



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Maria Cecilia Pereira

**Caracterização da diversidade genética de uma população de *Neochen jubata*
(Anseriformes; Anatidae) da região do Araguaia, GO**

São José do Rio Preto

2018

Maria Cecília Pereira

**Caracterização da diversidade genética de uma população de *Neochen jubata*
(Anseriformes; Anatidae) da região do Araguaia, GO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação Biociência, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana C. Morales Corrêa e Castro

São José do Rio Preto

2018

Pereira, Maria Cecília.

Caracterização da diversidade genética de uma população de *Neochen jubata* (Anseriformes; Anatidae) da região do Araguaia, GO / Maria Cecília Pereira . -- São José do Rio Preto, 2018

47 f. : il.

Orientador: Adriana C. Morales Corrêa e Castro

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética de populações. 2. Animais - População. 3. Pato-corredor. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Maria Cecilia Pereira

**Caracterização da diversidade genética de uma população de *Neochen jubata*
(Anseriformes; Anatidae) da região do Araguaia, GO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Data de aprovação: 02 de março de 2018

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana C. Morales Corrêa e Castro
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Bianchi
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
02 de março de 2018

Agradecimentos

Agradeço imensamente a todos que fizeram parte desta jornada. Cada um a sua maneira tornou a conclusão deste trabalho possível, e ficara marcado em minha memória com muito carinho.

Agradeço a Profa. Dra. Karin Werther por ter cedido as amostras que viabilizaram esta pesquisa. A Profa. Dra. Adriana C. Morales Corrêa e Castro por sua orientação, por ter acreditado e batalhado pela conclusão deste projeto,

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e a equipe do Laboratório de Genética de Bactérias, onde parte desta pesquisa foi desenvolvida.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências do IBILCE e a CAPES pela oportunidade.

À minha família por todo apoio, carinho e compreensão durante estes dois anos. Obrigado por não desistirem de mim (risos)

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE) por todas as risadas, as lágrimas ao som do violino triste, os cafés, as altas emoções e o companheirismo. Agradeço especialmente à Amanda, Nara e Rullian, por todo o apoio moral e a parceria constante durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço profundamente aos Professores Marco Túlio e Rita, por fazerem parte desta banca, contribuindo para o enriquecimento do trabalho. E por contribuírem também para a minha formação profissional desde a graduação.

Aos amigos que ajudaram direta e indiretamente, para que este trabalho fosse concluído, especialmente às professoras Rosemary e Tatiana, Isabela Corrêa e as moradoras, ex-moradoras e agregadas da república Chá na Brasa. A amizade de vocês foi essencial para que eu conseguisse chegar ao final dessa aventura.

"No coração da ciência existe um equilíbrio essencial entre duas atitudes aparentemente contraditórias: uma abertura para ideias novas, por mais bizarras ou contrárias à intuição que sejam, e o exame cético mais implacável de todas as ideias, antigas e novas. É assim que verdades profundas são separadas de disparates profundos”.

(O Mundo Assombrado pelos Demônios - Carl Sagan)

RESUMO

A espécie *Neochen jubata* popularmente conhecida como pato-corredor ou ganso-do-Orinoco é uma das espécies de anatídeos menos conhecidas que habitam a América do Sul. Sua distribuição abrange do norte da América do Sul ao norte da Argentina, habitando praias arenosas ao longo de rios de médio e grande porte, com mata ciliar bem desenvolvida e em savanas alagadiças e extensos banhados de água doce. Segundo bases de dados científicas há atualmente três trabalhos que visam o estudo propriamente da espécie e estes são focados na descrição de seus hábitos migratórios e estimativas de abundância, não existindo ainda registros sobre o perfil genético da espécie. A região do Rio Araguaia na altura do município de Luiz Alves em Goiás recebe sazonalmente um número indeterminado de patos-corredores. Porém, existem poucas informações sobre os indivíduos que visitam este local. Este estudo tem, portanto, o objetivo de caracterizar geneticamente estes indivíduos amostrados em três distintos anos de coletas, com o uso de marcadores moleculares microsatélites e DNA mitocondrial, podendo assim, oferecer um panorama genético ainda inexistente para esta espécie e compreender melhor o relacionamento e o grau de parentesco entre estes indivíduos. Foram amostrados 60 indivíduos distribuídos em três grupos de acordo com o ano de coleta dos mesmos. Os indivíduos de *N. jubata* foram capturados às margens do rio Araguaia, na altura do distrito de Luiz Alves, Goiás, onde uma amostra de sangue foi colhida. As análises de diversidade genética revelaram baixos níveis de heterozigosidade para todos os grupos amostrados, porém, os mesmos se encontram dentro do equilíbrio proposto por Hardy-Weinberg (EHW), também foram encontrados poucos locus em desequilíbrio de ligação, confirmando a hipótese que processos evolutivos como endogamia ou deriva não estão atuando nestes grupos. Os testes de estruturação e distância genética estão em concordância que os três grupos amostrados formam uma única população devido ao seu alto compartilhamento alélico. Há um alto número de indivíduos sem nenhum grau de parentesco o que confirma os resultados do EHW, mas a presença de indivíduos com parentesco nos três anos amostrados, permite concluir que estes indivíduos constituem uma única população e possuem uma relação de fidelidade com o local. Os resultados encontrados neste estudo constituem um marco inicial para o conhecimento genético do pato-corredor que devem suscitar em muitos outros estudos genéticos.

Palavras chave: Genética de Populações. pato-corredor. Microsatélite. DNA mitocondrial.

ABSTRACT

The species *Neochen jubata* popularly known as Orinoco–goose is one of the lesser-known species of Anatidae living in South America. Its distribution ranges from northern South America to the north of Argentina, inhabiting sandy beaches along medium and large rivers, with a well-developed ciliary forest as well as wetland and extensive savanna plains. According to scientific databases, there are currently three studies that aim to study this species, and these are focused on the description of their migratory habits and estimates of abundance, there are no records on the genetic profile of the species. The region of the Araguaia River at the Luiz Alves in Goiás receives an indeterminate number of Orinoco-Goose seasonally. But there is little information about the individuals who visit this place. The objective of this study is to characterize the genetics of these individuals from three different years of capture, using microsatellite markers and Mitochondrial DNA, thus providing a genetic overview that is still non-existent for this species and better understood the relationship and the degree of association between these individuals. We sampled 60 individuals distributed in three groups according to the year of their capture. The individuals of *N. jubata* captured on the banks of the Araguaia River, and blood samples collected. Analyses of genetic diversity revealed low levels of heterozygosity. Genetic diversity analyses revealed low levels of heterozygosity for all sampled groups, but they are within the equilibrium proposed by Hardy-Weinberg (EHW), few loci in linkage disequilibrium were found. Confirming the hypothesis that evolutionary processes like inbreeding or drifting are not acting in these groups. The tests of genetic distance structuring concordance that the three sampled groups form a single population due to their high allelic sharing. The high number of individuals with no degree of kinship confirms the results of EHW. And due to the presence of individuals with kinship in the three years sampled, we conclude that these individuals constitute a single population and have a loyalty relationship with the place. The results found in this study represent an initial milestone for the genetic knowledge of the duck-runner should elicit others so that more genetic studies will be performed.

Key words: Population Genetics. Orinoco-goose. Microsatellites. Mitochondrial DNA

Lista de Figuras

- Figura 1** - Cobertura e uso da terra no bioma Cerrado, conforme mapeamento realizado com base em imagens Landsat ETM+ de 2002 15
- Figura 2** - Vista da margem do rio Araguaia com indivíduos de vida livre de *N. jubata* durante um dos períodos de captura de setembro a outubro 2014. 20
- Figura 3** - Mapa com a localização de onde ocorreram as capturas de *N. jubata* nos anos 2010, 2013 e 2014 cujas amostras de sangue foram utilizadas neste trabalho..... 21
- Figura 4** - Exemplar de *N. jubata* capturado e contido manualmente, observa-se a muda das penas..... 22
- Figura 5** – Representação gráfica do gel de poliacrilamida a 6% com os alelos de DNA microssatélite amplificados para os indivíduos de *N. jubata* (nº voucher 1 a 20) para o locus SMO6 e suas posições em relação ao marcador molecular de 50pb..... 26
- Figura 6** - Cálculo feito pelo Structure Harvester que determina o valor mais provável de agrupamentos (K) para os 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 34
- Figura 7** - Gráfico da análise Bayesiana com a distribuição dos indivíduos de *N. jubata* capturados no Rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. Indivíduos alocados pelo compartilhamento de padrões genéticos similares em dois grupos representados pelas cores vermelho e verde. 34
- Figura 8** - Gráfico bayesiana indicando a presença de migrantes, apontados pelo programa Structure para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 35

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista dos indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, número de tombo (voucher) do Laboratório de Biologia Evolutiva –LaBE e sexo determinado pelas análises moleculares..... 22

Tabela 2 - Características dos cinco pares de primers de DNA microssatélites utilizados para amplificação da variabilidade genética dos indivíduos de *N. jubata*, provenientes do rio Araguaia, GO. 24

Tabela 3 - Frequência dos alelos identificados nos cinco loci microssatélite para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. Alelos exclusivos encontrados indicados com asterisco. 29

Tabela 4 - Comparação par a par de loci dos genótipos dos indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014 para teste de Equilíbrio de Ligação. 30

Tabela 5 - Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado em cinco loci de microssatélite para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no Rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 30

Tabela 6 - Frequência dos alelos identificados para o agrupamento dos genótipos de machos e fêmeas de 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no Rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. Alelos exclusivos encontrados indicados com asterisco. 31

Tabela 7 - Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado em cinco loci de microssatélite para grupos de machos e fêmeas de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 32

Tabela 8 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando cinco loci microssatélites sem análise hierárquica, para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 33

Tabela 9 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando de cinco loci microssatélites para com agrupamentos de machos e fêmeas, sem análise hierárquica, para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 33

Tabela 10 - Análise de distância genética realizada para os 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO alocados de acordo com seu ano de coleta. 35

Tabela 11 - Análise da relação par a par de parentesco feita com 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. 36

Tabela 12- Análise da relação par a par de parentesco feita com 60 indivíduos de *N. jubata* indivíduos capturados no rio Araguaia, GO testando diferentes agrupamentos. .. 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Neochen jubata</i>	12
2.2 Ameaças ambientais a <i>Neochen jubata</i>	14
2.3 DNA microssatélites	17
2.4 DNA mitocondrial	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Obtenção do material biológico	20
3.2 Obtenção do material genético	23
3.2.1 Extrações do DNA total	23
3.2.3 Amplificação dos <i>loci</i> de DNA microssatélites	24
3.3 Caracterização genética	26
3.3.1 Análise de distância e diversidade haplotípica para as sequências de DNA mitocondrial	26
3.3.2 Análise genotípica e diversidade genética para alelos de DNA microssatélite	26
3.3.3 Distância e distribuição da diversidade genética de <i>N. jubata</i> amostrados	27
3.3.4 Análise de Parentesco	28
4. RESULTADOS	28
4.1 Análise das sequências de DNA mitocondrial	28
4.2 Análise genotípica dos <i>loci</i> de DNA microssatélite	29
4.3 Distância e distribuição da diversidade genética de <i>Neochen jubata</i>	34
4.4 Parentesco	35
5. DISCUSSÃO	36
5.1 Análise das sequências de DNA mitocondrial	36
5.2 Análise genotípica dos <i>loci</i> de DNA microssatélites	38
5.3 Distância e distribuição da diversidade genética de <i>N. jubata</i>	38
5.4 Parentesco	39
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8. ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Neochen jubata* (Spix, 1825) (Anseriformes; Anatidae), popularmente conhecida como pato-corredor ou ganso-do-Orinoco é uma das espécies de anatídeos menos conhecidas que habitam a América do Sul (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Sua distribuição abrange do norte da América do Sul ao norte da Argentina, habitando praias arenosas ao longo de rios de médio e grande porte, com mata ciliar bem desenvolvida e também em savanas alagadiças e extensos banhados de água doce (CARBONERAS, 1992; SICK, 1997).

