC	(CA) x 16	184-192	59°C	49	5	0,531	0,669	0,605
AnH23	F TGTGGCATCTGTAAGAAAGAGG R GCCTGGGGAGTGATTGTTTA	(AC) x 9	222	57°C	18	1*	-	-	-
AnH33	F GCCTGTGCCAGATGGTAAAT GCCCTAAAAATGCTTTCCAA	(TG) x 12	177-179	60-55°C (td)	51	2	0,275	0,363	0,295
AnH34	F GACAGACACATCCGCTTCAA AACACACATCTTCATATGCAACC	(TG) x 24	172-210	60°C	43	12	0,721	0,818	0,786
Média						4,8	0,440	0,509	0,4476

Legendas: *loco monomórfico; td: touchdown decrescendo 0,5°C por ciclo.

Tabela 6. Espécies testadas e presença ou ausência de amplificação cruzada para os seis *primers* desenvolvidos para arara-azul-grande.

Espécie	Locos					
	AnH6	AnH10	AnH17	AnH23	AnH33	AnH34
<i>Amazona guildingii</i>	-	+	-	+	-	+
<i>Amazona ochrocephala</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Ara severus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Ara macao</i>	-	+	+	+	-	+
<i>Ara ararauna</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Ara chloropterus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Anodorhynchus leari</i>	-	+	+	+	+	+

Legenda: +amplificou com sucesso ; - não amplificou

Tabela 7: Nome dos locos, tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento (T_a °C), número de amostras utilizadas (N) , número de alelos (n), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), frequência relativa ao PIC (conteúdo de informação polimórfica) para os *primers* heterólogos de *Ara chloropterus* testados em *A. hyacinthinus*.

Locus	Tamanho	T_a °C	N	N	Ho	He	PIC
Ach8	214-228	56°C	46	8	0.696	0.735	0.683
Ach9	260-264	56°C	51	3	0.314	0.407	0.342
Ach10	195-215	56°C	24	4	0.667	0.712	0.641
Ach14	314-360	56°C	39	6	0.385	0.577	0.519
Ach15	295-315	56°C	49	9	0.490	0.776	0.738

Tabela 8. Informações sobre o número amostral (N), número de alelos (n), Ho e He para cada loco que foram utilizados para análises populacionais de *A.hyacinthinus*.

Região/ Loco	Média																
	AnH6	AnH10	AnH17	AnH33	AnH34	AcH8	AcH9	Una21	Una32	Una41int	Una43	Una55	Peeu16	AgT19	Média		
PA	19	25	27	23	22	27	24	20	19	15	13	14	18	17	20.21		
N	2	3	5	2	11	7	3	5	2	5	3	2	3	3	4		
n	0.490	0.253	0.731	0.449	0.842	0.781	0.481	0.677	0.479	0.501	0.280	0.508	0.527	0.586	0.536		
He	0.579	0.200	0.592	0.304	0.682	0.815	0.333	0.550	0.421	0.333	0.308	0.571	0.555	0.588	0.488		
PS	6	8	4	8	5	6	5	8	7	7	7	7	7	7	6.57		
N	2	2	1	2	7	3	2	3	2	4	2	2	2	1	2.357		
n	0.485	0.125	0	0.325	0.867	0.621	0.200	0.508	0.538	0.758	0.143	0.439	0.143	0	0.368		
He	0.666	0.125	0	0.375	1	0.833	0.200	0.625	0.148	0.571	0.143	0.571	0.143	0	0.386		
PN	9	9	6	6	7	8	8	4	4	4	4	4	4	4	5.78		
N	2	2	2	2	7	2	3	3	1	1	2	2	2	2	2.357		
n	0.294	0.111	0.303	0.166	1	0.400	0.608	0.750	0	0	0.250	0.428	0.250	0.429	0.356		
He	0.111	0.111	0.333	0.166	0.857	0.500	0.625	0.750	0	0	0.250	0.500	0.250	0.500	0.354		
HO	6	14	9	11	5	5	13	3	3	4	3	3	3	3	6,07		
N	2	2	3	2	3	4	2	4	2	2	1	2	2	2	2.357		
n	0.545	0.137	0.660	0.368	0.600	0.733	0.148	0.800	0.533	0.450	0	0.333	0.533	0.600	0.420		
He	0.666	0.143	0.666	0.272	0.200	0.600	0.154	0.666	0	0.750	0	0.333	0.666	1	0.437		
HO	2	3	5	2	12	8	3	5	2	5	4	3	3	3	4.286		
Total (n)																	
Média																	
He	0.453	0.156	0.423	0.327	0.827	0.634	0.359	0.684	0.387	0.427	0.168	0.427	0.363	0.404	0.431		
HO	0.505	0.143	0.398	0.279	0.685	0.687	0.328	0.648	0.142	0.413	0.175	0.494	0.403	0.522	0.416		

Legendas: PA: Pará; PS: Pantanal sul; PN: Pantanal norte; NE: nordeste.

Tabela 9. Análise da estruturação genética atribuída pelo índice F_{st} entre todas as regiões de ocorrência de *A. hyacinthinus*.

Pop1	Pop2	F_{st}	N_m
PA	PS	0,109	2,051
PA	PN	0,082	2,783
PS	PN	0,143	1,495
PA	NE	0,000	-
PS	NE	0,086	2,654
PN	NE	0,150	1,418

Legenda: Pop: População; PA- Pará; PS- Pantanal Sul; PN- Pantanal Norte; NE- nordeste; N_m : fluxo gênico representado pelo número de migrantes por geração entre cada população.

Tabela 10. Análise da estruturação genética atribuída pelo índice R_{st} entre todas as regiões de ocorrência de *A. hyacinthinus*.

Pop1	Pop2	R_{st}
PA	PS	0,037
PA	PN	0,018
PS	PN	0,089
PA	NE	0,086
PS	NE	0,000
PN	NE	0,159

Legenda: Pop: População; PA- Pará; PS- Pantanal Sul; PN- Pantanal Norte; NE- nordeste.

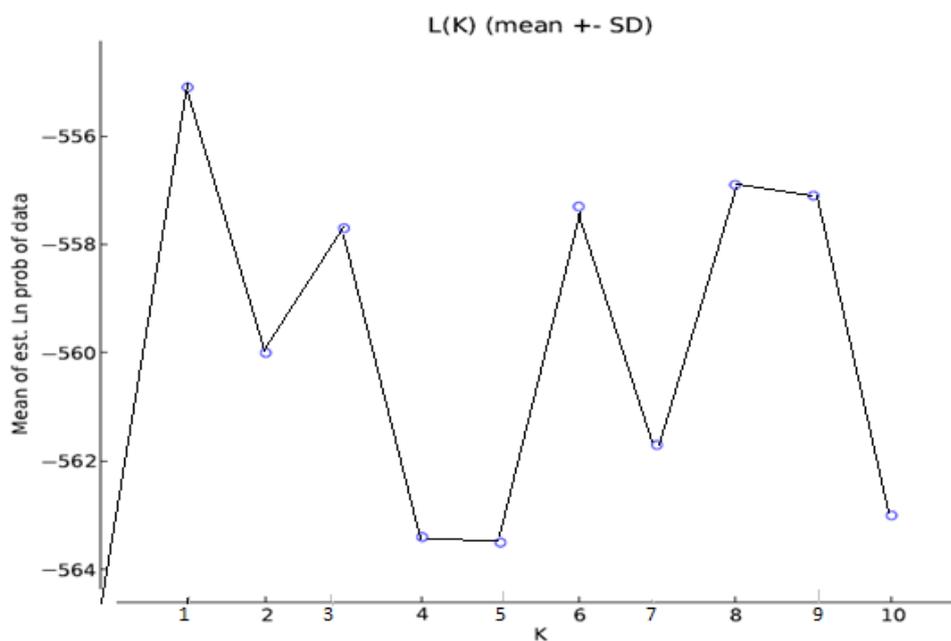


Figura 7. Gráfico do log de probabilidade que melhor mostra o agrupamento bayesiano para indivíduos apenas da região do mosaico de Carajás