Segundo bases de dados científicas há atualmente três trabalhos que visam o estudo propriamente da espécie e estes são focados na descrição de seus hábitos migratórios e estimativas de abundância, não existindo ainda registros sobre o perfil genético da espécie (DAVENPORT; NOLE BAZÁN; CARLOS ERAZO, 2012; ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014; KRIESE, 2004). O único estudo realizado com essa espécie no Brasil teve por objetivo estimar a abundância sazonal de uma população de *N. jubata* na Bacia do Juruá, Amazonas (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). De acordo com a IUCN, as populações da espécie são consideradas como “quase ameaçada” com um declínio populacional classificado como lento a moderado. No estado de São Paulo a espécie encontra-se extinta na natureza. Seu declínio populacional deve-se principalmente as atividades antrópicas, como caça e a destruição de seu habitat (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014; IUCN, 2018).

A região do rio Araguaia na altura do distrito de Luiz Alves, GO recebe sazonalmente um número indeterminado de patos-corredores. E existem poucas informações sobre os indivíduos que visitam este local, como se constituem uma mesma população com indivíduos aparentados que retornam ao mesmo local ao longo dos anos ou se são diferentes aves sem grau de parentesco que convergem a esta região anualmente.

Este trabalho é pioneiro na investigação da distribuição da variabilidade genética de indivíduos de *N. jubata*, de modo que é objetivo deste trabalho caracterizar geneticamente os indivíduos desta espécie amostrados nesta área em três distintos anos de coletas, com o uso de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial, visando, inferir se existe algum grau de parentesco entre estes indivíduos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Neochen jubata*

O pato-corredor é descrito como um ganso tropical, endêmico da América do Sul, habitando rios próximos a coberturas florestais ou áreas de savana úmida. Pertence a ordem dos Anseriformes, que compreende a grande maioria das aves aquáticas. Esta ordem abrange um total de 150 espécies distribuídas em 48 gêneros, que se encontram alocados em três famílias distintas, Anhimidae, Anseranatidae e Anatidae (DONNE-GOUSSÉ; LAUDET; HÄNNI, 2002; GONZALEZ; DÜTTMANN; WINK, 2009)

Alocados na família Anatidae estão os patos, cisnes e gansos, sendo esta a família mais numerosa com 41 gêneros e 147 espécies. Constitui um grupo bem diversificado e também é um dos mais bem estudados no mundo, principalmente devido à sua importância histórica para a caça, domesticação e avicultura (LIVEZEY, 1986). Os membros desta família compartilham como característica comum à impermeabilização das penas, a partir da secreção de óleos e a presença de membranas interdigitais nos pés proporcionando maior adaptação à vida aquática (LIVEZEY, 1986).

As primeiras filogenias propostas para a família Anatidae, utilizavam dados morfológicos e comportamentais (DELACOUR; MAYR, 1945) e agrupavam *N. jubata* e outras espécies do gênero *Tadorna* na tribo Tadornini e trabalhos moleculares mais recentes apoiam esta divisão (BULGARELLA et al., 2014; DONNE-GOUSSÉ; LAUDET; HÄNNI, 2002; GONZALEZ; DÜTTMANN; WINK, 2009). Em contraposto a esta classificação, propõem-se sua inserção dentro da nova subfamília, Tadorninae (LIVEZEY, 1997). Apesar das divergências, estas diferentes filogenias evidenciam que o pato-corredor forma um clado monofilético com outras espécies do gênero *Chloephaga*, sendo que *C. melanoptera* apresenta-se como irmã de *N. jubata*.

A IUCN (2018) estima que existem aproximadamente entre 10.000 a 25.000 indivíduos de patos-corredores de vida livre, e acredita-se que este número está em declínio. Estas populações encontram-se na Venezuela, Colômbia, Bolívia e no Brasil no Parque Estadual do Cantão e Ilha do Bananal, principalmente nos meses centrais do ano quando, em função da estiagem, se formam bancos de areia nas margens do rio do Côco, Javaés e Araguaia (PINHEIRO; DORNAS, 2009). A espécie também ocorre a leste dos Andes, com apenas um relato do oeste dos Andes até o momento (HIDALGO et. al., 2010)

Pouco se sabe sobre a ecologia desta espécie, sabe-se que em condições naturais alimentam-se de substrato vegetal que são presumivelmente a base de sua dieta e também

de variedade de invertebrados. Raramente são encontrados bandos numerosos de *N. jubata*, grupos de pós-acasalamento de cinco a vinte indivíduos parecem ser as maiores agregações observadas. Normalmente em vez disso, os indivíduos costumam formar pares ou grupos familiares ao longo do ano (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014; LUCA; DEVELEY; OLMOS, 2006; PINHEIRO; DORNAS, 2009).

Carboneras (1992) pontua a espécie como não migratória, mas um estudo realizado sobre a abundância sazonal de *N. jubata* na bacia do Juruá, AM, sugere que esta população migre para outras regiões durante a estação de chuvas, uma vez que restrições impostas pelo regime das inundações sazonais e pela dinâmica dos rios determinam o uso do habitat nesta espécie (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Outra população de pato-corredor na região do rio Araguaia apresenta o mesmo comportamento de ocorrência sazonal, bandos de até 32 indivíduos costumam ser registrados durante o período de secas, e são conhecidos por deixar a área quando o volume de águas aumenta entre dezembro e maio, porém não existe nenhuma informação sobre para onde a população vai após deixar o rio Araguaia (LUCA; DEVELEY; OLMOS, 2006). Estas informações indicam que o comportamento migratório engloba outras populações além da bacia de Juruá.

O período de cheias sazonais que inundam locais de forrageio pode ser um dos principais motivos para a evolução desse comportamento migratório nas populações dos patos-corredores e outras aves aquáticas (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Um estudo mais recente, apresenta a primeira descrição de uma migração de grande distância para a espécie, acompanhando um casal adulto, por telemetria em seu percurso de 655 km de distância, partindo do Parque Nacional de Manú, Peru até seu destino *Llanos de Moxos* ao norte da Bolívia, mostrando que a espécie é capaz de realizar grandes migrações (DAVENPORT; NOLE BAZÁN; CARLOS ERAZO, 2012). Os movimentos de migração parcial podem ser essenciais para a evolução do comportamento migratório, pois caracteriza-se como uma transição entre indivíduos residentes e indivíduos com migração completa (JAHN et al., 2010).

O grande número de jovens bem desenvolvidos observados durante os meses de setembro a outubro ao longo da bacia do Juruá, AM apoia a ideia de que a reprodução ocorre durante os meses de inverno mas, nenhuma observação sobre o comportamento de cópula da espécie foi registrado (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Poucos ninhos desta espécie foram encontrados na natureza, estes normalmente estão situados em cavidades de árvores ocas, onde a fêmea põe em média oito ovos e a incubação dura cerca de trinta dias. Após a eclosão, os machos se juntam à família para auxiliar na proteção do filhote.

2.2 Ameaças ambientais a *Neochen jubata*

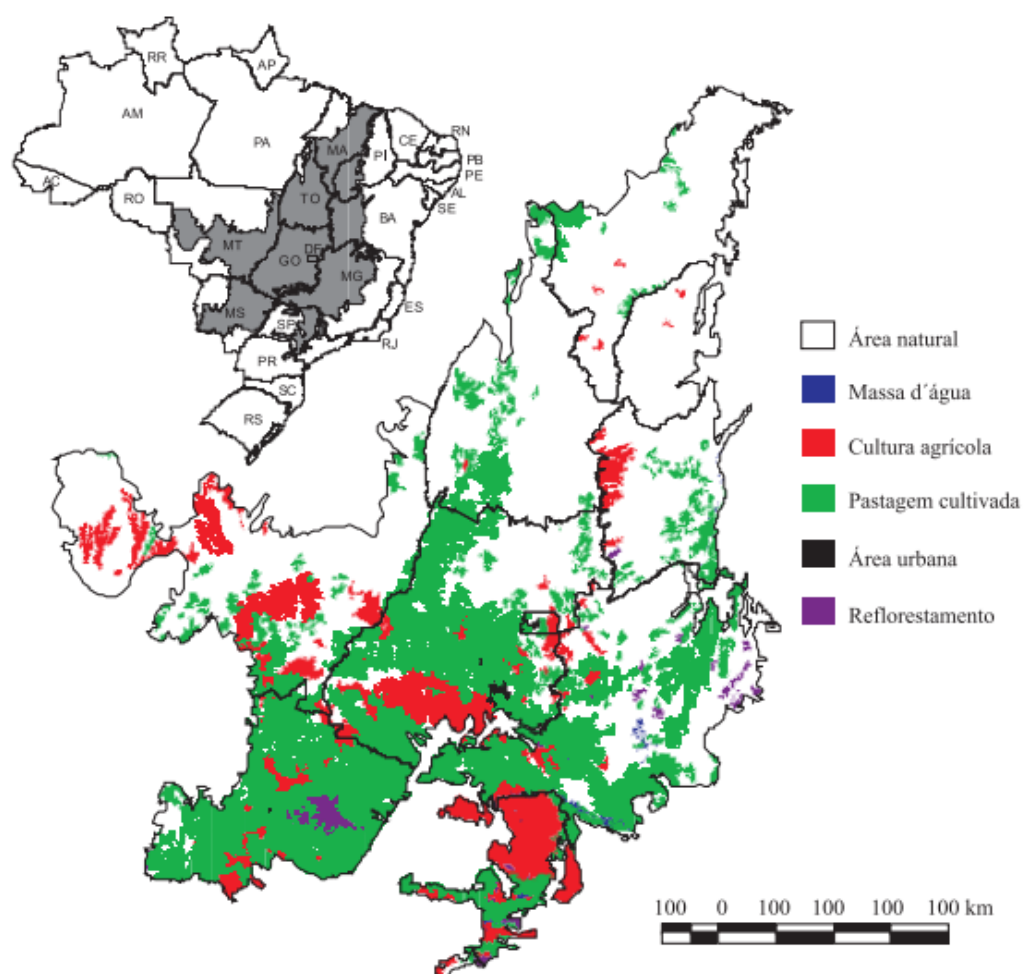
De acordo com a IUCN (2018) o pato-corredor é uma espécie considerada quase ameaçada, com uma taxa de declínio populacional lento a moderado. Os maiores riscos a sobrevivência da espécie são a caça e a perda de habitat. Os seres humanos têm há muito tempo um relacionamento próximo com os Anatidae, refletidos em seu uso generalizado como fonte de alimentos (LIVEZEY, 1986). Nos tempos modernos, os conservacionistas prestaram especial atenção a Anatidae para minimizar o impacto da caça recreativa e tentar resolver problemas crescentes de danos agrícolas causado pelas espécies silvestres, como a redução de colheitas (GREEN, 1996). Apesar da preocupação global com a conservação dos anatídeos, no Brasil os estudos acerca dos impactos de atividades antrópicas sobre a espécie ainda são escassos.

Apesar de a faixa geográfica de distribuição do pato-corredor abrigar algumas unidades de conservação, a maioria são áreas de proteção ambiental (APA), estas reservas possuem um regime de uso sustentável, ou sejam são ocupadas por comunidades ribeirinhas ou indígenas e também podem apresentar outras atividades extrativistas. Essas populações humanas são tipicamente dependentes da vida selvagem local para suprir suas necessidades alimentares (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Estes locais de gestão comunitária de recursos possuem menos restrições em comparação com reservas de proteção integral (PERES; ZIMMERMAN, 2001).

Um estudo realizado ao longo rio Juruá, na Amazônia Ocidental Brasileira entrevistando moradores das comunidades locais, registrou que os patos-corredores foram mortos e consumidos em onze das vinte e cinco aldeias monitoradas, principalmente devido ao seu tamanho corporal e à sua preferência por habitats abertos – que o tornam um alvo visível para caçadores (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Durante o período de um ano deste estudo, vinte e sete indivíduos foram mortos exclusivamente por caçadores que viviam em aldeias ao longo da margem do rio principal e mesmo em períodos onde os animais não eram observados pelos pesquisadores, foram registradas mortes de *N. jubata* por caçadores (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014). Mesmo que o número de mortes por caça possa ser considerado baixo, a exposição contínua desta espécie a caçadores que compartilham da mesma área de vivência oferece um risco para esta população. Esse risco de mortalidade aumenta ainda mais durante a época de reprodução, quando machos e fêmeas ficam grandes períodos de tempo juntos aos ninhos (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014).

Outro fator de risco é a conversão de cobertura vegetal em áreas agrícolas. Diversos biomas brasileiros estão sofrendo grandes ameaças devido ao desmatamento acelerado. A região do Cerrado, que abrange estados como Goiás, Mato Grosso e Tocantins, onde se encontram outras populações conhecidas de *N. jubata* é uma das mais afetadas (**Figura 1**), com aproximadamente 80% de sua vegetação original já convertidos em pastagens e principalmente plantações de soja (KLINK; MACHADO, 2005; MYERS et al., 2000).

Figura 1 - Cobertura e uso da terra no bioma Cerrado, conforme mapeamento realizado com base em imagens Landsat ETM+ de 2002



Fonte: (PROBIO - SANO et al., 2008).

O Cerrado atualmente, possui uma porcentagem muito pequena de seu território legalmente protegido por Unidades de Conservação, perfazendo um total de apenas 8,7%, dos quais 3,2% desse total são unidades de conservação de proteção integral e 5,5% de unidades de conservação de uso sustentável. (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

A região do Cantão, no estado do Tocantins, abriga uma das maiores populações de pato-corredor que se tem registrado até o momento. Entretanto, a APA - Ilha do Bananal/Cantão corre o risco de ter sua área reduzida pelo governo estadual para a ampliação das áreas de cultivo de arroz irrigado, monocultura de grãos, cana-de-açúcar e oleaginosas. Estas duas últimas já são muito presentes na paisagem local. Estas atividades antrópicas podem gerar grande interferência no fluxo da biota local, uma vez que, no período das cheias, a maioria das espécies aquáticas buscam refúgio nas várzeas transformadas em monoculturas de arroz irrigado (PINHEIRO, R. T; DORNAS, 2009).

A crescente perda e fragmentação de habitats naturais, principalmente nos últimos séculos, têm contribuído significativamente para o declínio e isolamento populacional de espécies selvagens, ocasionando até mesmo extinções locais, como por exemplo o mutum-do-nordeste (*Mitu mitu*), a arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*) e o pato-mergulhão (*Mergus octosetaceus*) (MARINI; GARCIA, 2005; PITMAN et al., 2002). Sugere-se que a predação e o parasitismo de ninhos são os principais fatores relacionados à perda de espécies de aves em áreas fragmentadas, e suas taxas aumentam conforme diminui o tamanho dos fragmentos (DONOVAN et al., 1995; HERKERT et al., 2007). A sobrevivência de jovens, a disponibilidade de alimento e a qualidade do habitat também podem ser afetadas negativamente em paisagens fragmentadas, comprometendo a permanência em longo prazo das espécies que vivem nesses locais (LUCK, 2003).

Outro problema ambiental que poderia ameaçar sobrevivência do pato-corredor são os projetos hidrelétricos planejados ou aprovados em sua faixa geográfica de ocorrência. Esta espécie é considerada especialista em relação ao seu habitat, e as inundações destruiriam suas áreas de forrageamento e nidificação (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014).

2.3 A importância da investigação dos parâmetros genéticos para a conservação

Nos últimos séculos o crescimento populacional humano tem provocado uma enorme crise na biodiversidade devido as grandes modificações nos sistemas naturais causadas pela atividade humana. A ação antrópica tem sido responsável pela extinção de espécies e populações ou causando uma drástica diminuição em sua distribuição e densidade, aumentando assim, o seu risco de extinção a curto e longo prazo (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). A diversidade genética é necessária para as espécies manterem sua capacidade de adaptação frente às diversas pressões seletivas como doenças e mudanças

ambientais, afim de assim garantir seu sucesso reprodutivo (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Dois fenômenos genéticos possuem grande importância, pois podem aumentar o risco de extinção, a deriva genética e o endocruzamento, os quais são inevitáveis em populações isoladas e de tamanho reduzido (AVISE; HAMRICK, 1996; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). A deriva genética pode levar a eliminação de alelos ao acaso, gerando ao longo das gerações a perda de variabilidade genética. Além do que, uma vez que em populações pequenas a deriva genética predomina e os efeitos da seleção natural são tipicamente reduzidos ou até mesmo eliminados, alelos deletérios podem se tornar fixados (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). O endocruzamento, por sua vez, aumenta os níveis de homozigosidade populacional e a probabilidade de expressão de genes recessivos deletérios, fenômeno conhecido como “depressão por endocruzamento” (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

Nas últimas décadas, a evolução da genética molecular trouxe ferramentas que possibilitam estimar a diversidade genética em diferentes espécies, identificando e quantificando diferenças entre populações. Os chamados marcadores moleculares, ou seja, qualquer loco gênico ou seu produto, que apresenta variabilidade que permita estudar uma questão biológica, têm sido muito utilizados para estudos populacionais (AVISE, 1994). Por sua vez, a utilização de diferentes marcadores com distintos padrões de herança e taxas de mutação proporciona um melhor entendimento dos processos envolvidos na distribuição da variação genética em uma espécie, uma vez que as diferentes taxas de mutação e modo de herança podem levar à identificação de padrões distintos de variabilidade e de subdivisão populacional (AVISE, 1994; AVISE, 2000). Averiguações sobre a diversidade genética são um importante primeiro passo para poder inferir os parâmetros biológicos de uma espécie, principalmente para aquelas que ainda são pouco estudadas, como populações ameaçadas ou de pequena distribuição (KURO-O et al., 2010; MILLER et al., 2010; SOLOVYEVA; PEARCE, 2011).

2.3 DNA microssatélites

Os marcadores moleculares baseados na amplificação de microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples (*simple sequence repeats SSRs*), compreendem uma classe de DNA repetitivo composto por pequenas sequências de um a quatro nucleotídeos repetidos adjacentes, são codominantes, hipervariáveis, que apresentam variações de comprimento entre os alelos e encontram-se distribuídos aleatoriamente pela região eucromática do genoma, embora sejam raros nas regiões codificadoras

(SCHLÖTTERER, 2000). São encontrados tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos e apresentam um alto grau de polimorfismo (DAKIN; AVISE, 2004). Além dessas características, esse tipo de marcador molecular é relativamente fácil de amplificar por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SCHLÖTTERER, 1998). Desta forma, os microssatélites são marcadores ideais para estudos de estrutura genético-populacionais.

A origem dos polimorfismos em *loci* microssatélites parece ser devido a eventos de deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA na subfase S do ciclo celular, aumentando ou diminuindo uma ou mais unidades de repetição (SCHLOTTERER; TAUTZ, 1992). A alta taxa de mutação leva ao aparecimento recorrente de variantes alélicas de mesmo tamanho que levam à homoplasia, o que requer cuidado nas análises. Por isso, microssatélites são geralmente utilizados em estudos intraespecíficos e quase nunca para comparações interespecíficas. No entanto, para estudos com uma só espécie, este tipo de marcador molecular é vantajoso, pois apresenta uma alta taxa de mutação, permitindo que indivíduos e populações diferentes apresentem assinaturas genéticas diferenciadas e sinais de estruturação. Podem ser utilizados para a determinação do grau de relacionamento entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie (BLOUIN et al., 1996), e análise de ascendência (ISAGI et al., 2004). Os microssatélites também podem avaliar os níveis de endogamia de uma população, analisar sua história demográfica, com a ocorrência de gargalos populacionais (HOELZEL et al., 2002), e inferir o tamanho efetivo de uma população (HAUSER et al., 2002).

Os microssatélites têm sido amplamente utilizados para o estudo dos anatídeos, como por exemplo na análise de diversidade genética e estruturação do pato-do-mato (*Cairina moschata*) e pato-real (*Anas platyrhynchos*). Na região da província de Mazandaran ao norte do Irã, utilizando treze marcadores de microssatélites, verificou-se baixos níveis de heterozigossidade para esta espécie, indicando que a diversidade genética é baixa dentro e entre as populações. A análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que nenhum dos sítios do DNA microssatélites estavam em equilíbrio. Os microssatélites também foram utilizados para investigar o nível de fluxo gênico entre duas populações de *King eider* (*Somateria spectabilis*) na região do ártico do hemisfério Norte, conhecidas por terem diferentes áreas de reprodução (AHMADI et al., 2007; PEARCE et al., 2004). Relações de parentesco também têm sido solucionadas pelo uso destes marcadores, como em *Common eider* (*Somateria molíssima*) onde as análises demonstraram que quando comparado com as estimativas médias de relação interindividual para toda a colônia, níveis significativamente maiores de parentescos foram encontrados entre fêmeas que chegavam às colônias em um

mesmo grupo de vôo, assim como os grupos que partem das colônias com filhotes. Os níveis de parentesco também apresentaram um aumento significativo em relação a proximidade dos ninhos (MCKINNON; GILCHRIST; SCRIBNER, 2006) para esta espécie.

2.4 DNA mitocondrial

O uso do DNA mitocondrial nas últimas décadas possibilitou a elucidação dos processos evolutivos e passado demográfico de populações e espécies (BALLARD; WHITLOCK, 2004). Constitui-se como um genoma circular de tamanho reduzido possuindo entre 16.000 a 20.000 pares de bases (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). O DNA mitocondrial codifica proximadamente 37 genes, onde 24 destes codificam os componentes de RNA da maquinaria de tradução (22 tRNAs e dois rRNAs). Os treze genes adicionais codificam para subunidades da cadeia de transporte de elétrons onde a energia da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas é finalmente usada para síntese de ATP (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Este genoma em espécies animais é herdado é herdado maternalmente. No grupo dos vertebrados, apresenta uma frequência extremamente baixa de rearranjos por recombinação, inversões ou transposições e altas taxas de inserções e deleções na região não codificadora, D-loop, que fazem com que sequências mitocondriais se modifiquem cerca de cinco a dez vezes mais rápido que sequências nucleares de uma única cópia (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Embora o DNA mitocôndrial seja um marcador amplamente utilizado, seu uso também possui limitações. Este marcador elucida estritamente processos históricos matrilineo. Se a história evolutiva entre machos e fêmeas diferirem em uma espécie, este marcador não refletiria a história da espécie como um todo, mas da porção feminina. Além destas restrições, autores argumentaram recentemente que a evolução do DNA mitocôndrial é não-neutra como proposto inicialmente (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Apesar das críticas a este marcador, o DNA mitocondrial ainda é uma ferramenta muito utilizada para os estudos de populações de anatídeos, complementando os dados de marcadores microssatélites em estudos de estrutura populacional e diversidade genética, como do *King Eider* (*Somateria spectabilis*), onde foi constatado ausência de estrutura genética espacial entre populações desta espécie que habitam a região ártica do hemisfério norte. As análises sugerem que o crescimento histórico da população e fluxo de gênico podem ter homogeneizado as frequências genéticas. A presença de vários haplotipos de mtDNA únicos entre as aves da Groenlândia sugere que o fluxo de genes pode agora ser

mais limitado entre o oeste e o leste do Ártico, o que é consistente com os dados de bandas de hibridização (PEARCE et al., 2004). O DNA mitocondrial também tem sido utilizado para a verificação dos parâmetros de diversidade genética e filogenéticos, a fim de fornecer informações para futuros esforços de conservação de espécies ameaçadas, como o merganso chinês (*Mergus squamatus*) que habita o paleártico, com sítios de reprodução limitados a China e Rússia. Os resultados apontaram que esta espécie apresenta níveis substancialmente mais baixos de diversidade genética de mtDNA do que outros patos marinhos (SOLOVYEVA; PEARCE, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material biológico

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas amostras de sangue de 60 indivíduos, conservados em álcool absoluto, da espécie *N. jubata* provenientes da colheita de indivíduos de vida livre capturados no rio Araguaia nos anos 2010, 2013 e 2014 (**Figura 2**). As amostras foram cedidas pela Prof. Dra. Karin Werther, lotada no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – FCAV-UNESP.