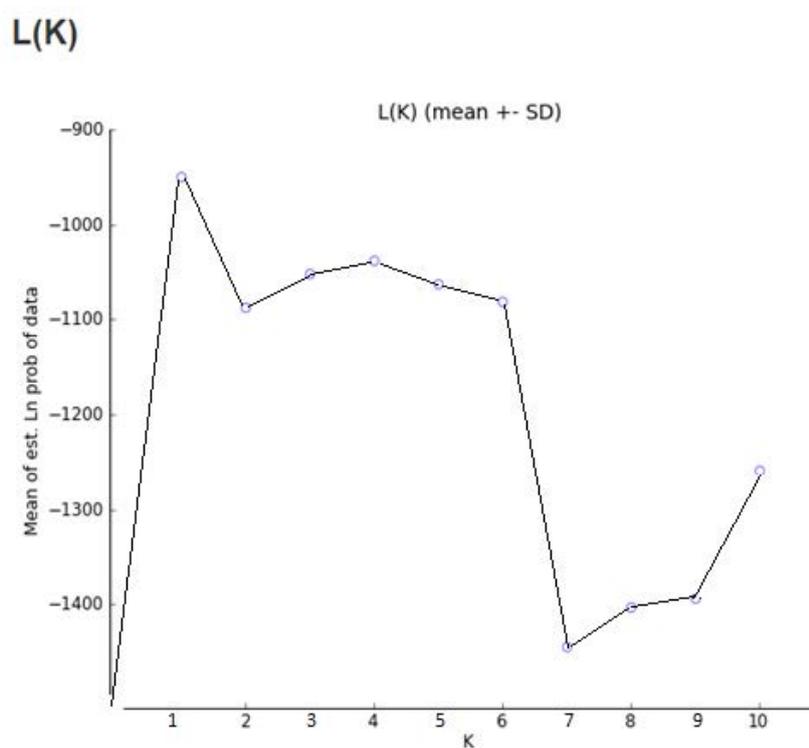


Figura 8. Gráfico do log de probabilidade que melhor mostra o agrupamento bayesiano para os indivíduos de todas as regiões de ocorrência da espécie.

5. Discussão

5.1. Prospecção e caracterização dos marcadores microssatélites

No presente estudo foram isolados cinco locos polimórficos para *A. hyacinthinus* com conteúdo informativo variável, sendo considerado alto para dois locos, razoável para outros dois locos e considerado baixo para apenas um dos locos. Nesse contexto, a proporção de locos polimórficos por número total de locos avaliados nesse trabalho foi de 5/6 levando-se em consideração que foram selecionados apenas fragmentos contendo nove ou mais unidades de repetição. Ao comparar esses dados com outros trabalhos da literatura como Russello et al. (2005; 2007), por exemplo, estes obtiveram a proporção de 7/8 e 12/14, respectivamente, para o papagaio de St. Vicente (*Amazona guildingii*) e a caturrita (*Myiopsitta monachus*) e o critério de escolha de fragmentos foi no mínimo 10 e 7 repetições, respectivamente. Caparroz et al. (2003) obtiveram a proporção de 5/6 locos polimórficos para a arara-canindé (*Ara ararauna*), porém não foi revelado o critério da escolha do número de unidades de repetição por loco. Martins (2008) encontrou a proporção de 6/14 de locos polimórficos para a arara-vermelha (*Ara chloropterus*) considerando fragmentos com no mínimo cinco repetições. Entretanto, de acordo com o mesmo autor, se fosse considerado apenas os locos com sete ou mais unidades de repetições o rendimento teria sido na proporção de 6/7 locos polimórficos. Nesse sentido, essas constatações sugerem que a escolha de locos que apresentem um maior número de unidades de repetição pode favorecer o aumento do rendimento dos locos polimórficos. Dessa forma, o fato de que no presente trabalho serem utilizados *primers* para sequências de nove ou mais unidades de repetição pode ter contribuído para a obtenção de um alto rendimento dos locos. Assim, mostra-se um bom critério a escolha de locos que apresentem nove ou mais unidades de repetição para estudos populacionais de psitacídeos neotropicais.

Em contrapartida, se for levado em consideração que dos 52 clones positivos obtidos nesse trabalho, apenas seis clones continham nove ou mais unidades de repetição e permitiam o desenho dos *primers* (11,54%), podemos concluir que o rendimento dessa técnica não foi eficiente. Padrão semelhante também foi encontrado para estudos que desenvolveram locos para espécies de psitacídeos Neotropicais (Caparroz et al., 2003; Rusello et al., 2001; 2005; 2007; Taylor & Parkin, 2007a e b; Martins, 2008). Nesse contexto, Primmer et al. (1997) encontrou uma menor frequência de microssatélites no genoma de aves em comparação a outros organismos, como por exemplo os mamíferos. Isso pode ser explicado pela razão do

genoma de aves conter uma proporção menor de DNA não-codificante (genoma mais compacto) em relação ao genoma da maioria dos mamíferos (Primmer et al., 1997). Assim, esse cenário pode estar associado ao número relativamente baixo de repetições dinucleotídicas de microssatélites encontradas no presente trabalho, embora ainda existam as limitações intrínsecas da técnica de enriquecimento de *beads* magnéticas que também pode ter influenciado esses resultados. Outros fatores que poderiam justificar o baixo número de microssatélites seriam a relativa baixa eficiência de crescimento das colônias contendo os clones, a aleatoriedade da seleção dos fragmentos e a impossibilidade de desenhos dos *primers* nas regiões flangeadoras para algumas das sequências obtidas.

Ainda que os fatores supracitados limitem a prospecção de locos microssatélites, as regiões analisadas mostraram-se bastante informativas. De fato na análise populacional a média de heterozigosidade observada para os locos foi de 0,440 e o número de alelos variou de dois a doze para um número de amostras variando de 43 a 57 (Tabela 5). Comparativamente, a média de heterozigosidade observada em seis locos microssatélites desenvolvidos para *Ara ararauna* foi de 0,604 e o número de alelos variou de três a 11 alelos em 49 indivíduos (Caparroz et al., 2003). Taylor & Parkin (2006a) encontraram uma média de heterozigosidade observada de 0,678 em seis locos microssatélites desenvolvidos para *Psittacus erithacus* e o número de alelos variou de dois a 14 para um número de amostras variando entre oito a 20. Entretanto, Martins (2008) encontrou uma média de heterozigosidade observada de 0,600 em seis locos microssatélites desenvolvidos para *Ara chloropterus* e o número de alelos variou de dois a 15 alelos para um número de amostras variando entre 55 a 58. Dessa forma, o grau de diversidade genética encontrada na caracterização de locos prospectados para *Ara ararauna* e *Ara chloropterus* foi maior do que a observada para locos de *A. hyacinthinus*.

Apesar disso, o gênero *Ara* não é um grupo proximamente relacionado ao gênero *Anodorhynchus* (Tavares et al., 2006) e tanto *A. ararauna* e *A. chloropterus* não se encontram ameaçadas de extinção, enquanto que *A. hyacinthinus* se encontra vulnerável à extinção. Nesse sentido, as espécies possuem uma baixa diversidade genética por diversas razões por apresentar: um rápido declínio populacional, populações pequenas e/ou fragmentadas e acasalamento endogâmico. Presti (2011) obteve resultado similar na comparação entre essas espécies, porém utilizando apenas *primers* heterólogos e sugeriu que o menor grau de variabilidade nos microssatélites de *A. hyacinthinus* em comparação com *Ara ararauna* poderia ter sido resultado da ausência de dados gerados para locos espécie-específicos de *A.*

hyacinthinus ou ser uma característica intrínseca da espécie. Na análise, utilizando somente locos heterólogos, esse autor encontrou para 98 indivíduos de *A. hyacinthinus* uma média da heterozigosidade observada de 0,438. Dessa forma, mesmo com o uso de primers específicos, foi encontrada heterozigosidade observada similar para *A. hyacinthinus* (0,440). Portanto, a baixa variabilidade deve ser uma característica intrínseca da espécie.

Apesar de alguns autores afirmarem que o polimorfismo está diretamente associado à proximidade filogenética entre as espécies, os primers heterólogos têm sido utilizados com sucesso em diversos trabalhos e geralmente apresentam um alto polimorfismo (Primmer et al., 2005). Por ser possível a utilização de *primers* heterólogos em estudos genéticos, os primers prospectados para *A. hyacinthinus* também mostraram-se úteis para análises em outras espécies de psitacídeos neotropicais. Dessa maneira, o teste de amplificação cruzada demonstrou que esses locos podem ser potencialmente utilizáveis em *Amazona guildingii*, *Amazona ochrocephala*, *Ara severus*, *Ara macao*, *Ara ararauna*, *Ara chloropterus* e *Anodorhynchus leari* (Tabela 6), ainda que os níveis de polimorfismo para essas espécies ainda necessitem ser avaliados. Adicionalmente, *Anodorhynchus leari* se encontra na categoria em perigo de extinção e *Amazona guildingii* na categoria vulnerável (IUCN, 2014). Dessa forma, os *primers* desenvolvidos podem servir como ferramentas importantes para a determinação da variabilidade e estrutura genética de populações naturais e de cativeiro de *A. hyacinthinus* e de outros psitacídeos neotropicais bem como auxiliar em medidas de conservação *in-situ* e *ex-situ* para as espécies que apresentam algum grau de risco de extinção.

4.2. Variabilidade genética

A análise de variabilidade genética geral entre as amostras de diferentes regiões de ocorrência da espécie teve uma média de 0,431 de heterozigosidade observada entre todos os 14 locos utilizados nesse trabalho (5 locos espécie-específicos e 9 locos heterólogos) (Tabela 8) sendo semelhante a encontrada por Presti (2011) (0,438) utilizando dez locos heterólogos. Levando-se em consideração cada região isoladamente, o Pará foi a que apresentou a maior heterozigosidade observada (0,488), seguido do nordeste do país (0,437), do Pantanal Sul (0,386) e do Pantanal Norte (0,354). Embora os dados possam indicar uma maior diversidade genética para a região do Pará, o nível da diversidade genética nas outras regiões pode ter sido subestimado justamente por serem utilizadas nas análises poucas amostras para o Pantanal Sul, Pantanal Norte e o nordeste do país, o que pode não representar fielmente o número e a frequência dos alelos que existem nessas populações.

Entretanto, apesar da pouca amostragem utilizada para as outras regiões foi observada uma maior variação genotípica nos indivíduos pertencentes a região do Pará como demonstrado pela presença de alelos exclusivos nessa população. Apesar disso, o fato da região do Pará apresentar características muito diferenciadas na fisionomia da vegetação, do clima e do relevo pode se refletir em diferenças na composição genética dessa subpopulação. Desse modo, essas características podem afetar diretamente a composição alélica, e por consequência, favorecer a fixação de alelos privados nessa subpopulação. Dessa maneira, esta hipótese não pode ser descartada. Assim, para poder confrontar esses dados será necessário refazer as análises utilizando-se uma amostragem mais ampla e equitativa entre todas as regiões de ocorrência da espécie.

Por outro lado, o nível de variabilidade genética da espécie mostrou-se menor quando comparado ao previamente reportado para outras espécies de psitacídeos neotropicais como o papagaio de St. Vicente (*Amazona guildingii*) (Russello et al., 2001; 2005), o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (Leite et al., 2008), a arara-canindé (*Ara ararauna*) (Caparroz et al., 2003), o papagaio do Congo (*Psittacus erithacus*) (Taylor & Parkin, 2006a), o papagaio da Patagônia (*Cyanoliseus patagonus*) (Klauke et al., 2009) e a arara-vermelha (*Ara chloropterus*) (Martins, 2008).

Nesse contexto, de forma geral, as espécies de aves consideradas ameaçadas tendem a apresentar uma menor diversidade genética em relação às espécies não ameaçadas, apesar de algumas exceções, como a ave marinha *Pterodroma magentae* que possui alta diversidade genética e está criticamente ameaçada de extinção (Lawrence et al., 2008). A arara-azul-grande encontra-se vulnerável à extinção apesar de sua população ter se expandido nos últimos 20 anos na região do Pantanal, devido às ações conservacionistas encabeçadas pelo Projeto Arara Azul (Guedes, 2004). Entretanto, a expansão por si só não é suficiente, pois há que se considerar o fato de que para um indivíduo alcançar sua maturidade reprodutiva são necessários cerca de três anos (Guedes, 1993) e a espécie, como mostrado no presente trabalho, apresenta uma baixa variabilidade genética. Dessa maneira, a partir do momento em que a espécie sofreu uma perda da variabilidade genética, o processo de recuperação deverá ser lento e está diretamente associado à taxa de migração ou de mutação. Assim, mesmo se fossem tomadas providências para aumentar o tamanho populacional de uma espécie, ela pode continuar ameaçada de extinção (Awise, 1994). Ainda assim, *A. hyacinthinus* possivelmente pode ter passado por um gargalo populacional recente e ainda não houve tempo suficiente para recuperação de parte de sua variabilidade genética. Nesse cenário, a espécie tem uma

maior possibilidade de apresentar maior vulnerabilidade caso ocorra mudanças ambientais desfavoráveis ou epidemia de uma doença por apresentar baixa variabilidade genética. Em contrapartida, Silva (2014) encontrou com base em programas que simulam cenários futuros para *A. hyacinthinus* uma probabilidade considerável de expansão populacional pelo aumento dos nichos disponíveis para a espécie, devido ao aumento da média de temperatura global nos próximos anos causado pelo aquecimento global.

Portanto, para a conservação da espécie a longo prazo será necessário conhecer melhor a biologia, a dinâmica populacional e a composição genética da espécie, a fim de garantir que estratégias de manejo sejam implementadas de acordo com as adaptações locais de cada subpopulação, o que deverá garantir a escolha do melhor nicho disponível. Assim, com o aumento do valor adaptativo pela seleção de alelos favoráveis, a variabilidade genética de *A. hyacinthinus* poderá ser, a longo prazo, recuperada.