Figura 2 - Vista da margem do rio Araguaia com indivíduos de vida livre de *N. jubata* durante um dos períodos de captura de setembro a outubro 2014.

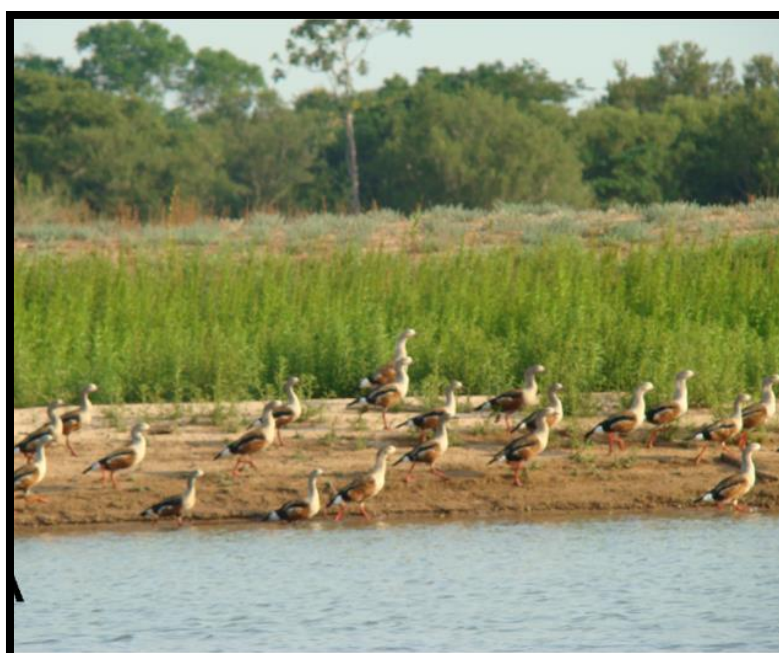
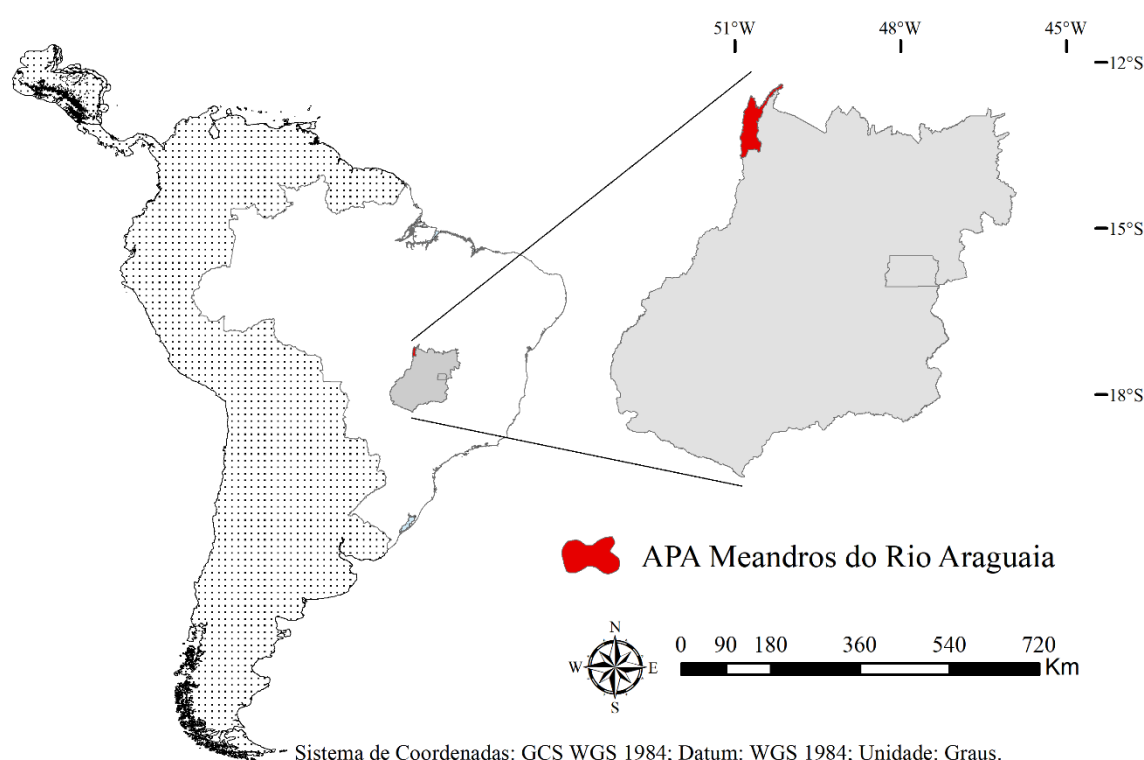


Imagem cedida pela Profa. Dra Karin Werther.

O local das capturas dos indivíduos de *N. jubata* se deu ao longo das margens da Área de Proteção Ambiental (APA) na região do Araguaia (13°17'49.0"S 50°36'16.5"W a 13°30'00.0"S 50°43'29.51"W) e em uma das bases do Centro Nacional de Manejo e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (13°13'02.1"S 50°34'37.8"W) localizada no noroeste goiano, próxima ao distrito de Luiz Alves, Município de São Miguel do Araguaia, GO (**Figura 3**).

Figura 3 - Mapa com a localização de onde ocorreram as capturas de *N. jubata* nos anos 2010, 2013 e 2014 cujas amostras de sangue foram utilizadas neste trabalho.



Fonte: < <https://portaldemapas.ibge.gov.br/> > data de acesso, 29 de janeiro de 2018.

As capturas foram realizadas nos meses de setembro a outubro dos referidos anos, coincidindo com a época de muda das penas das asas, o que impossibilita o vôo batido por esses animais, facilitando assim a captura manual (**Figura 4**). Para a identificação temporária dos animais capturados, optou-se pelo corte das penas na cabeça dos animais para evitar a recaptura durante a semana de trabalho. Os animais do ano de 2010 foram sexados apenas por meio de técnicas moleculares, já os de 2013 e 2014 foram sexados pelo som emitido e confirmado também por técnicas moleculares (**Tabela 1**).

Figura 4 - Exemplar de *N. jubata* capturado e contido manualmente, observa-se a muda das penas.



Imagem cedida pela professora Karin Werther.

Tabela 1 - Lista dos indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, número de tombo (*voucher*) do Laboratório de Biologia Evolutiva –LaBE e sexo determinado pelas análises moleculares.

ANO 2010		ANO 2013		ANO 2014	
Número <i>voucher</i>	SEXO	Número <i>voucher</i>	SEXO	Número <i>voucher</i>	SEXO
LaBE		LaBE		LaBE	
1	Macho	22	Fêmea	42	Fêmea
2	Macho	23	Macho	43	Fêmea
3	Fêmea	24	Fêmea	44	Macho
4	Macho	25	Fêmea	45	Macho
5	Macho	26	Macho	46	Fêmea
6	Macho	27	Macho	47	Fêmea
7	Fêmea	28	Macho	48	Macho
8	Macho	29	Macho	49	Macho
9	Macho	30	Macho	50	Fêmea
10	Macho	31	Macho	51	Fêmea
11	Fêmea	32	Macho	52	Macho
12	Macho	33	Macho	53	Fêmea

13	Macho	34	Macho	54	Fêmea
14	Fêmea	35	Fêmea	55	Fêmea
15	Fêmea	36	Fêmea	56	Macho
16	Macho	37	Macho	57	Fêmea
17	Fêmea	38	Fêmea	58	Fêmea
18	Fêmea	39	Fêmea	59	Fêmea
19	Macho	40	Macho	60	Fêmea
20	Macho	41	Macho		
21	Fêmea				
Total: 32 machos; 28 fêmeas					

As amostras de sangue cedidas foram processadas e atualmente encontram-se armazenadas no Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), localizado no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, também na FCAV–UNESP. A realização dos procedimentos de biologia molecular e obtenção do material genético de interesse foi realizada no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, sendo posteriormente depositado na Coleção Molecular do LaBE.

3.2 Obtenção do material genético

3.2.1 Extrações do DNA total

O DNA das amostras de sangue foi extraído a partir do método fenol-clorofórmio, desenvolvido pelo Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular–UFMG (LBEM, 2018), que consiste na lavagem dessas amostras com solução salina para hemólise da membrana das hemácias, seguida pela lise do material utilizando Proteinase K em banho-maria a 55°C. O DNA é então extraído pela adição de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico em proporções de 25:24:1 ao material lisado. O fenol é retirado adicionando-se clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). De modo que o material genético presente no sobrenadante é então precipitado pela adição de acetato de amônio e isopropanol. Por fim, o sobrenadante é descartado e o DNA preso a parede do tubo é ressuspendido com tampão *Low TE*, pré-aquecido em banho-maria a 35°C por 30 minutos e por fim armazenado em freezer.

3.2.2 Amplificação, sequenciamento e alinhamento das sequências de DNA mitocondrial

A região controle do DNA mitocondrial foi amplificada utilizando os pares de *primers*, *forward*: L78-GTTATTTGGTTATGCATATCGTG e *reverse*: H774-CCATATACGCCAACCGTCTC (SORENSEN et al., 1999; SORENSON; FLEISCHER, 1996). As reações de amplificação via PCR (*Polymerase chain reaction*) foram padronizadas para um volume final de 25 µl contendo 12,5 µl de *Green MasterMix* - Promega, 1 µl dos *primers forward* e *reverse* a 2mM, 8,5 µl de água deionizada e 2,0 µl de DNA com 100ng. As reações foram amplificadas no termociclador *MJ Research PTC-100 Thermal Cycler - GMI Inc*, as condições da PCR foram: um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 7 minutos, seguido por 45 ciclos de 94°C por 20 segundos, 49°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. A checagem final do processo foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação da presença das bandas esperadas. Os produtos amplificados foram purificados com conjunto de reagentes *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante.

O DNA mitocondrial amplificado foi sequenciado no CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP utilizando o sequenciador automático de DNA ABI 3730 XL *DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). As sequências do DNA mitocondrial foram então alinhadas com o uso do programa CLUSTAL W (LARKIN et al., 2007). A visualização da matriz de dados e eventuais equívocos de alinhamento foram corrigidos manualmente utilizando o programa BioEdit v7.0.9.0 (HALL, 1999)

3.2.3 Amplificação dos *loci* de DNA microssatélites

Os *loci* de DNA microssatélite foram amplificados utilizando-se cinco pares de *primers* desenvolvidos para outras espécies de anatídeos (**Tabela 2**) e com comprovada aplicabilidade para membros da subfamília Tadorninae (MAAK et al., 2003; PAULUS; TIEDEMANN, 2003).

Tabela 2 - Características dos cinco pares de *primers* de DNA microssatélites utilizados para amplificação da variabilidade genética dos indivíduos de *N. jubata*, provenientes do rio Araguaia, GO.