5.3. Estruturação Genética

A análise bayesiana não foi capaz de detectar agrupamento entre todos os grupos amostrados (Figura 8) e entre indivíduos da região do Pará (Figura 7). Essa ausência de estruturação entre os quatro grupos não era esperada uma vez que as regiões amostradas localizam-se a muitos quilômetros de distância entre si. Além disso, foi reportado que *A. hyacinthinus* apresenta alta filopatria (volta ao local de origem para reprodução) (Guedes, 2004), o que reforça a tendência à estruturação populacional. Presti (2011) encontrou uma moderada diferenciação genética entre quatro grupos com tendência de mistura entre norte e nordeste utilizando dez locos heterólogos de microssatélites: Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), norte (N) e nordeste (NE).

A principal explicação para esse resultado é a baixa amostragem utilizada para amostras do Pantanal sul e norte e principalmente para o nordeste, uma vez que os alelos genotipados para essas poucas amostras podem não ter contribuído o suficiente para a atribuição dos indivíduos para um grupo específico. Todavia, a ausência de agrupamento entre indivíduos da região do mosaico de Carajás (PA) era esperada uma vez que a amostragem era quase exclusiva de uma mesma região (Canaã dos Carajás) e somente uma era proveniente do rio Itacaiúnas.

Apesar disso, não podemos descartar totalmente a hipótese de não haver estruturação genética entre todas as regiões. Dessa maneira, para tentar explicar essa possível situação podemos recorrer ao tráfico de animais. Em um cenário em que indivíduos de *A. hyacinthinus*

são capturados e vendidos no mercado ilegal e depois soltos na natureza, não há atualmente um controle sobre a composição genética para determinar o local de origem para a reintrodução adequada dos indivíduos. Assim, a soltura dos indivíduos em região distinta de sua subpopulação de origem poderia contribuir para homogeneizar as composições alélicas entre todas as subpopulações.

Os índices de R_{st} (Tabela 10) evidenciaram a existência de alta diferenciação genética entre dois principais grupos: Pantanal norte (PN) e nordeste (NE), além de moderada diferenciação genética entre quatro principais grupos: Pantanal norte (PN) e Pantanal sul (PS); Pará (N) e nordeste (NE) e baixa diferenciação entre Pará (PA) e Pantanal sul (PS), exceto para Pantanal sul (PS) e nordeste (NE).

Os valores dos índices de F_{st} evidenciaram analogamente ao R_{st} a existência de alta diferenciação genética entre dois principais grupos: PN e NE, além de moderada diferenciação genética entre PN e PS. As diferenças encontradas pelo F_{st} em comparação ao R_{st} foram a moderada diferenciação encontrada entre os grupos PS e NE e entre PA e PS e a ausência de diferenciação entre os grupos do PA e NE.

Em estudos anteriores, Faria et al. (2007) através do F_{st} encontraram significativa diferenciação entre as populações de *A. hyacinthinus* do Piauí e do Pantanal sul (0,33 e 0.25 para $p < 0.001$ considerando Abobral e Miranda, respectivamente). Presti (2011) também encontrou resultados semelhantes para o índice F_{st} entre os mesmos grupos analisados no presente estudo.

A razão dos resultados mais homogêneos terem sido obtidos pelo F_{st} é que o baixo número amostral parece não interferir tanto quanto o R_{st} nas análises. Em contrapartida, o principal problema que afeta a estatística F_{st} quando se trabalha com microssatélites, é que este apresenta alta sensibilidade à taxa de mutação dos microssatélites quando a taxa de migração é baixa entre as populações (Baloux & Lugon-Moulin, 2002). Assim, como foi encontrado um baixo número de migrantes por geração a partir do F_{st} , talvez a diferenciação entre as regiões possa ter sido superestimada (Tabela 9). Apesar disso, o F_{st} pode ser útil para medir a distância genética quando a divergência genética entre as subpopulações é causada pela deriva genética (Reynolds et al., 1983). Como as subpopulações de *A. hyacinthinus* estão aparentemente isoladas e o fluxo gênico entre elas mostrou-se limitado é bem possível que a deriva genética tenha um papel importante na dinâmica populacional e na fixação de alelos preferenciais para cada subpopulação.

Em contrapartida, considerando-se o índice de R_{st} , não era esperada a ausência de diferenciação genética entre o Pantanal sul e o nordeste uma vez que as regiões são separadas por uma distância de mais de 1000 km e que, por essa razão, provavelmente são subpopulações que apresentam ausência ou limitado fluxo gênico. Isso pode ter ocorrido pela baixa amostragem para o Pantanal sul, mas principalmente para o nordeste que além de apresentar uma média amostral baixa também apresentou alta variação no número de amostras genotipadas dependendo de cada loco microssatélite (Tabela 8). Além disso, foi encontrada diferenciação genética entre todos os outros grupos. Para efeito de comparação Presti (2011) encontrou uma diferenciação moderada para os quatro grupos de ocorrência da espécie utilizando uma amostragem mais ampla (exceto para o Pará), porém utilizando menor número de locos microssatélites. Apesar do R_{st} indicar diferenciação genética entre quase todas as regiões de ocorrência da espécie esses resultados devem ser analisados com cautela, uma vez que o índice é muito mais sensível à variância amostral pois seu cálculo está associado diretamente ao tamanho da amostras tanto que Gaggiotti et al.(1999) propuseram que esse índice tem o melhor desempenho possível em uma situação ideal (tamanho populacional acima de 50 indivíduos e mais de 20 locos analisados). Apesar disso, o índice poderia ser mais preciso (inclusive melhor que o F_{st}) se fosse reduzida a variância das amostras, através do aumento do número de populações amostradas, do número de indivíduos por população ou aumentando o número de loci microssatélites (Balloux & Goudet, 2002). Por outro lado, o R_{st} é o índice que melhor pode representar os dados por ser apropriado para a medição da estruturação genética populacional a partir da utilização de locos microssatélites, assumindo que a mutação ocorra nestes locos de acordo com o *stepwise mutation model* (Slatkin, 1995). Adicionalmente, o R_{st} pode refletir melhor a diferenciação populacional quando ocorre um baixo nível de fluxo gênico (Balloux & Goudet, 2002). Assim, por ser o índice mais adequado em estudos com microssatélites será necessário aumentar o número de amostras genotipadas para todos os locos e da amostragem para o PN, o PS e o NE a fim de obter resultados que melhor retratem a situação da estrutura genética da espécie.