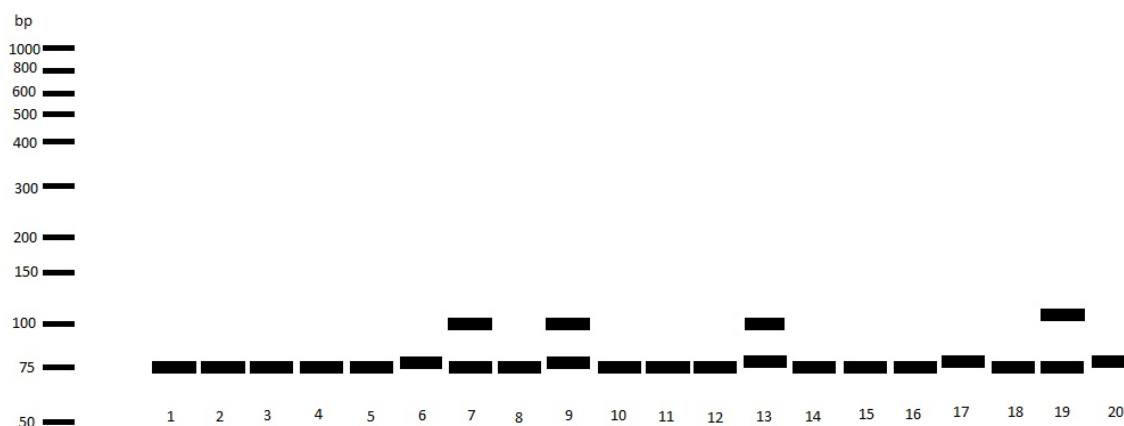
Locus	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de Anelamento	Motivo repetido
*Smo6	F: GGGGTGGGAAAGAAGCAGTTTAG	65 °C	(TG) ₁₈ T4(TG) ₂

	R: TCCTGGGACTTTGAAAGTGGCTC		
*Smo8	F: TGCCTTATAGGATGTCACTCTTC	54 °C	(TG) ₁₁
	R: AAAATACTATGCTCGTTTCAAAA		
*Smo10	F: TCCTAGCGACAGCAATTCTAATG	50 °C	(TG) ₃₁
	R: CATTGTTTCATTGTTTCTTCTTCA		
*Smo1	F: CTTAAGGTATTGTGCTTTATA	54 °C	(GA) ₁₇
	R: TGGTCCAAAGGGTGTTCAGAA		
**APH08	F: AAA GCC CTG TGA AGC GAG CTA	58 °C	(CA) ₁₂
	R: TGT GTG TGC ATC TGG GTG TGT		

* Paulus *et al.*, 2003; ** Maak *et al.*, 2003.

As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 25 µl contendo 12,5 µl de *Green MasterMix* - Promega, 1 µl dos primers *foward* e *reverse* a 2mM, 8,5 µl de água deionizada e 2,0 µl de DNA com 100ng. As reações foram amplificadas no termociclador *MJ Research PTC-100 Thermal Cycler* - *GMI Inc* nas seguintes condições: um ciclo a 94 °C por 5 min, 88 °C por 1 min; três ciclos 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento específica para cada locus (**Tabela 2**) por 1 min; 72 °C por 1 min; 38 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento –3 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 10 min. Após a confirmação da amplificação dos loci de microssatélite o produto da PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida 6% onde foi realizada a coloração com prata para visualização dos alelos de microssatélite. Os géis para os cinco loci foram analisados e cada alelo foi caracterizado por seu tamanho e sua posição no gel em relação ao marcador de peso molecular de 50bp (*Jena Bioscience*) (**Figura 5**). Uma tabela com todos os indivíduos genotipados para todos os *loci* foi elaborada para a realização das análises genéticas (**Anexo 1**).

Figura 5 – Representação gráfica do gel de poliacrilamida a 6% com os alelos de DNA microssatélite amplificados para os indivíduos de *N. jubata* (nº voucher 1 a 20) para o locus SMO6 e suas posições em relação ao marcador molecular de 50pb.



3.3 Caracterização genética

3.3.1 Análise de distância e diversidade haplotípica para as sequências de DNA mitocondrial

O programa MEGA v.7 (TAMURA et al., 2013) estimou a distância genética entre indivíduos de *N. jubata* amostrados nos anos de 2010, 2013 e 2014, a partir de uma análise de similaridade, utilizando o modelo de Kimura dois-parâmetros (KIMURA, 1980). O número de haplótipos e sítios polimórficos foram obtidos a partir do programa DnaSP 7 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

3.3.2 Análise genotípica e diversidade genética para alelos de DNA microssatélite.

A diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos presentes no grupo em estudo (população, espécie ou grupo de espécies), tipicamente descrita usando polimorfismo, heterozigidade média e diversidade alélica.

Define-se que a heterozigidade é a medida mais utilizada para caracterizar a diversidade genética para *loci* gênicos. Para o cálculo dos parâmetros genéticos dos grupos de *N. jubata* amostrados foi utilizado o software ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005). Os genótipos foram verificados e a diversidade genética foi estimada a partir dos seguintes índices: número total de alelos por locus (N_a), heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e). Outra medida de diversidade testada foi o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizou-se

o método de Cadeia de *Markov*, que constituem uma classe de algoritmos utilizados para simular distribuições multivariadas complexas, baseando-se em simulações estocásticas, isto é, simulações de valores de uma distribuição de probabilidade (EXCOFFIER et al., 2005). Estima-se que em uma população suficientemente grande e na ausência de seleção, migração e mutação, o Equilíbrio é atingido após uma geração de acasalamento ao acaso, desta forma, a estimativa do Equilíbrio de H-W fornece uma base para detectar desvios de acasalamentos aleatórios, efeitos da endogamia, seleção, e efeitos de dominância sobre as frequências de alelos nos *loci* (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

O programa ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005) também foi utilizado para estimar o grau de diferenciação entre os três grupos amostrados de *N. jubata* por meio da estatística F ou estatística de Wright, analisando-se as porcentagens de F_{ST} . O valor de F_{ST} indica o grau endogamia devido à diferenciação entre subpopulações, em relação à população total. Se há altas taxas de fluxo gênico entre os grupos analisados, o valor de F_{ST} é baixo, enquanto baixas taxas de fluxo gênico pode levar a um aumento na endogamia e a um F_{ST} alto.

3.3.3 Distância e distribuição da diversidade genética de *N. jubata* amostrados

Para então investigar qual o melhor número de agrupamentos para os genótipos amostrados, foi utilizado o método de agrupamento bayesiano estabelecida pelo programa *STRUCTURE* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Este programa analisa diferenças na distribuição da variabilidade genética entre populações, utilizando um algoritmo bayesiano iterativo, alocando amostras em grupos cujos membros compartilham padrões de variação similares.

O programa executa a estimativa bayesiana da cadeia de Markov Monte Carlo para atribuir aleatoriamente indivíduos a um número pré-determinado de grupos (K), assim, as frequências da variabilidade são estimadas em cada grupo e indivíduos são re-atribuídos em um número ideal de agrupamento. Os modelos utilizados foram *admixture* e as frequências de alelos correlacionadas. Foram testados agrupamentos (k) de 1 a 7 com dez corridas para cada um, os parâmetros colocados foram: *burnin* de 50000 e 1.000000 de réplicas de Monte Carlo via Cadeia de *Markov* (MCMC).

Os resultados da corrida foram então carregados no *STRUCTURE HARVESTER* (EARL; VONHOLDT, 2012) que executa o método “Evanno” (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) produzindo um gráfico dos valores de probabilidade média por K para detectar o melhor valor de agrupamentos que se encaixam no conjunto de dados.

O software *GENECLASS 2.0* (PIRY et al., 2004), comumente é utilizado para identificar a presença de migrantes em uma população, neste trabalho ele foi utilizado para identificar genótipos que possam ser provenientes de um ano diferente daquele em que foram amostrados originalmente. O programa usa um conjunto de estatísticas baseadas na probabilidade, em combinação com métodos de reescalonamento, para calcular probabilidades de que os indivíduos sejam migrantes de primeira geração. Foram utilizadas duas estatísticas de testes baseadas em probabilidade diferentes para identificar indivíduos migrantes. Lh, a probabilidade de encontrar um determinado indivíduo na população em que foi amostrada, é a estatística mais apropriada para usar quando todas as populações potenciais não foram amostradas (PAETKAU et al., 1995; PIRY et al., 2004).

3.3.4 Análise de Parentesco

As relações de parentesco foram inferidas utilizando o programa *ML-RELATE* (KALINOWSKI; WAGNER; TAPER, 2006). O programa calcula a probabilidade de cada relação de parentesco para cada par de indivíduos produzindo uma matriz de relacionamentos com maior probabilidade para esse par. O coeficiente de relacionamento (r) varia de -1 a 1, onde valores de -1 a 0 indicam os indivíduos menos relacionados enquanto os valores 0 a 1 indicam os mais relacionados. O programa também produz um conjunto de confiança para a relação entre pares de indivíduos, de modo que os relacionamentos excluídos do conjunto de confiança podem ser descartados como improváveis e aqueles que estão dentro do conjunto de confiança não podem ser descartados.

4. RESULTADOS

4.1 Análise das sequências de DNA mitocondrial

Foram sequenciados 650 pares de bases de 29 indivíduos de *N. jubata*, onde foram encontrados somente dois haplótipos. As análises revelaram baixa diversidade haplotípica com um valor de $H_d = 0,069$ e foram registrados apenas oito sítios segregantes.

Com a análise de distância genética verificou-se que o valor médio encontrado para os três grupos amostrados foi de 0,001. De modo que nenhuma outra análise para detecção da partição da variabilidade genética foi realizada.

4.2 Análise genotípica dos *loci* de DNA microssatélite

Do total de 61 amostras de sangue foram extraídos com sucesso o DNA de 60 indivíduos. Os cinco *loci* de microssatélites foram amplificados e analisados. Na observação do gel foram identificados de três a sete alelos para cada locus, perfazendo um total de 27 alelos para os indivíduos de *N. jubata* (**Tabela 3**). A partir da caracterização dos alelos foram identificados 58 genótipos diferentes. A análise dos padrões de diversidade revelou alelos exclusivos nos três grupos amostrados (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Frequência dos alelos identificados nos cinco *loci* microssatélite para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. Alelos exclusivos encontrados indicados com asterisco.

<i>Loci</i>		Anos de amostragem		
		2010	2013	2014
SMO1		N=16	N =17	N =16
Alelos	1	0,250	0,588	0,406
	2	0,593	0,323	0,468
	3	0,093*	0,000	0,000
	4	0,062	0,058	0,093
	5	0,000	0,029	0,031
SMO6		N=20	N=19	N=18
Alelos	1	0,225	0,210	0,111
	2	0,675	0,157	0,277
	3	0,000	0,631	0,611
	4	0,075*	0,000	0,000
	5	0,025*	0,000	0,000
SMO8		N=20	N=19	N=18
Alelos	1	0,050	0,263	0,166
	2	0,000	0,000	0,277*
	3	0,150	0,631	0,444
	4	0,800	0,105	0,111
SMO10		N=20	N=19	N=20
Alelos	1	0,250	0,105	0,166
	2	0,000	0,210*	0,000
	3	0,000	0,263*	0,000
	4	0,000	0,105	0,166
	5	0,650	0,157	0,000
	6	0,100	0,157	0,666
APH08		N=20	N=19	N=18
Alelos	1	0,175	0,131	0,138

2	0,000	0,473	0,138
3	0,325	0,157	0,111
4	0,250	0,105	0,277
5	0,225	0,052	0,027
6	0,000	0,078	0,250
7	0,025	0,000	0,055

O desequilíbrio de ligação entre pares de *loci*, testa como hipótese nula que a distribuição genotípica em um locus é independente da distribuição em outro. Verificou-se que os três anos amostrados apresentam *loci* nesta condição ($p = >0,05$), sendo que o ano 2010 apresenta o maior número de *loci* em equilíbrio, enquanto o ano de 2014 apresenta o menor nível (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Comparação par a par de *loci* dos genótipos dos indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014 para teste de Equilíbrio de Ligação.