No que tange a história biogeográfica da espécie pouco se sabe até o presente momento. Durante o início do Plioceno (± 5 Ma) ocorreram eras glaciais que provocaram uma diminuição na média de temperatura global, o que pode ter favorecido a expansão de áreas de savanas e campos e, por conseguinte, o surgimento ou expansão de várias espécies que ocupam áreas abertas (Haffer, 1997). Nesse contexto, de acordo com datações moleculares,

foi estimado que as espécies *A. hyacinthinus* e *A. leari* se separaram há aproximadamente 3,8 milhões de anos atrás no Plioceno (Tavares et al., 2004, 2006). Dessa maneira, como *A. hyacinthinus* surgiu durante desse período, a expansão de áreas abertas deve ter favorecido a dispersão da espécie por toda a região Central do país até a área que compreende atualmente a Floresta Amazônica. As oscilações no clima e na vegetação, sobretudo entre as eras glaciais, deve ter proporcionado o isolamento de grupos da espécie, tendo como fatores limitantes a distribuição dos recursos alimentares e a disponibilidade dos ovos para reprodução. Possivelmente, o período de expansão da espécie deve ter coincidido com as épocas de temperaturas mais altas, já que seus itens alimentares são mais abundantes nessas condições. Na última era Glacial, no final do Pleistoceno, entre 18.000 a 13.000 anos atrás, as regiões savânicas se estendiam por quase toda a área que compreende hoje a Floresta Amazônica (Haffer, 1987). Com a expansão das áreas florestais, esse tipo de vegetação deve ter regredido restando apenas fragmentos limitados a áreas específicas da região Amazônica. Assim, a área de ocorrência da arara-azul-grande possivelmente era bem maior do que se tem registro atualmente e o isolamento entre esses grupos de indivíduos em essencialmente três regiões deve ter ocorrido muito recentemente na história evolutiva da espécie. Segundo Presti (2011) a separação entre os grupos genéticos de *A. hyacinthinus* ocorreu entre 16 e 42 mil anos atrás, ao final do Pleistoceno.

Dessa maneira, para tentar explicar a não diferenciação entre os grupos Norte e Nordeste evidenciada pelo F_{st} , Presti (2011) sugeriu a existência de um isolamento recente desses grupos de uma maneira que ainda não foi possível verificar através de marcadores genéticos a diferenciação entre essas subpopulações. Outra hipótese é que possa existir indivíduos jovens que consigam se deslocar por um corredor entre os rios ou bordas da Floresta Amazônica e a região do nordeste contribuindo para a existência, ainda que baixa, de fluxo gênico entre as duas subpopulações. Além disso, a baixa amostragem utilizada para a região nordeste e o fato das amostras serem provenientes de coletas de estações reprodutivas diferentes, uma vez que idealmente os indivíduos amostrados devem pertencer a mesma geração (Baloux & Lugon-Moulin, 2002), também pode ter contribuído para esse resultado.

A diferenciação genética observada pelo F_{st} e R_{st} entre os grupos Pantanal Norte e Pantanal Sul não era esperada pela distância relativamente pequena entre eles. Apesar disso, Presti (2011) também encontrou a mesma situação e sugeriu que a fidelidade ao sítio de nidificação em conjunto com uma possível área de ausência de ocorrência de *A. hyacinthinus* entre as regiões amostradas poderia restringir o fluxo gênico entre os grupos. Embora isso seja

possível, outra hipótese interessante que poderia ajudar a explicar essa situação é que a espécie deve ter surgido em uma região perto do Pantanal sul do Brasil. Dessa forma, a espécie poderia ter expandido sua população sempre em direção ao Norte e as mudanças climáticas que ocorreram entre os períodos glaciais fizeram com que os indivíduos fossem se isolando em regiões com nichos mais favoráveis, deixando regiões inocupadas pelo caminho. Isso poderia explicar a possível ausência de *A. hyacinthinus* entre essas duas regiões e a diferenciação genética encontrada. Em contrapartida, em espécies mais próximas como *Ara chloropterus*, *Ara macao* e *Ara ararauna* que possuem uma distribuição mais ampla e homogênea foi encontrada uma baixa estruturação genética (ou nenhuma no caso de *Ara macao*) e um alto fluxo gênico mesmo entre indivíduos localizados nos extremos geográficos, mas ao contrário da *A. hyacinthinus* essas espécies se deslocam mais e possuem uma ampla distribuição geográfica que facilita o fluxo gênico entre indivíduos (Oliveira-Marques, 2010; Caparroz et al., 2009a). No caso de *Ara ararauna* interessante ainda têm-se evidências que a fêmea possui um comportamento filopátrico e o macho contribui diretamente para o fluxo gênico, principalmente entre as regiões mais distantes (Caparroz et al., 2009a). Essa condição também foi sugerida por Presti (2011) em *A. hyacinthinus* por ter encontrado uma maior estruturação genética utilizando DNA mitocondrial em comparação com os locos microssatélites. Apesar disso, mesmo em um cenário que os machos exerçam um papel importante na dispersão, provavelmente, não seria o suficiente para estabelecer níveis de fluxo gênico considerado alto entre as subpopulações, uma vez que as mesmas são possivelmente desconexas espacialmente, os indivíduos da espécie parecem não se deslocar muito (Antas, comunicação pessoal) e os machos permanecem próximos ao ninho durante toda a época reprodutiva (Guedes, 1993) dificultando, assim, o fluxo gênico propiciado pela dispersão de indivíduos. Portanto, a dispersão deve ser exercida majoritariamente por jovens que podem formar bandos quando ainda não estão unidos a uma fêmea como já foi relatado por Guedes (1993). Por fim, no caso da arara-azul-grande, a possível ocorrência de dispersão preferencial de machos pode ser importante para aumentar a variabilidade genética local e ajudar a diminuir os efeitos da endogamia em longo prazo.

Adicionalmente, a razão de não ter sido encontrada estruturação genética ou ter sido encontrada uma baixa estruturação não implica que seja necessário concentrar esforços para apenas um local de ocorrência específico da espécie. Nem sempre é notado imediatamente os efeitos da seleção natural ou da deriva genética atuando sobre as populações, já que a evolução é um processo contínuo e *A. hyacinthinus* por possuir uma história evolutiva recente

e pode não ter acumulado divergências genéticas suficientes para serem sensíveis aos índices e métodos de agrupamento empregados nesse presente trabalho. Essa constatação é relevante, uma vez que em cada região os indivíduos podem portar adaptações locais que se perderiam caso ocorresse um manejo conjunto de todas as subpopulações, provocando a diminuição do valor adaptativo da espécie à longo prazo.

5.4. Implicações para conservação

Os locos microssatélites desenvolvidos para *A. hyacinthinus* constituem-se numa ferramenta promissora para auxiliar em estratégias de conservação da espécie bem como apresentam aplicabilidade potencial no estudo de outras espécies de psitacídeos neotropicais. Um exemplo disso foi um estudo de Presti (2011) que conseguiu atribuir a origem de indivíduos provenientes de apreensões utilizando locos microssatélites heterólogos, auxiliando dessa forma, no combate ao tráfico ilegal de animais e na soltura correta das aves apreendidas na natureza. Com base nisso, o aumento de locos disponíveis para análise dos indivíduos apreendidos (como os locos desenvolvidos no presente trabalho) contribuirá para elevar o nível de confiabilidade desse tipo de análise forense.

Outra aplicação igualmente importante é o uso desses marcadores para análises de parentesco entre casais, sendo possível atribuir a dinâmica de cruzamento na natureza ou em cativeiro e inferir processos que podem afetar a variabilidade genética da espécie, como o cruzamento entre indivíduos aparentados e também auxiliar programas de reprodução em cativeiro. Além disso, esses marcadores prospectados podem, em conjunto, ser utilizados para estimar a ocorrência de monogamia e o nível de fidelidade ao ninho, como relatado no trabalho de Presti (2011).

No presente trabalho, foi encontrado um baixo índice de variabilidade genética para *A. hyacinthinus*. Além disso, foi possível verificar níveis de estruturação genética diferentes entre regiões para os índices F_{st} e R_{st} e ausência de estruturação através do método de agrupamento bayesiano. Assim, considerando-se que as populações da arara-azul-grande estão distribuídas em três áreas aparentemente isoladas e com características diferentes entre si quanto à vegetação, relevo e clima, é importante a utilização desses marcadores microssatélites desenvolvidos em associação com marcadores heterólogos para estimar a composição genética dessas populações com uma amostragem mais ampla para entender os processos evolutivos e de dinâmica populacional que permeiam essas populações. Assim, tal condição pode garantir que futuros planos de manejo levem em consideração as

particularidades genéticas de cada região, permitindo a preservação de todo o pool genético da espécie.

6. Conclusões Gerais

Os resultados obtidos pela análise de amostras de *A. hyacinthinus* provenientes de diferentes regiões do Brasil e a partir da utilização de locos microssatélites prospectados para a espécie e de locos heterólogos permitem-nos concluir que:

- os locos microssatélites isolados apresentaram níveis de polimorfismo adequados para a realização de estudos de estrutura populacional em *A. hyacinthinus* e poderão ser potencialmente úteis para a realização de novos estudos populacionais em outras espécies de psitacídeos neotropicais;
- os *primers* prospectados para *A. hyacinthinus* em conjunto apresentaram índices de variabilidade genética equiparáveis aos *primers* heterólogos utilizados nas análises populacionais;
- os *primers* microssatélites heterólogos e espécie-específicos desenvolvidos no presente trabalho foram informativos nas análises de variabilidade e estrutura genética populacional;
- a variabilidade genética encontrada para *A. hyacinthinus* foi baixa quando comparada a várias espécies de psitacídeos neotropicais não ameaçadas de extinção;
- apesar de ser encontrada, no geral, moderada diferenciação genética populacional em *A. hyacinthinus* para o índice F_{st} , exceto entre as regiões do Pará e nordeste, o índice R_{st} e a análise bayesiana apresentaram resultados que possivelmente estão associados com a baixa amostragem ou *gaps* existentes para alguns locos utilizados e podem ter sido superestimado e subestimado, respectivamente;
- a maior variabilidade genética encontrada para a região do mosaico dos Carajás em relação as outras regiões (PN, PS e NE), pode ter relação com a baixa amostragem utilizada para estas últimas regiões, mas também pode ter relação com as características intrínsecas dessa região;

- a análise de um número maior de indivíduos para algumas das localidades estudadas, torna-se necessária para a confirmação e confrontamento de dados dos resultados obtidos no presente trabalho, o que poderá garantir a ampliação do conhecimento e auxiliar medidas de conservação desta espécie.

7. Referências Bibliográficas

- Adcock, G.J., Heinsohn, R., Ebert, D., Amini, N., Peakall, R. 2005. Microsatellite Loci for Behavioural Studies of Eclectus Parrot (*Eclectus roratus*: Aves). *Molecular Ecology Notes*; **5**, 616-618.
- Alacs, E.A., Georges A., FitzSimmons N.N., Robertson J. 2009. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensics Science, Medicine, and Pathology*; **6**: 180-194.
- Anon. 2004. The Hyacinth Macaw makes a comeback. *Partners for Wetlands Quarterly*: 14-15.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York: 511 pp.
- Avise, J.C. 1995. Mitochondrial DNA Polymorphism and a Connection Between Genetics and Demography of Relevance to Conservation. *Conservation Biology*; **9**: 686–690.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 447 pp.
- Balloux, F., Goudet, J. 2001. Statistical properties of differentiation estimators under stepwise mutations in a finite island model. *Molecular Ecology*; **11(4)**:771-83.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Issue Molecular Ecology* *Molecular Ecology* Volume 11, Issue 2, pages 155–165.
- Barrowclough, G., Groth, J.G., Mertz, L.A. 2004. Phylogenetic relationships among parrots. One Hundred and TwentySecond Stated Meeting of the American Ornithologist's Union. August, Laval, Quebec. 16-21.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L., Risterucci, A.M., Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Birboim, H.C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24 ;**7(6)**:1513-23.
- Birdlife International. 2000. *Threatened Birds of the World*, 1st ed. Lynx Edicións and Birdlife International, Barcelona.

- BirdLife International 2014. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 02 November 2014.
- BirdLife International and NatureServe (2013) Bird Species Distribution Maps of the World. 2013. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v. 32, p. 314-331.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*; **5**: 453-455.
- Brown, K.S., Hutchings, R.W. 1997. Disturbance, fragmentation, and the dynamics of diversity in Amazonian forest butterflies. Pp 91-110.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel C.A.R. (Ed.). *Molecular Genetic Analyses of Populations: a Practical Approach*. Oxford University Press, New York. Pp: 225 – 269.
- Bruford, M.W., Cheesman, D.J., Coote, T., Green, H.A.A., Haines, S.A., O’Ryan, C., Williams, T.R. 1996. Microsatellite and their application to conservation genetics. In: Smith, T.B., Wayne, R.K (Eds.). *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York. Pp: 278 - 297.
- Burgman, M.A., Ferson, S., Akçakaya, H.R., 1993. *Risk Assessment in Conservation Biology*. Chapman Hall, London.
- Cavalcanti, R.B. 1986. Aspectos da fauna e sua conservação. In: Gonçalves Júnior, J.M. (org.). *Carajás: Desafio Político, Ecologia e Desenvolvimento*, CNPq, São Paulo, Pp: 214-221.
- Caparroz, R., Miyaki, C.Y., Baker, A.J. 2003. Characterization of microsatellite loci in the Blue and gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes* **10**: 1046-1048.
- Caparroz, R., Miyaki, C., Baker, A.J. 2009a. Contrasting phylogeographic patterns in mitochondrial DNA and microsatellite: evidence of female philopatry and male-biased gene flow among regional populations of the blue-and-yellow macaw (Psittaciformes: *Ara ararauna*) in Brazil. *The Auk* **126**: 359-370.

- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 126; pp. 455–476.
- Chan, C.H., Ballantyne, K.N., Lambert, D.M., Chambers, G.K. 2005. Characterization of Variable Microsatellite Loci in Forbes' Parakeet (*Cyanoramphus forbesi*) and Their Use in Other Parrots. *Conservation Genetics*; **6**, 651-654.
- Christidis L., Boles, W.E. 2008. *Systematics and Taxonomy of Australian Birds*. Canberra: CSIRO Publishing. p. 200.
- Collar, N.J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliot, A.E., Sargatal, J. (eds.). *Handbook of the Birds of the World*, vol.4, Lynx Edicions, Barcelona, Pp: 280-477.
- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO). 2014. *Listas das aves do Brasil*. 11ª Edição. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: [14/11/2014].
- Cooper, G., Amos, W., Bellamy, R., et al. 1999. An empirical exploration of the $(\delta\mu)^2$ genetic distance for 213 human microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*; **65**; 1125–1133.
- Crochet, P.A. 1996. Can measures of gene flow help to evaluate bird dispersal? *Acta Oecologica*; **17**: 459–474.
- Dallas, J.F. 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse, *Mamm. Genome*; **3**, 452-456.
- Dib, C. et al. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites, *Nature*; **380**,152-154.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., et al. 1994. Mutational process of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.91, p.3166-3170.
- Earl, D.A., Holdt, V., Bridgett, M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361.
- Eriksson, J., Siedel, H., Lukas, D., Kayser, M., Erler, A., Hashimoto, C., Hohmann, G., Boesch, C., Vigilant, L. 2006. Y-chromosome analysis confirms highly sex-biased dispersal and suggests a low male effective population size in bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*; **15**, 939-949.