Grupo	Pares de <i>loci</i>	Valor de <i>p</i>
2010	(0 – 1)	$p = 0,593$
	(1 – 2)	$p = 0,085$
	(1 – 3)	$p = 0,206$
	(0 – 4)	$p = 0,889$
	(1 – 4)	$p = 0,357$
	(2 – 4)	$p = 0,317$
	(3 – 4)	$p = 0,068$
2013	(0 – 1)	$p = 0,086$
	(0 – 3)	$p = 0,123$
	(2 – 4)	$p = 0,328$
	(1 – 4)	$p = 0,150$
2014	(1 – 2)	$p = 0,207$
	(0 – 4)	$p = 0,052$

O ano de 2014 apresentou a maior média da heterozigosidade, com um valor de 0,192. Os níveis de heterozigose nos três grupos foram menores do que o esperado, porém se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado em cinco *loci* de microsatélite para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no Rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.

Grupos	Locus	N.A	Equilíbrio Hardy–Weinberg			
			Ho	He	p-value	s.d.
2010	SMO1	4	0.111	0.547	0.000	0.000
	SMO6	4	0.190	0.483	0.000	0.000
	SMO8	3	0.000	0.329	0.000	0.000
	SMO10	3	0.000	0.441	0.000	0.000
	APHO08	5	0.619	0.770	0.000	0.000
	Média	3,8	0.184	0.514		
2013	SMO1	4	0.166	0.544	0.000	0.000
	SMO6	3	0.000	0.528	0.000	0.000
	SMO8	4	0.000	0.579	0.000	0.000
	SMO10	6	0.000	0.841	0.000	0.000
	APHO08	6	0.250	0.728	0.000	0.000
	Média	4,6	0.083	0.644		
2014	SMO1	4	0.210	0.603	0.000	0.000
	SMO6	3	0.000	0.553	0.000	0.000
	SMO8	4	0.000	0.717	0.000	0.000
	SMO10	4	0.000	0.575	0.000	0.000
	APHO08	7	0.700	0.825	0.000	0.000
	Média	4,4	0.192	0.655		

N.A – número de alelos, Ho – Heterozigosidade observada, He – Heterozigosidade esperada.

A análise da frequência dos alelos feita para grupos divididos pelo sexo dos indivíduos revelou que o agrupamento “machos”, apresenta três alelos exclusivos em relação ao grupo das “fêmeas” (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Frequência dos alelos identificados para o agrupamento dos genótipos de machos e fêmeas de 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no Rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. Alelos exclusivos encontrados indicados com asterisco.

Locis	Machos	Fêmeas
SMO1	N=28	N=24
1	0,392	0,312
2	0,410	0,645
Alelos 3	0,053*	0,000
4	0,125	0,020
5	0,017	0,020
SMO6	N=33	N=27
1	0,197	0,185
Alelos 2	0,393	0,537

	3	0,363	0,259
	4	0,030	0,018
	5	0,015*	0,000
SMO8		N=33	N=27
	1	0,181	0,222
Alelos	2	0,030	0,111
	3	0,393	0,370
	4	0,393	0,296
SMO10		N=33	N=27
	1	0,242	0,074
	2	0,060	0,148
Alelos	3	0,151*	0,000
	4	0,030	0,074
	5	0,333	0,296
	6	0,181	0,407
APH08		N=33	N=27
	1	0,181	0,074
	2	0,303	0,166
	3	0,136	0,296
Alelos	4	0,181	0,148
	5	0,106	0,148
	6	0,075	0,148
	7	0,015	0,018

Também foi observado que a maior média de heterozigosidade pertence ao agrupamento “machos” com o valor de 0,157 (**Tabela 7**). E assim como na análise anterior feita para todos os indivíduos, os mesmos se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 7 - Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado em cinco loci de microsatélite para grupos de machos e fêmeas de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.

Equilíbrio Hardy-Weinberg						
Grupo	Loci	N.A	Ho	He	p-value	s.d.
Fêmeas	SMO1	4	0,080	0,509	0,000	0,000
	SMO6	4	0,074	0,656	0,000	0,000
	SMO8	4	0,000	0,718	0,000	0,000
	SMO10	5	0,000	0,726	0,000	0,000
	APHO08	7	0,555	0,848	0,000	0,000
	Média	4,8	0,141	0,691		
Machos	SMO1	5	0,269	0,668	0,003	0,000

SMO6	5	0,064	0,658	0,000	0,000
SMO8	4	0,000	0,638	0,000	0,000
SMO10	5	0,032	0,759	0,000	0,000
APHO08	7	0,419	0,828	0,000	0,000
Média	5,2	0,157	0,710		

N.A – número de alelos, Ho – Heterozigosidade observada, He Heterozigosidade esperada.

A análise de variância molecular (AMOVA) feita para os três grupos sem a presença de níveis hierárquicos foi significativo e apresentou um moderado valor de F_{ST} (0.209) (**Tabela 8**), evidenciando também que a maior porcentagem da variação se encontra dentro dos grupos, com apenas uma pequena parte da variação distribuída entre os grupos.

Tabela 8 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando cinco *loci* microssatélites sem análise hierárquica, para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.

Fonte da variação	d.f.	Componentes de Variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	0,410	20,95
Dentro dos grupos	113	1,549	79,05
Total	115	1,959	
Índice de Fixação	F_{ST} :	0,209	

O teste para agrupamentos de machos e fêmeas também foi estatisticamente significativo e apresentou um valor de F_{ST} de 0.027, apontando um baixo índice de diferenciação. Onde seu maior percentual de variação é encontrado dentro do grupo. Apresentando também um valor muito baixo de variação entre os grupos (**Tabela 9**).

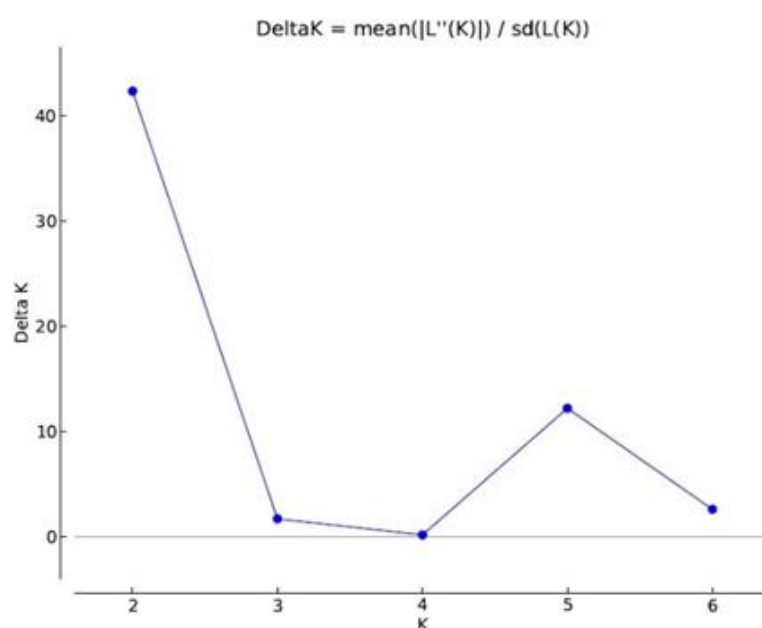
Tabela 9 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando de cinco *loci* microssatélites para com agrupamentos de machos e fêmeas, sem análise hierárquica, para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.

Fonte da variação	d.f.	Componentes de Variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	0,051	2,78
Dentro dos grupos	114	1,790	97,22
Total	115	1,841	
Índice de Fixação	F_{ST} :	0,027	

4.3 Distância e distribuição da diversidade genética de *Neochen jubata*

As múltiplas corridas realizadas pelo STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) mostrou que a variação genética dos indivíduos amostrados foram distribuídas em grupos de acordo com sua similaridade, e que duas populações (k=2) (Figura 6) obtido segundo o método de Evanno et al. (2005) é o número mais provável de populações para representar estes grupos amostrados. A partir da detecção do número adequado de populações foi elaborado um gráfico apresentando a distribuição dos indivíduos nestes dois agrupamentos, representados pelas cores vermelho e verde, sendo que a maioria dos indivíduos se encontram na população representada pela cor vermelha.

Figura 6 - Cálculo feito pelo *Structure Harvester* que determina o valor mais provável de agrupamentos (K) para os 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.



Também foram identificados genótipos migrantes pelo STRUCTURE nos três anos de coleta, ou seja, genótipos que apesar de pertencerem a um determinado grupo, possuem maior similaridade com genótipos de outro grupo. (Figura 8).

Figura 7 - Gráfico da análise Bayesiana com a distribuição dos indivíduos de *N. jubata* capturados no Rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014. Indivíduos alocados pelo compartilhamento de padrões genéticos similares em dois grupos representados pelas cores vermelho e verde.

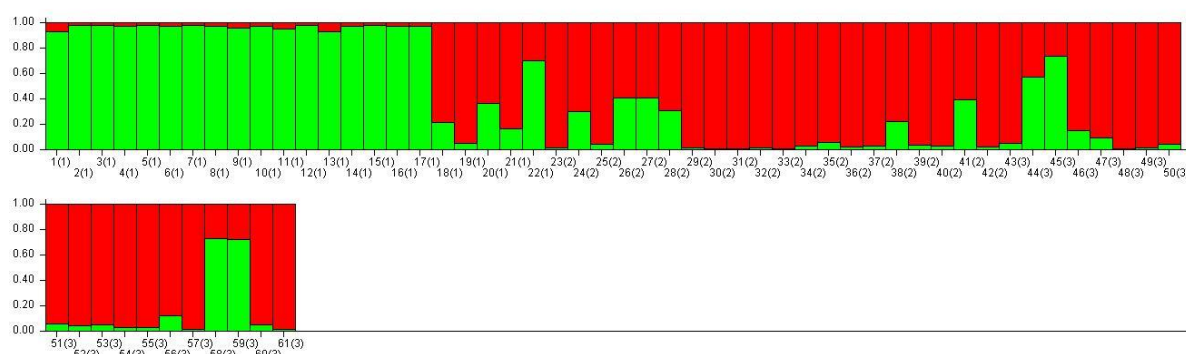
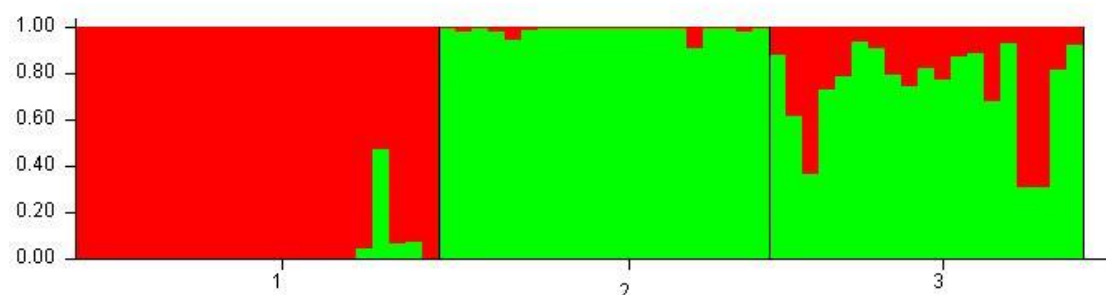


Figura 8 - Gráfico bayesiana indicando a presença de migrantes, apontados pelo programa *Structure* para 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.



A análise de distância foi utilizada para verificação do grau de divergência genética entre os três grupos, verificou-se que o par “2010” vs “2013” apresentou a maior distância, com valor de 0,790, enquanto o menor valor foi entre os pares de grupos de “2013” vs “2014” (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise de distância genética realizada para os 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO alocados de acordo com seu ano de coleta.

	2010	2013	2014
2010	*****		
2013	0,796	*****	
2014	0,731	0,235	*****

4.4 Parentesco

As análises para cálculo do relacionamento entre pares de indivíduos foram realizadas pelo programa ML-RELATE. A categoria mais frequente obtida foi a “não relacionados”, independentemente do tipo de análise - anos individualizados ou comparações entre diferentes anos. No entanto, entre os animais que possuem algum tipo de parentesco, a categoria mais observada foi a de “irmãos completos” (Tabelas 11 e 12).