- 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.
- Faiola, A. 2001. Animal smugglers sucking life from Amazon. In: *The Washington Post*. Sunday 9 December. <http://www.latinamericanstudies.org/brazil/smuggling.htm>. Acesso em 07 de agosto de 2014.
- Faria, P.J., Guedes, N.M.R., Yamashita, C., Martuscelli, P., Miyaki, C.Y. 2008. Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* **17**: 765-779.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **126**, 131–140.
- Gaggiotti, O.E., Lange, O., Rassman, K., Gliddon, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*: **8**, 1513–1520.
- Garrigan, D., Hammer, M.F., 2006. Reconstructing human origins in the genomic era. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, 669-680.
- Gebhardt, K.J., Waits, L.P. 2008. Cross-species amplification and optimization of microsatellitemarkers for use in six neotropical parrots. *Molecular Ecology Resources* **4**: 835-839.
- Giovanini, D. 2000. "Diagnóstico del comercio ilegal de la fauna brasileña". In: Montoya, F. N., Crane, R. (Ed.) *Actitudes hacia la fauna en Latinoamérica*. Washington. Humane Society Press.
- Guedes, N.M.R. 1993. *Biologia Reprodutiva da Arara Azul (Anodorhynchus hyacinthinus) no Pantanal-MS, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Guedes, N.M.R., Vargas, F.C., Bernardo, V.M., Cardoso, M.R.F., Faria, P.J., Araújo, F.R., Vilela, V.O., Perez, M.C.L.L. Werneck, M.R., Górski, A. 2000. Impacto da predação, ectoparasitos e mortalidade de arara-azul *Anodorhynchus hyacinthinus* no Pantanal Sul, Brasil. In: *Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Os desafios do novo milênio, III*. Embrapa-Pantanal, Corumbá, Pp.211-212.

- Guedes, N.M.R. 2004. Management and conservation of the large macaws in the wild. *Ornitologia Neotropical* 15:279-283.
- Guedes, N.M.R., Bianchi, C., Barros, Y. 2008. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: Machado, A.B.M., G.M. Drummond & A.P. Paglia (eds.) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 2 vol. MMA – Ministério de Meio Ambiente. Brasília, DF.
- Gusmão L., Butler J.M., Carracedo A., Gill P., et al. 2006. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Int. J. Legal Med*; **120**: 191-200.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity Conservation* 6: 451-476.
- Harpending, H., Rogers, A. 2000. Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*; **1**:361-85.
- Huang, X., Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**, 868-877.
- Hughes, C.R.; Melland, R.R.; Beissing, S.R. 1998. Polymorphic trinucleotide microsatellite loci for a neotropical parrot, the green-rumped parrotlet, *Forpus passerinus*. *Molecular Ecology*, v. 7, n. 9, p.1247-1248.
- IBGE, 2013. < <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=150215>> Downloaded on 16 June 2014.
- IUCN. 2004. IUCN red list of threatened species. A global species assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <www.iucnredlist.org> Downloaded on 16 June 2014.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*; **11**, 424-429.
- Juniper, A.T., Parr, M. 1998. Parrots: A Guide to the Parrots of the World. Pica Press, Sussex.
- Kahindo, C., Bowie, R.C.K., Bates, J.M. 2007. The relevance data on genetic diversity for the conservation of Afro-montane regions. *Biological Conservation*; **134**: 262-270.

- Kamara, D., Geng, T., Xu, J., Guynn, S., Hopwood, K., Smith, E.J. 2007. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers from the Budgerigar, *Melopsittacus undulatus*. *Molecular Ecology Notes*; **7**, 507-509.
- Kimura, M., Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, v.49, p.725-738.
- Klauke, N., Masello, J.F., Quillfeldt, P., Segelbacher, G. 2009. Isolation of Tetranucleotide Microsatellite Loci in the Burrowing Parrot (*Cyanoliseus patagonus*). *Journal of Ornithology*; **150**, 921-924.
- Lawrence, H.A., Taylor, G.A., Millar, C.D., Lambert, D.M. 2008. High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the Chatham Island Taiko (*Pterodroma magentae*). *Conservation Genetics* **9**: 1293-1301.
- Lei Federal nº 9.985, de 18/07/2000. Em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19985.htm>. Acesso em: 15 de junho de 2014
- Leite, K.C.E., Seixas, G.H.F., Berkunsky, I., Collevatti R.G., Caparroz, R. 2008. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. *Genetics and molecular research*; **7**(3):819-29.
- Lewinsohn, T. M., Prado P. I. 2005. How many species are there in Brazil? *Conservation Biology*, **19**: 619-624.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002 Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*, Inglaterra, **11**, 12; 2453-2465.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol*; **21**; 991–1007.
- Marshall, O.J. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical *primer* design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* **20**(15):2471-2472.
- Martins, J.M. 2008. Prospecção de loco microssatélite e análise da variabilidade genética em uma população do Mato grosso do Sul, visando à conservação da Arara-vermelha, *Ara chloroptera* (Psittacidae, Aves). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, C., 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*; **10**, 72-80.
- Miller, A.D., Good, R.T., Coleman, R.A., Lancaster, M.L., Weeks, A.R. 2013. Microsatellite Loci and the Complete Mitochondrial DNA Sequence Characterized through Next Generation Sequencing and de Novo Genome Assembly for the Critically Endangered Orange-Bellied Parrot, *Neophema chrysogaster*. *Molecular Biology Reports*; **40**: 35-42.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2000. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos sulinos. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF). Ministério do Meio Ambiente (MMA). Brasília.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2002. A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB, Cópia do Decreto Legislativo nº 2, de 5 de junho de 1992. Brasília, p.30.
- Mittermeier, R.A., Robles, G.P., Mittermeier, C.G. 1999. Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. CEMEX, Conservation International, and Agrupación Sierra Madre.
- Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Brooks T.M., Pilgrim J.D., Konstant W.R., Fonseca G.A.B., Kormos C. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Science*. 100: 10309-10313.
- Miyaki, C.Y., Guedes, N.M.R., Wajntal, A. 1999. Genetic variability and other reproductive data on a population of the Hyacinth Macaw. In: NEOTROPICAL ORNITHOLOGICAL CONGRESS, 6, Book of Abstracts, Monterrey y Saltillo, México, 4-10/10/1999, p.179.
- Miyaki, C. Y. 2001. Genética e evolução aplicadas à conservação. In: Albuquerque, J.L.B. Ornitologia e Conservação: da Ciência às Estratégias. Editora Unisul, Tubarão. Pp: 239-246.
- Mora C., Tittensor D. P., Adl S. , Simpson A. G. B., Worm B. 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol* 9(8): e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127
- Munn, C.J., Thomsen, J.A., Yamashita, C. 1989. The Hyacinth Macaw. In: Chadler, W.J (ed.). Audubon Wildlife Report. Academic Press, New York. Pp: 404-419.
- Oliveira-Marques, A.R. 2006. Filogenia Molecular das Espécies do Gênero *Ara* (Psittaciformes, Aves). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 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, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*; **29**, 2, 294-307.
- O'Reilly, P., Wright, J.M. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*, v. 47, p. 29-55.
- Ohta, T., Kimura, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research Cambridge*, v.22, p.201-204.
- 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.
- Pillay, K., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Perrin, M.R., Burke, T., Taylor, T.D. 2010. Twenty-Two Polymorphic Microsatellite Loci Aimed at Detecting Illegal Trade in the Cape Parrot, *Poicephalus robustus* (Psittacidae, Aves). *Molecular Ecology Resources*; **10**, 142-149.
- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T., Tsomondo, T. 2001. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*; **84**: 1–20.
- Pimm, S., Brooks, T. 1997. "The Sixth Extinction: How large, Where and When?". In: Forum on Biodiversity [Raven, Peter E. (ed.)]. *Nature and Human Society: The Quest for a Sustainable World: Proceedings of the 1997 Forum on Biodiversity*. Board on Biology, National Research Council, pp. 46-4.
- Pinho, J.B., Nogueira, F.M.B. 2003. Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) reproduction in the northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Ornitologia Neotropical*; **14**: 29-38.
- Presti, F.T. 2006. Caracterização da Variabilidade Genética em Espécies de Psitacídeos Ameaçados. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Presti, F.T. 2011. Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Presti, F.T., Oliveira-Marques, A.R, Silva, G.F., Miyaki, C.Y., Guedes, N.M. 2009. Notas sobre alguns aspectos da biologia da arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (Psittaciformes: Psittacidae) na região do Carajás, Pará. *Atualidades Ornitológicas*; 151: 4–7.
- Presti, F.T., Wasko, A. 2014. A Review of Microsatellite Markers and their Application on Genetic Diversity Studies in Parrots. *Open Journal of Genetics*, 4, 69-77.
- 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: ed. Sinauer. 328 p.
- Primmer, C.R., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Möller, A.P., Ellegren, H. 1997. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Res*; 7:471-482.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U., Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rede Nacional De Combate Ao Tráfico De Animais Silvestres (RENCTAS). 1º relatório nacional sobre o tráfico de animais silvestres. 2001. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.renctas.org.br/wp-content/uploads/2014/02/REL_RENCTAS_pt_final.pdf>. Acesso em: 20/11/2014.
- Reynolds, J., Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1983. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics, Bethesda*, v. 105, p. 767-779.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3a ed. Porto Alegre, Artmed.
- Rowley, H. 1997. Family Cacatuidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliot, A.E., Sargatal, J.(eds.).*Handbook of the Birds of the World*. Lynx Edicions, Barcelona. Pp: 280-477.

- Russello, M.A., Calcagnotto, D., DeSalle, R., Amato, G. 2001. Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes*; **1**: 13-15.
- Russello, M.A., Lin, K., Amato, G., Caccone, A. 2005. Additional microsatellite loci for endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Conservation Genetics*, v.6, n. 4, p. 643-645.
- Russello, M.A., Saranathan, V., Buhrman-Deever, S., Eberhards, J., Caccone, A. 2007. Characterization of polymorphic microsatellite loci for the invasive monk parakeet (*Myiopsitta monachus*). *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 6, p. 990-992.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*; **18**: p 2.
- Secco, R. S., Mesquita, A. L., 1983. Notas sobre a vegetação de canga de Serra Norte. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, Sér. Bot.*, vol. 59, p. 1-13.
- Sherwin, W.B., Timms, P., Wilcken, J., Bronwyn, H. 2000. Analysis and conservation implication of koala genetics. *Conservation Genetics*; **14**: 639-649.
- Sia, E.A., Kokoska, R.J., Dominska M., Greenwell P., Petes, T.D. 1997. Microsatellite instability in yeast: Dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Molecular and Cellular Biology*; **17**:2851-2858.
- Sibley, C.G., Ahlquist J.E. 1990. *Phylogeny and classification of birds*. Yale University Press, New Haven, Conn.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. 3rd edition. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 786 pp.
- Silva, J.M.C., Bates J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in South American cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*; **52**: 225-233.
- Silva, J.M.C., Souza M.A., Bieber A.G.D., Carlos C.J. 2003. Aves da Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. In: Leal I.R., Tabarelli M., Silva J.M.C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 237-273. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Silva, C.M. 2014. Efeitos das Oscilações Climáticas nas Distribuições Pretéritas e Futuras das Araras do Gênero *Anodorhynchus*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC), Belo Horizonte. Minas Gerais.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*; **236**: 787-792.

- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.139, p.457-462.
- Smith, K.F., Sax, D.F., Lafferty, K.D. 2006. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conserv Biol.*; **20**: 1349–57.
- Solé-Cava, A.M. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R. (ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Editora Holos, Ribeirão Preto. Pp: 172-192.
- Spielman, D., Brook, B., Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **101**, 15261–15264.
- Stouffer, P.C., Bierregaard, R.O. 1995b. Effects of forest fragmentation on understory hummingbirds in Amazonian Brazil. *Conservation Biology*, **9**: 1085-1094.
- Tavares, E.S., Yamashita, C., Miyaki, C.Y. 2004. Phylogenetic relationships among some neotropical parrot genera (Psittacidae) based on mitochondrial sequences. *The Auk*; **121**: 230-242.
- Tavares, E.S., Baker, A.J., Pereira, S.L., Miyaki, C.Y. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Syst. Biol.* **55**, 454–470.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*; **17**: 6463-6471.
- Taylor, T.D., Parkin, D.T. 2007a. Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. *Molecular Ecology Notes*; **7**: 163-167.
- Taylor, T.D., Parkin, D.T. 2007b. Characterization of 13 microsatellite loci for the Moluccan Cockatoo, *Cacatua moluccensis*, and Cuban Amazon, *Amazona leucocephala*, and their conservation and utility in other parrot species (Psittaciformes). *Conservation Genetics*; **8**: 991-994.
- Temnykh, S., Lukashova A., Cartinhour, S., DeClerck, G., Lipovich, L., McCouch, S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential, *Genome research*, vol. 11, pp. 1441-1452.
- Townsend, C.R., Begon M., Harper, J. L. 2009. *Fundamentos em Ecologia*. 3ªed. Artmed, Porto Alegre. p. 576.

- Tubelis, D.P., Tomas, W.M.. 2003. Bird species of the Pantanal wetland, Brazil. *Ararajuba* **11**: 5-37
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*; **35**: W71-W74.
- Vale. 2012. Projeto Ferro Carajás S11D: Um novo impulso ao desenvolvimento sustentável do Brasil. Em: <http://saladeimprensa.vale.com/_arquivos/Final%20-%20Book%20S11D%20-%20PORT.pdf>, Downloaded on 10 June 2014.
- Warchol, G.L. 2004. The transnational illegal wildlife trade. *Crim Justice Stud*; **1**: 57–73. Webb, J., 2001. Prosecuting wildlife traffickers: important cases, many tools, good results. 1ª. Conferência Sul Americana Sobre o Comércio Ilegal de Fauna Silvestre. Brasília, Brasil. Weber, J.L., Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet*; **2**, 1123-1128.
- Weigle, S.M., Smith, L.D., Carlton, J.T., Pederson, J. 2005. Assessing the risk of introducing exotic species via the live marine species trade. *Conserv Biol.*; **19**: 213–23.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*; **38**: 1358-1370.
- White, N., Phillips, M.J., Gilbert, M.T.P., Núñez, A.A., Willerlev, E. 2011. The evolutionary history of cockatoos (Aves Psitaciformes: Cacatuidae). in Elsevier - *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 1-8.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, v. 15, p. 323-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, vol. 4: Variability within and among Natural Populations. Chicago: University of Chicago Press.
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, n. 1, p. 1-16.