A análise de parentesco realizada para grupos de “machos” e “fêmeas” revelou que o grupo composto apenas por fêmeas possui maior frequência de indivíduos com algum grau de parentesco comparado ao grupo formado por machos (**Tabela 12**). Ao longo dos pares de anos também ocorre uma diminuição dos indivíduos totalmente relacionados (irmãos completos), concomitante ao aumento dos indivíduos não relacionados (**Tabela 12**).

Tabela 11 - Análise da relação par a par de parentesco feita com 60 indivíduos de *N. jubata* capturados no rio Araguaia, GO nos anos de 2010, 2013 e 2014.

	2010	2013	2014	Todos os grupos
IRMÃOS COMPLETOS	13%	15%	12%	16%
MEIO – IRMÃOS	8,5%	0,5%	5,2%	4,1%
PAI/FILHOTE	6,1%	0,5%	1,7%	0,3%
NÃO – RELACIONADOS	71%	83%	78%	78%

Tabela 12- Análise da relação par a par de parentesco feita com 60 indivíduos de *N. jubata* indivíduos capturados no rio Araguaia, GO testando diferentes agrupamentos.

	2010 vs 2013	2010 vs 2014	2013 vs 2014	Machos	Fêmeas
IRMÃOS COMPLETOS	18%	16%	13%	15%	16%
MEIO – IRMÃOS	3,2%	4,8%	4,5%	4%	3,7%
PAI/FILHOTE	0,7%	1,2%	0,1%	0,1%	0%
NÃO -RELACIONADOS	77%	77%	82%	80%	80%

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise das sequências de DNA mitocondrial

Os resultados do DNA mitocondrial revelaram índices de diversidade muito baixos e apenas dois haplótipos foram identificados. Alguns autores sugerem que baixa variabilidade geralmente apresentada pelas aves quando analisadas pelo DNA mitocondrial, são reflexo de certos processos evolutivos.

Segundo Bazin e colaboradores (2006) o DNA mitocondrial não deve ser encarado como marcador molecular neutro, e provavelmente sofre frequente evolução adaptativa. Uma das teorias, é que este déficit é reflexo do efeito Hill-Robertson, este fenômeno genético prediz que em regiões genômicas com baixa recombinação os níveis de adaptação e variabilidade serão reduzidos, devido a ação da evolução em outros sítios ligados. Em aves,

os machos são homogaméticos (ZZ) enquanto as fêmeas são heterogaméticas (ZW), o cromossomo W e o genoma mitocondrial são transmitidos maternalmente, assim, o efeito de seleção aos *loci* ligados o cromossomo W pode exercer influência sob variabilidade do DNA mitocondrial devido ao efeito carona (BERLIN; TOMARAS; CHARLESWORTH, 2007).

Outra teoria supõe que esta baixa variabilidade genética esteja ligada às características fisiológicas das aves. Com poucas exceções, espécies de aves costumam possuir uma alta longevidade, vivendo até três vezes mais do que mamíferos de massa corporal equivalente. As taxas de envelhecimento lento típicas das aves são paradoxais, devido às suas altas taxas metabólicas, alta temperatura corporal e altos níveis de glicose no sangue (HOLMES; AUSTAD; FLUCKIGER, 2001). De acordo com as teorias bioquímicas atuais do envelhecimento, a elevação desses parâmetros fisiológicos deveria contribuir para o dano tecidual acelerado, devido à acumulação de subprodutos deletérios de oxidantes. No entanto, apesar das altas taxas de consumo de oxigênio, as aves têm baixas taxas de produção de radicais livres mitocondriais no cérebro e em outros tecidos.

As mitocôndrias são geralmente a maior fonte de espécies *reactive oxygen species* (ROS) ou espécies reativas de oxigênio. Em mamíferos, 2 - 4% de todo o oxigênio consumido é liberado como ROS, um estudo realizado para comparar sua produção entre aves e mamíferos de massa corporal semelhantes verificou que, as mitocôndrias do fígado e coração de pombos produzem aproximadamente 10 vezes menos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do que em ratos (BARJA, 2004; HICKEY, 2008).

As espécies reativas de oxigênio são consideradas nocivas para muitas macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, sendo que o dano a este último é considerado o mais crítico, pois o reparo de todas as outras macromoléculas biologicamente relevantes depende das informações codificadas no DNA. A maior produção de ROS mitocondriais em animais de curta longevidade pode ser uma das causas da alta taxa de acumulação de mutações no DNA mitocondrial durante seu envelhecimento (BARJA, 2004). Essa acumulação ocorre após 70 a 100 anos em seres humanos, mas apenas após dois a três anos em camundongos (WANG; WONG; CORTOPASSI, 1997).

Os anatídeos são considerados aves com um ciclo de vida longo, que variando de cinco anos (*Anas diazi*) a vinte e nove anos (*Somateria molíssima*) (CARBONERAS, 1992; CLAPP; KLIMKIEWICZ; KENNARD, 1982). O longo ciclo de vida, aliado a um menor dano oxidativo ao DNA mitocondrial, como documentado em outras espécies de aves, podem por consequência gerar um menor acúmulo de mutações, podendo ser uma das causas da baixa diversidade genética encontrada neste estudo para a espécie *Neochen jubata*.

De toda forma, o DNA mitocondrial não foi o marcador mais informativo para este trabalho.

5.2 Análise genotípica dos *loci* de DNA microssatélites

Os índices de diversidade de *N. jubata* apontaram valores de heterozigotos inferiores aos esperados, tanto para os indivíduos dos três anos amostrados, quanto para agrupamentos de “fêmeas” e “machos”. Apesar desta diferença, os testes de significância estatística indicam que as frequências alélicas apresentadas pelos grupos ainda estão dentro do equilíbrio proposto pelo teorema de Hardy-Weinberg. De modo que para estes grupos, a endogamia ou outro fator evolutivo tem pouca ou nenhuma atuação. (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Este resultado é reafirmado pelo alto número de *loci* em equilíbrio de ligação, ou seja, *loci* gênicos em que a associação alélica está ocorrendo de forma aleatória, sem influência de pressões evolutivas.

O grau moderado de diferenciação genética apresentado pela análise AMOVA para os grupos amostrados indica que estes possuem composições alélicas diferentes, porém essa diferença é ínfima (20,95%). É possível que esta diferença seja reflexo dos alelos exclusivos encontrados nos grupos amostrados. Porém, mesmo em face dessa diferença, é possível inferir que os três grupos amostrados constituem uma única população, devido ao alto compartilhamento de alelos entre os grupos dos diferentes anos.

Já com a análise AMOVA realizada com indivíduos separados em grupos de “machos” e “fêmeas”, foi possível observar uma baixa diferenciação genética entre os gêneros, que também pode ser atribuída a presença de alelos exclusivos para o grupo “machos”. E, devido ao alto compartilhamento da variação genética (97.22%) podemos afirmar que a diversidade genética é compartilhada por todos os indivíduos ao longo dos anos e não contida em apenas um dos sexos.

A presença de alelos exclusivos como os observados nos grupos analisados, pode ser reflexo do número amostral aqui utilizado, mas também pode indicar a existência de baixo fluxo gênico com outras populações ou ainda indivíduos que não deixaram descendentes ao longo dos anos, de modo que a variabilidade amostrada está restrita aos poucos alelos dos indivíduos amostrados nos três anos de estudo.

5.3 Distância e distribuição da diversidade genética de *N. jubata*

Os resultados de distância genética e estruturação concordam quanto a distribuição da variabilidade genética dos indivíduos de *N. jubata*. Análise de distância genética apontou

que os indivíduos do ano “2013” e “2014” possuem maior similaridade genética entre si, estes dados são confirmados pelo STRUCTURE, onde o número de populações sugerido como mais adequado pelo programa foram duas, de maneira que a maior parte dos indivíduos amostrados em “2013” e “2014” foram alocados em um único grupo. Estes resultados demonstram que ao longo dos anos, há um contínuo compartilhamento dos alelos entre os indivíduos.

Esta interpretação está em concordância com a biologia da família Anatidae, onde a maturação sexual dos indivíduos ocorre após o primeiro ou segundo ano de vida, a formação de pares também demora a ser estabelecida e tendem a durar vários anos (JONHSGARD, 2010). Portanto, qualquer diversidade alélica introduzida entre os grupos irá demorar um período de pelo menos três anos para se refletir no pool gênico populacional.

Outra explicação para a polarização dos indivíduos em dois grupos, deve-se a ausência de amostras dos anos intermediários entre “2010” a “2013”, uma vez que a análise dos indivíduos destes anos poderia detectar esta homogeneização de forma mais gradativa. A identificação de genótipos considerados “migrantes”, ou seja, que pertenceriam a um grupo diferente do qual foi amostrado, reforça a inferência de que sob uma perspectiva temporal, os indivíduos constituem uma única população.

5.4 Parentesco

A partir dos testes de parentesco foi observado que o maior número dentre todas as categorias é de indivíduos sem nenhuma relação de parentesco, dado que se confirma com os resultados que mostram os grupos em Equilíbrio de H-W, um indicativo que a endogamia não é uma força atuante para os indivíduos amostrados. As análises também demonstraram que as fêmeas são mais relacionadas entre si que os machos.

Os resultados também evidenciaram a existência de relações de parentesco entre os animais capturados em anos diferentes. Estes dados reforçam a ideia que os três grupos amostrados fazem parte de uma única população, que visita sazonalmente as margens do rio Araguaia. Resultados que estão em concordância com os estudos sobre a abundância sazonal de *N. jubata* que sugere a existência de grandes populações transitórias nos rios e afluentes da bacia do Juruá, AM, anteriormente consideradas populações independentes, mas são na verdade, as mesmas populações que ocupam sazonalmente diferentes áreas de reprodução (ENDO; HAUGAASEN; PERES, 2014; IUCN, 2018).

Estes registros de ocorrência sazonal do pato-corredor, que coincide com sua reprodução na estação da seca, é indício de algum grau de filopatria, ou seja, alguns

indivíduos apresentam uma tendência de permanecer em sua área de origem (filopatria natal) ou regressar a ela para o acasalamento (filopatria de acasalamento). Em geral, a familiaridade com uma área específica traz diversas vantagens para o organismo (GREENWOOD, 1980), os benefícios incluem a evasão de predadores, maior eficácia na obtenção de recursos e hostilidade reduzida e possível cooperação com indivíduos de relacionamento próximos (MCKINNON; GILCHRIST; SCRIBNER, 2006; SONSTHAGEN et al., 2009b).

6. CONCLUSÃO

Os índices de diversidade genética verificado com o uso dos *loci* de microssatélites demonstram que os indivíduos de *Neochen jubata* estudados neste trabalho apresentaram níveis de diversidade genética reduzida, de forma que todos os anos amostrados possuem uma deficiência de heterozigotos. Entretanto, os grupos ainda se encontram em Equilíbrio. Indicação de que pressões evolutivas como a deriva, a endogamia e a seleção natural não estão atuando nestes grupos.

As análises de distância genética e distribuição da variabilidade genética concordam entre si, sendo possível observar uma mistura gradativa das frequências dos grupos amostrados ao longo dos anos. E devido ao alto compartilhamento alélico entre todos os grupos, podemos inferir que se trata de uma única população dinâmica, que ao longo dos anos continua apresentando mudanças em suas frequências alélicas.

Nos três anos amostrados, individualmente e em conjunto, foram encontrados indivíduos com algum grau de parentesco entre si, validando dados anteriores de que na verdade estes indivíduos constituem uma única população e possuem uma relação de fidelidade com o local.

Os resultados encontrados neste estudo constituem um marco inicial para o conhecimento genético do pato-corredor. Por meio dos indivíduos amostrados neste trabalho, um cenário genético preocupante se apresenta, uma vez que a baixa variabilidade genética é prejudicial a capacidade adaptativa de um organismo, estes dados devem suscitar outros para que mais estudos genéticos sejam realizados, na região do rio Araguaia e em outras localidades de ocorrência desta espécie, a fim de complementar este estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, A. K. et al. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity in Pekin (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina moschata*) Duck Populations. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 5, p. 378–382, 2007.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. New York: CHAPMAN; HALL, 1994. p.511.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. p.477.
- AVISE, J. C. **The Hope, Hype, and Reality of Genetic Engineering**. New York: Oxford University Press, 2004. p.242.
- BALLARD, J. W. .; WHITLOCK, M. . The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729–744, 2004.
- BARJA, G. Free radicals and aging. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 10, p. 595–560, 2004.
- BAZIN, E.; GLÉMIM, S.; GALTIER, N. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. **Science**, v. 312, n. 2006, p. 570, 2006.
- BERLIN, S.; TOMARAS, D.; CHARLESWORTH, B. Low mitochondrial variability in birds may indicate Hill-Robertson effects on the W chromosome. **Heredity**, v. 99, n. 4, p. 389–396, 2007.
- BLOUIN, M. S. et al. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 393–401, 1996.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Cadastro Nacional de Unidades de Conservação**. 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80238/CNUC_FEV18%20-%20C_Bio.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2018.
- BULGARELLA, M. et al. Molecular phylogeny of the South American sheldgeese with implications for conservation of Falkland Islands (Malvinas) and continental populations of the Ruddy-headed Goose *Chloephaga rubidiceps* and Upland Goose *C. picta*. **Bird Conservation International**, v. 24, n. 1, p. 59–71, 2014.
- CARBONERAS, C. Family Anatidae (Ducks, Geese and Swans). In: J. DEL HOYO, A. ELLIOTT, J. S. (Ed.). . **Handbook of the Birds of the World**. 1. ed. Barcelona: Lynx Edicions, 1992. p. 528–628.
- CLAPP, R. .; KLIMKIEWICZ, M. .; KENNARD, J. . Longevity records of North American birds: Gaviidae through Alcidae. **Journal of Field Ornithology**, v. 53, n. 2, p. 81–208, 1982.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504–509, 2004.

- DAVENPORT, L. C.; NOLE BAZÁN, I.; CARLOS ERAZO, N. East with the night: longitudinal migration of the Orinoco-goose (*Neochen jubata*) between Manú National Park, Peru and the Llanos de Moxos, Bolivia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–7, 2012.
- DELACOUR, J. MAYR, E. The Family Anatidae. **Wilson bulletin**, v. 57, n. 1, p. 3 – 55 ., 1945.
- DONNE-GOUSSÉ, C.; LAUDET, V.; HÄNNI, C. A molecular phylogeny of anseriformes based on mitochondrial DNA analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 3, p. 339–356, 2002.
- DONOVAN, T. M. et al. Reproductive success of migratory birds in habitat sources and sinks. **Conservation Biology**, v. 9, n. 6, p. 1380–1395, 1995.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.
- ELLIS, J. R.; BURKE, J. M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. **Heredity**, v. 99, n. 2, p. 125–132, 2007.
- ENDO, W.; HAUGAASEN, T.; PERES, C. A. Seasonal abundance and breeding habitat occupancy of the Orinoco-goose (*Neochen jubata*) in western Brazilian Amazonia. **Bird Conservation International**, v. 24, n. 4, p. 518–529, 2014.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.
- GONZALEZ, J.; DÜTTMANN, H.; WINK, M. Phylogenetic relationships based on two mitochondrial genes and hybridization patterns in Anatidae. **Journal of Zoology**, v. 279, n. 3, p. 310–318, 2009.
- GREEN, A. J. Analyses of globally threatened Anatidae in relation to threats, distribution, migration patterns, and habitat use. **Conservation Biology**, v. 10, n. 5, p. 1435–1445, 1996.
- GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, n. 4, p. 1140–1162, 1980.
- HALL, A. T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids Symposium**, n. 41, p. 95–98, 1999.
- HAUSER, L. et al. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11742–11747, 2002.
- HERKERT, J. R. et al. Effects of prairie fragmentation on the nest success of breeding birds in the midcontinental United States. **Conservation Biology**, v. 17, n. 2, p. 587–594, 2007.

HICKEY, A. J. R. Avian mtDNA diversity? An alternate explanation for low mtDNA diversity in birds: An age-old solution? **Heredity**, v. 100, n. 5, p. 443, 2008.

HIDALGO ARANZAMENDI, N. A.; BOOKER, J.; BAILEY, S. F. First record of Orinoco-goose *Neochen jubata* west of the Andes. **Cotinga**, v. 32, n. 1, p. 154–155, 2010.

HOELZEL, A. R. et al. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. **Proceedings. Biological sciences**, v. 269, n. 1499, p. 1467–73, 2002.

HOLMES, D. J.; AUSTAD, S. N.; FLUCKIGER, R. Comparative biology of aging in birds : an update. **Experimental Gerontology**, v. 36, p. 869–883, 2001.

ISAGI, Y. et al. Highly variable pollination patterns in *Magnolia obovata* revealed by microsatellite paternity analysis. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 6, p. 1047–1053, 2004.

JAHN, A. E. et al. Partial migration in tropical birds: The frontier of movement ecology. **Journal of Animal Ecology**, v. 79, n. 5, p. 933–936, 2010.

JOHNSGARD. P. A. **Waterfowl of North America**, 2010. Disponível em: <http://works.bepress.com/paul_johnsgard/79/>. Acesso em: 15/11/2017.

KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 576–579, 2006.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KRIESE, K. D. . **Breeding ecology of the Orinoco Goose (*Neochen jubata*) in the Venezuelan Llanos: the paradox of a tropical grazer** . Phd Thesis. University of California, 2004.

KURO-O, M. et al. Unexpectedly high genetic diversity of mtDNA control region through severe bottleneck in vulnerable albatross *Phoebastria albatrus*. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 1, p. 127–137, 2010.

LARKIN, M. A et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 21, p. 2947–8, 2007.

LBEM. **Protocolo de extração de DNA de sangue - Fenol**. 2018. Disponível em: <<http://labs.icb.ufmg.br/lbem/protocolos/extracaoDNAfenol.html>>. Acesso em 22/03/2017

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LIVEZEY, B. C. A phylogenetic analysis of modern sheldgeese and shelducks (Anatidae, Tadornini). **Ibis**, v. 139, p. 51–66, 1997.

LUCA, A. A. DE; DEVELEY, P.; OLMOS, F. **WATERBIRDS IN BRAZILFINAL REPORT**. Save Brasil. São Paulo: 2006.

- LUCK, G. W. Differences in the reproductive success and survival of the rufous treecreeper (*Climacteris rufa*) between a fragmented and unfragmented landscape. **Biological Conservation**, v. 109, p. 1–14, 2003.
- MAAK, S. et al. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p. 224–227, 2003.
- MARINI, M. Â.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 95–102, 2005.
- MCKINNON, L.; GILCHRIST, H. G.; SCRIBNER, K. T. Genetic evidence for kin-based female social structure in common eiders (*Somateria mollissima*). **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 4, p. 614–621, 2006.
- MILLER, M. J. et al. Neotropical birds show a humped distribution of within-population genetic diversity along a latitudinal transect. **Ecology Letters**, v. 13, n. 5, p. 576–586, 2010.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. February, p. 853–858, 2000.
- PAETKAU, D. et al. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 3, p. 347–354, 1995.
- PAULUS, K. B.; TIEDEMANN, R. Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p. 250–252, 2003.
- PEARCE, J. M. et al. Lack of spatial genetic structure among nesting and wintering king eiders. **Condor**, v. 106, n. 2, p. 229–240, 2004.
- PERES, C. A.; ZIMMERMAN, B. Perils in Parks or Parks in Peril? Reconciling Conservation in Amazonian Reserves with and without Use. **Conservation Biology**, v. 15, n. 3, p. 793–797, 2001.
- PINHEIRO, R. T.; DORNAS, T. Distribuição e conservação das aves na região do Cantão , Tocantins : ecótono Amazônia / Cerrado. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 187–205, 2009.
- PIRY, S. et al. GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **Journal of Heredity**, v. 95, n. 6, p. 536–539, 2004.
- PITMAN, M. R. L. et al. **Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros**. Brasília: Edições IBAMA, 2002.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.
- SANO, E. E. et al. Notas científicas mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 153–156, 2008.
- SCHLÖTTERER, C. Genome evolution : Are microsatellites really simple sequences ? **Current Biology**, v. 8, n. 4, p. 132–134, 1998.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365–71, 2000.

SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 2, p. 211–215, 1992.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**.—Ed. Nova Fronteira SA, Rio de Janeiro, Brazil, 1997.

SOLOVYEVA, D. V.; PEARCE, J. M. Comparative mitochondrial genetics of North American and Eurasian mergansers with an emphasis on the endangered scaly-sided merganser (*Mergus squamatus*). **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 839–844, 2011.

SONSTHAGEN, S. A. et al. Hierarchical spatial genetic structure of common eiders (*Somateria mollissima*) breeding along a migratory corridor. **The Auk**, v. 126, n. 4, p. 744–754, 2009.

SORENSEN, M. D. et al. Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 105–114, 1999.

SORENSEN, M. D.; FLEISCHER, R. C. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. December, p. 15239–15243, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

WANG, E.; WONG, A.; CORTOPASSI, G. The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than humans. **Mutation Research**, v. 377, p. 157–166, 1997.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Tabela de genótipos identificados para cinco *loci* de microssatélites amplificados para 60 indivíduos de *N. jubata* amostrados nos anos de 2010, 2013 e 2014 na região do rio Araguaia, GO.

Indivíduos	<i>Loci</i>				
	SMO1	SMO6	SMO8	SM010	APHO8
1	0101	0202	0404	0505	0303
2	0202	0202	0404	0505	0305
3	0202	0202	0404	0505	0303
4	0304	0202	0404	0505	0405
5	0303	0202	0404	0505	0405
6	0202	0101	0404	0505	0404
7	0202	0204	0404	0505	0405
8	0204	0202	0404	0505	0303
9	0000	0104	0404	0101	0405
10	0202	0202	0404	0101	0305
11	0202	0202	0404	0505	0407
12	0202	0202	0404	0505	0405
13	0101	0202	0404	0505	0404
14	0202	0104	0404	0505	0101
15	0202	0202	0404	0505	0305
16	0202	0202	0404	0505	0101
17	0202	0101	0404	0505	0305
18	0101	0202	0303	0101	0305
19	0101	0105	0303	0101	0101
20	0000	0101	0101	0101	0105
21	0000	0202	0303	0606	0305
22	0101	0303	0303	0606	0303
23	0101	0303	0404	0606	0303
24	0202	0303	0303	0606	0303
25	0202	0303	0303	0505	0101
26	0000	0303	0303	0505	0105
27	0101	0303	0101	0505	0406
28	0000	0303	0303	0404	0202
29	0101	0303	0303	0303	0202
30	0105	0303	0303	0303	0202
31	0204	0303	0303	0303	0202
32	0104	0303	0303	0303	0206
33	0202	0101	0303	0303	0202
34	0202	0101	0303	0101	0202

35	0101	0202	0303	0202	0202
36	0101	0202	0101	0202	0202
37	0101	0202	0101	0101	0101
38	0202	0101	0101	0202	0202
39	0101	0101	0101	0202	0406
40	0101	0303	0404	0404	0404
41	0101	0303	0202	0404	0406
42	0202	0303	0202	0404	0407
43	0202	0303	0404	0404	0404
44	0202	0303	0404	0101	0404
45	0202	0303	0303	0101	0404
46	0000	0303	0303	0101	0404
47	0101	0303	0303	0606	0206
48	0000	0303	0303	0606	0207
49	0104	0202	0303	0606	0306
50	0105	0202	0303	0606	0303
51	0204	0202	0303	0606	0206
52	0104	0202	0202	0606	0101
53	0202	0101	0303	0606	0206
54	0202	0303	0202	0606	0306
55	0202	0101	0202	0606	0105
56	0101	0303	0101	0606	0206
57	0202	0202	0101	0505	0106
58	0202	0202	0101	0505	0106
59	0101	0202	0101	0606	0106
60	0101	0303	0101	0606	0106

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor