



Caracterização da estrutura genética populacional das araras vermelhas *Ara chloropterus* e *Ara macao* (Psittaciformes, Aves)



# **Adriana Ribeiro de Oliveira-Marques**

**Caracterização da estrutura genética populacional das araras vermelhas *Ara chloropterus* e *Ara macao* (Psittaciformes, Aves)**

**Characterization of the population genetic structure of red macaws *Ara chloropterus* and *Ara macao* (Psittaciformes, Aves)**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título  
de Doutor em Ciências, na área de Biologia/Genética.**

**Orientadora: Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki**

**São Paulo**

**2010**

**Oliveira-Marques, Adriana Ribeiro**

**Caracterização da estrutura genética populacional das araras vermelhas *Ara chloropterus* e *Ara macao* (Psittaciformes, Aves).**

**95 páginas.**

**Tese de doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.**

**1.Arara 2. *Ara chloropterus* 3. *Ara macao* 4. Genética populacional 5. DNA mitocondrial 6. Microssatélites I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.**

**Comissão Julgadora:**

---

Prof. (a) Dr. (a)

---

Prof. (a) Dr. (a)

---

Prof. (a) Dr. (a)

---

Prof. (a) Dr. (a)

---

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

São Paulo

2010

**Às ARARAS, que deram sangue para este trabalho e por me proporcionarem o imenso prazer de vê-las voando e de conhecer um pouco da diversidade do nosso Brasil.**

**À minha Vózinha, aos meus pais e ao meu marido.**



“ Por mais incerto que seja o destino,  
por mais infundadas que sejam as razões,  
quando se voa de asas dadas,  
nunca se está só”

(Almir C Barros, foto modificada de [ultrad.com.br](http://ultrad.com.br))



## **Agradecimentos**

À Cris Miyaki, por me orientar mais uma vez com a mesma dedicação, carinho e simpatia, e principalmente por estar sempre disposta a ensinar e conversar.

À Profa. Anita Wajntal pelo seu apoio, simpatia e conversas.

Às araras que me proporcionaram momentos inesquecíveis e aprendizados que levarei para sempre na minha vida.

A toda equipe do Projeto Arara-azul pelo estágio que fiz durante meu mestrado que me ensinou o que é o trabalho de campo e fez com que eu me apaixonasse ainda mais pelas araras e pela natureza, este estágio foi primordial para que eu conseguisse realizar as coletas do doutorado. Por todas as amostras de sangue de *Ara chloropterus* para o doutorado e pelo carinho e amizade de sempre, em especial Neiva Guedes, César, Lia, Vanessa, Grace, Joacilei, Sophia e Gabi.

Ao Paulo Antas pelas amostras de *Ara chloropterus* do SESC Pantanal.

Ao Pedro Scherer Neto pela amostra de Diamante do Norte, PR.

Ao Alexandre Aleixo pelas duas amostras de sangue de *A. macao*.

Àqueles que me deram muitas dicas de onde eu poderia encontrar araras: Pedro Develey, Ale Uezo, Gabam, Lama e Luís Fábio.

Às pessoas que me ajudaram na busca de amostras de sangue das araras no Mato Grosso: João Batista Pinho, Bianca Bernadon, Giuliano Bernadon e Luciana Pinheiro, muito obrigada pelo apoio e amizade de vocês.

Às pessoas que me ajudaram na coleta do Piauí: Raimundo Nobre, Sara, Jussara, família do Sr. Maurino de Oliveira (Fazenda Boa Vista) em especial o Junior que nos ajudou na busca dos ninhos, Lourival e muitos outros que me acolheram tão bem me hospedando em suas casas e me ajudaram muito.

À Flávia Presti por todo o auxílio no laboratório, nas análises e amizade e ao seu marido Patrick, pela ajuda imensa nas coletas do Pará.

Ao Frederico Drumond Martins, chefe da Floresta Nacional de Carajás (ICMBio) pelo apoio. Às pessoas da Vale pelo apoio logístico no Projeto Salobo e toda a área da Vale.

Ao Sr. Luiz Sementeira, pela grande ajuda na procura dos ninhos e seus ensinamentos sobre as árvores, sementes e mel em Canaã dos Carajás, PA.

À Jequissânia pela comida deliciosa e sua à família por nos receberem muito bem em Mozartinópolis (Canaã dos Carajás, PA).

Ao Sr. Zé Galdino, que praticamente nos adotou em Mozartinópolis (Canaã dos Carajás, PA), abriu as portas de sua casa e nos recebeu com muita simpatia, alegria e carinho.

Ao Ricardo de Almeida da Fundação Vitória Amazônica que me passou todos os contatos e informações do Parque Nacional do Jaú, AM.

À Thayná Mello, do Instituto Chico Mendes (ICMBio) pelo apoio logístico no Parque Nacional do Jaú.

Ao Roxo por indicar e subir nos prováveis ninhos no Parque Nacional do Jaú e toda a comunidade do Tambor, em especial D. Maria e seus filhos e filhas que me receberam tão bem e me ajudaram em tudo. Ao Sr. Valter pelas dicas de ninhos das araras. E um agradecimento muito especial por vocês me hospedarem em suas casas.

Ao Sr. Antonio Flávio Filho, responsável pelo Parque Nacional de Pacaás Novos, por todo apoio para que eu pudesse realizar a coleta ao redor do parque e pudesse utilizar a estrutura da sede. Assim como toda a equipe de brigada de incêndio do parque, o Sr. Manoel Carneiro e o Jonatas Santos Sangi pela imensa ajuda à subida nos supostos ninhos. Ao Sr. Raimundo Marinho (IBAMA, AC) pelas dicas e apoio na busca de araras apreendidas pelo IBAMA.

À Andréa Soares Pires, diretora do Parque Estadual Morro do Diabo (SP), pelo apoio logístico. Assim como o Alemão, que nos auxiliou no campo. E em especial ao Tiago Ribeiro e Otinho que também me auxiliaram no campo e subiram num suposto ninho, mesmo parecendo impossível.

Às tantas pessoas que me ajudaram a conseguir as amostras do Acre, me desculpe se eu esquecer alguém, sou grata a cada pessoa que cruzou o meu caminho. Primeiramente ao Sr. Sebastião Santos da Silva, chefe da Reserva Extrativista (RESEX) Chico Mendes, pelo apoio e dicas sobre a RESEX. À Joseline Guimarães do Parque Chico Mendes que me autorizou e ajudou a coletar amostras de sangue das araras do parque e me fez provar o Tacacá. A todos os responsáveis pelas Associações dos Moradores e Produtores (AMOPRE) da RESEX Chico Mendes: Sr. Renato da AMOPREX (Xapuri), Sr. Silva e Carlos da AMOPREB (Brasiléia) e Sra. Odinéia da AMOPREAB (Assis Brasil). Ao Antonio com o auxílio na busca de uma amostra de sangue de *A. chloropterus* dentro da RESEX de moto em Assis Brasil.

Às minhas companheiras de viagem ao Acre, Sofia Silva e Simonne Chinem, que tornaram a coleta muito mais agradável e me deram oportunidade de conhecer um pouco mais sobre o bicho-preguiça.

À todos que me autorizaram coletar sangue de suas araras cativas, um muito obrigada muito especial.

Aos queridos antigos e novos amigos do LGEMA: Ana Cris, André, Camila, Cibele, Danilo, Erikinha, Erwin, Fábio, Fernando Horta, Fernando Nodari, Flávia, Gustavo, Henrique, Marcos, Melina, Priscila, Renatão, Ricardo, Taninha e Tiago, pelas dicas, ensinamentos, conversas, cafés, pizzas, congressos e amizade que fizeram desses últimos anos uma convivência maravilhosa.

Ao Prof. Diogo pela ajuda com o programa Beast.

À Profa. Lurdes e sua equipe por abrir as portas do seu laboratório para que eu fizesse as extrações de DNA das amostras não invasivas. Em especial a Keila, Raquel, Carol, Carlos, Mari e Felipe.

À Profa. Marie-Anne por nos autorizar usar os sequenciadores do seu laboratório.

À Silvia pela imensa ajuda com o sequenciamento das amostras no laboratório da Profa. Marie e pela amizade de sempre.

Ao Márcio e Carmen pelo sequenciamento das amostras no ICB.

Às meninas do Genoma Humano pelas genotipagens: Kátia e Martha.

Aos professores do IB pelos seus ensinamentos e ótimas idéias. Em especial aos professores da disciplina de genética: Prof. Carlos Vilela, Profa. Lyria Mori, Prof. Luis Neto e Profa. Denise Selivon pelo estágio do PAE.

À todos os funcionários do IB, em especial: Carminha, Cláudia, Deisy, Genuveva, Helenice, Sr. João, Linácia, Lucilene, Luzia, Maria e Suzi, pelo apoio e pelos sorrisos nos corredores do IB que fizeram da rotina do meu dia-a-dia muito mais prazerosa.

Às Professoras Célia e Regina pela imensa ajuda financeira junto a PROAP. E ao Edu da tesouraria do IB que sempre esteve pronto para ajudar.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

À Lynx Edicions, pela autorização do uso das figuras das araras do livro *Handbook of the Birds of the World*, volume 04.



Ao Coral do IB pelos agradáveis ensaios, em especial ao maestro Leonardo Camargos e maestrina Angela Salem pela alegria e simpatia contagiantes.

Às minhas amigas e amigos de coral que fizeram dos almoços após os ensaios ainda mais alegres: Nelsita, Cecília, Heloísa, Simone, D. Christine, Cris, Marisa, Waldir e Fábio.

Aos amigos do Madrigal Canto D'Arte que me ajudam a levar a vida com muita cantoria e alegria. Realmente, quem canta os males espanta! Em especial ao pessoal da carona: Léo, Marlene, Rita e Soninha, que fazem nossas viagens sempre alegres e muito agradáveis.

Aos queridos e queridas D. Eurides, S. Oton, Renata, Luciano e Daniela por continuarem me apoiando e torcendo por mim. E a toda família Micheleto!

À minha amiga e irmã do coração, Patrícia, pela amizade verdadeira, apoio, torcida e aos agradáveis almoços.

Aos meus irmãos, Anderson e Amanda e meu cunhado Nimai, pela torcida, apoio, carinho, amor e amizade.

Aos meus pais, Marina e Dirceu, pelo apoio e incentivo mesmo preocupados com as minhas viagens a campo! Toda dedicação, amor e tudo o que fizeram e ainda fazem por mim, é que me tornaram o que sou hoje. Amo vocês!

Ao Otinho pelo seu apoio, incentivo e paciência mesmo com as minhas ausências, o deixando sozinho por até 40 dias! Muito obrigada meu amor! Espero viver mais 15 anos ao seu lado.

A toda a minha família (Ribeiro, Oliveira...), amigos e amigas pelo apoio, torcida e carinho.

Desculpem-me se esqueci de alguém, para que este trabalho pudesse ser realizado muitas pessoas me ajudaram e sou grata a todas!

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introdução Geral</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	13
<b>Conclusões Finais</b> .....	14

# Resumo

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a estrutura genética populacional de duas espécies de araras: *Ara chloropterus* e *Ara macao*. Foram analisadas amostras de sangue e penas de diferentes regiões no Brasil, de uma localidade na Bolívia e outra no Peru. Foram realizadas análises com DNA mitocondrial (região controladora e citocromo oxidase I) e nuclear (microsatélites) das duas espécies. Para *A. chloropterus* foram obtidos 2166 pares de base do DNA mitocondrial de 89 amostras e dados de seis locos de microsatélites de 95 amostras. A rede de haplótipos e a árvore de *neighbor-joining* construídas com dados mitocondriais e os índices de  $F_{ST}$  obtidos com os dois marcadores revelaram fraca estruturação genética. Isso pode ser devido a alto fluxo gênico apresentado ou retenção de polimorfismo ancestral. Portanto, a espécie parece se organizar em metapopulações (baixa estruturação genética e alto fluxo gênico). Nesse caso, seria interessante conservar indivíduos de diversas localidades e seus corredores. Para *A. macao* foram obtidos 2094 pares de base do DNA mitocondrial de 68 amostras e dados de sete locos de microsatélites de 64 amostras. A rede de haplótipos e a árvore de *neighbor-joining* construídas com dados mitocondriais e os índices de  $F_{ST}$  obtidos com os dois marcadores indicam ausência de diferenciação genética entre as localidades estudadas. A análise demográfica dessa espécie indica expansão populacional há pouco mais de 50.000 anos atrás e declínio populacional desde o último período máximo de glaciação. Estes resultados sugerem que essa espécie é constituída de uma única grande população que poderia ser considerada como uma única unidade de manejo caso outras diferenças (ex.: adaptações ecológicas locais) não sejam encontradas. Ambas as espécies estudadas apresentam alta diversidade genética, possivelmente devido a um intenso fluxo gênico dentro de cada uma.

# Abstract

The present study aimed to characterize the population genetic structure of two macaw species: *Ara chloropterus* and *Ara macao*. Samples from various localities in Brazil, one in Bolivia and another in Peru were analyzed. Mitochondrial (control region and cytochrome oxidase I) and nuclear (microsatellites) DNA were analyzed. For *A. chloropterus* 89 individuals had 2166 bp of mitochondrial DNA sequenced and 95 individuals were genotyped for six polymorphic microsatellite loci. Network and the neighbor-joining tree constructed based on mitochondrial data and  $F_{ST}$  values obtained with both molecular markers revealed weak genetic structure. This can be due to high gene flow or retained ancestral polymorphism. Thus, *A. chloropterus* seems to be organized in metapopulations (low genetic structure and high gene flow). Under this scenario, it would be desirable to preserve individuals from various locations and their corridors. For *A. macao* we obtained 2094 bp of mitochondrial DNA for 68 individuals and data on seven microsatellites for 64 individuals. The haplotype network and the neighbor-joining tree constructed based on mitochondrial data and  $F_{ST}$  values obtained with both molecular markers revealed no genetic differentiation among localities. The demographic analysis of this species indicated a population expansion 50,000 years ago and a population decline since the last glacial maximum. These results suggest that this species is organized as a large population that could be considered as a single management unit for conservation purposes if other differences are not found (eg. local ecological adaptations). Both species have high genetic diversity, possibly due to extensive gene flow within each one.

# Introdução Geral

## 1 - Psitacídeos

Os psitacídeos (ordem Psittaciformes) são representados pelos papagaios, araras, periquitos, maracanãs e afins. São facilmente reconhecidos pela morfologia de seus bicos curvados e arredondados, por suas plumagens geralmente bastante coloridas (Forshaw, 1989; Collar, 1997). A ordem Psittaciformes é uma das mais antigas pertencente à classe Aves (Cooper e Penny, 1997) e atualmente é organizada em três famílias (Strigopidae, Cacatuidae e Psittacidae; Schweizer e col., 2010). A Família Psittacidae se subdivide em cinco subfamílias (Arinae, Loriinae, Micropsittinae, Psittacinae e Platycercinae) (Schweizer e col., 2010; Wright e col. 2008). A subfamília Arinae agrupa todas as espécies neotropicais (Schweizer e col., 2010; Christidis e Boles, 2008; Tokita e col., 2007; de Kloet e de Kloet, 2005; Sick, 1997; Forshaw, 1989; Smith, 1975).

## 2 - Psitacídeos no Brasil

Segundo Sick (1997), o Brasil possui 74 espécies de psitacídeos, algumas têm distribuição bastante restrita, como é o caso de *Anodorhynchus leari* na caatinga do estado da Bahia. Outras apresentam uma ampla distribuição, ocorrendo em grande parte do país, como *Ara chloropterus* e *Amazona amazonica*.

A maioria das espécies é socialmente monogâmica e o casal permanece unido por toda a vida (Sick, 1997). O período reprodutivo varia de acordo com a espécie e com as condições climáticas, porém, em geral, ocorre de julho a março. Utilizam principalmente ocos em árvores para construção do ninho, porém algumas espécies também utilizam cavidades em paredões rochosos, como *Ara chloropterus* e *Anodorhynchus leari*. *Myiopsitta monachus* é o único psitacídeo que constrói ninhos com gravetos. O número de ovos varia de um a cinco dependendo da espécie e o período de incubação pode variar de 30 (espécies maiores) a 18 dias (espécies menores). O casal divide as tarefas de cuidado com os filhotes, permanecendo no ninho na maior parte do tempo (Collar, 1997; Forshaw, 1989).

Os psitacídeos têm sofrido com a perda de habitat e com a captura para o comércio ilegal. Segundo a *BirdLife International* (2010) 74 espécies de psitacídeos estão ameaçadas de extinção em diferentes graus. Duas espécies foram extintas depois da chegada dos europeus no Brasil (*Anodorhynchus glaucus* e *Cyanopsitta spixii*), uma encontra-se em perigo de extinção (*Pyrrhura griseipectus*), oito estão ameaçadas, cinco são vulneráveis e oito quase ameaçadas (*BirdLife*

*International*, 2010). As causas desse problema são a destruição de habitats e as capturas ilegais da natureza para o comércio de animais silvestres. Assim, é necessária a vigilância e a proteção de seus habitats. Dentre as demais espécies, 53 estão na categoria *least concern*, mas estão perdendo seus habitats por perturbações humanas (Forshaw, 1989; Collar, 1997; *BirdLife International*, 2010). Nesse caso estão as araras vermelhas, que são alvo do presente trabalho e serão descritas a seguir.

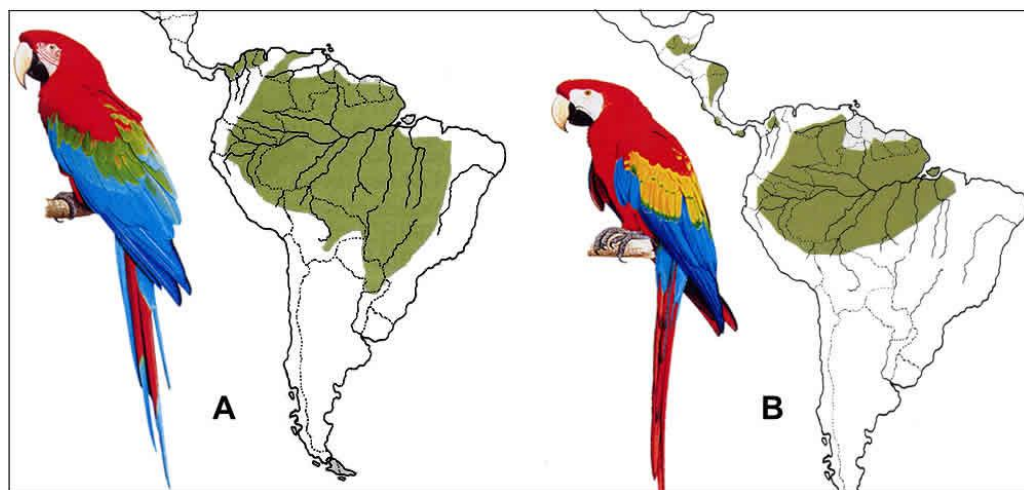
### ***Ara chloropterus* (Figura 1A)**

Conhecida como arara-vermelha-grande, mede cerca de 90 cm e pesa entre 1250 e 1700 gramas. Habita floresta de baixada úmida, mas também penetra em floresta decídua tropical e mata de galeria em savanas. Possui ampla distribuição: leste do Panamá, Colômbia, Venezuela, Guianas, Brasil, Paraguai, leste e oeste do Equador, leste do Peru e noroeste da Bolívia. Sua distribuição se sobrepõe em vários pontos com a de *Ara macao* (Collar, 1997; Sick, 1997). Alimenta-se de frutos, flores e sementes. Seus ninhos são construídos em ocos de árvores (geralmente a espécie de maior porte da região) ou em cavidades em paredes rochosos (Antas, 2009; Juniper e Parr, 1998; Collar, 1997; Abramson e col, 1995; Forshaw, 1989). Segundo a *BirdLife International* (2010), essa espécie tem uma ampla distribuição. O tamanho da população global não é conhecido, mas é considerada freqüente, apesar da evidência de um declínio populacional devido à perda de habitat e retirada da natureza para ser utilizada como animal de estimação. Apesar de não ser uma espécie considerada ameaçada, consta do Apêndice II do *Convention for the International Trade of Endangered Species* (CITES) e como *least concern* na *International Union for Conservation of Nature* (IUCN).

### ***Ara macao* (Figura 1B)**

Esta espécie consta como ornamento no primeiro mapa do Brasil, datado de 1502 (Sick, 1997). Ela é conhecida como arara-canga, mede entre 84 e 95 cm, pesa entre 950 e 1150 gramas, é morfologicamente muito semelhante a *Ara chloropterus*. Habita a copa de florestas úmidas, florestas de margens de rios e clareiras com árvores altas. Possui duas sub-espécies: *A. m. cyanoptera* (do sudoeste do México à Nicarágua, é a maior das duas sub-espécies e possui as pontas das asas amarelas e azuis, e não verdes) e *A. m. macao* (com ampla distribuição: Costa Rica, Panamá, norte e leste da Colômbia, Venezuela, Guiana, Brasil, sul a leste do Equador, leste do Peru e noroeste da Bolívia) (Abramson e col., 1995; Collar, 1997; Sick, 1997). Sua dieta e características de nidificação são semelhantes às de *A. chloropterus* (Juniper e Parr, 1998; Collar, 1997; Abramson e col., 1995; Forshaw, 1989). Segundo a *BirdLife International* (2010), esta espécie é descrita como comum. Apesar da perda de habitat e retirada de filhotes da natureza, acredita-se que esta espécie não se

aproxima da porcentagem mínima de declínio populacional (mais de 30% de declínio em 10 anos ou três gerações) para ser incluída na lista vermelha da IUCN, sendo considerada como *least concern*. Porém como todos os psitacídeos consta do Apêndice II do CITES.



**Figura 1:** *Ara chlorocephala* (A) e *Ara macao* (B) e suas distribuições geográficas atuais. Figuras modificadas de Collar (1997) e Abramson e col. (1995).

No estudo de filogenia molecular de Oliveira-Marques (2006), baseado em 5053 pares de base (pb) do genoma mitocondrial [região controladora, DNA ribossomal (rDNA) 12S, rDNA 16S, sub-unidade 2 da NADH desidrogenase e citocromo b] com todas as espécies atuais do gênero *Ara*, *A. chlorocephala* e *A. macao* foram recuperadas como irmãs, com 4% de divergência genética e com separação há aproximadamente três milhões de anos atrás. Até o momento, a estrutura genética populacional de ambas as espécies foi pouco estudada, sendo que tanto Faria (2000) como Gebhardt (2007) não encontraram estruturação genética em nenhuma das espécies. Para confirmar se no Brasil também não há estruturação genética entre as regiões, seria necessário aumentar o número de indivíduos e de marcadores, tal informação é importante para auxiliar os planos de manejo e de conservação das espécies.

### 3 - Áreas amostradas

As duas espécies estudadas possuem ampla distribuição geográfica, portanto, no presente estudo, para obter uma boa representatividade dessas espécies, foram realizadas coletas de amostras em diferentes localidades do Brasil. No caso de *Ara macao*, foram coletadas amostras na Amazônia



brasileira, nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia e Acre. No caso de *Ara chloropterus*, foram amostrados indivíduos dos diferentes biomas onde ocorre: Cerrado no Piauí, Pantanal no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Amazônia nas mesmas localidades de *Ara macao* e Mata Atlântica em São Paulo.

#### **4 - Estudos de estrutura populacional para conservação de espécies**

Quando uma espécie se divide em subpopulações isoladas pode haver perda de heteroziguidade e também pode resultar em frequências alélicas diferentes das encontradas na espécie como um todo devido à fixação de alelos diferentes pela ação da deriva genética. Essa diminuição pode ser quantificada pelo índice F de Wright (1931), o qual utiliza dados de frequências alélicas obtidas de distintas localidades geográficas para quantificar a subdivisão de populações, e em equilíbrio, permite estimar o fluxo gênico. Este índice mede a diferença entre a média de heteroziguidade entre as subpopulações e a potencial frequência de heterozigotos se não existisse a subdivisão (Hartl e Clark, 1997). A verificação da existência de estruturação genética nas populações naturais e a estimativa do fluxo gênico entre as subpopulações pode ser realizada a partir da análise de variância das frequências gênicas entre as diferentes localidades ( $F_{ST}$ ). No caso de haver estruturação populacional, as unidades de manejo a serem consideradas devem ser as subpopulações diferenciadas geneticamente (Solé-Cava, 2001) e no caso de não haver diferenciação genética, deve-se estudar a melhor maneira de conservar a espécie.

#### **5 - Genética molecular aplicada à conservação**

Inicialmente, utilizavam-se enzimas para avaliar a variabilidade genética, atualmente, as metodologias de biologia molecular permitem recuperar informações diretamente do DNA. Isso é mais vantajoso, pois é possível detectar uma maior variabilidade, o DNA pode ser recuperado de tecidos mortos (como pele de museu e fósseis) e de células encontradas em amostras não invasivas (como pêlos e penas). A genética molecular pode ser usada como instrumento de investigação em diversas áreas, como por exemplo, para estudar a biologia reprodutiva e as estruturas familiar e populacional, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações e para determinar a origem de indivíduos sem procedência conhecida, o que é muito importante para a fiscalização de animais retirados da natureza (Avice, 1994). Dois marcadores moleculares comumente utilizados nessas abordagens estão brevemente descritos a seguir.

## 5.1 - DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) animal é muito utilizado em estudos populacionais devido à facilidade de manipulação e de purificação em laboratório, à presença de várias cópias, à herança principalmente materna, à raridade de eventos de recombinação e à taxa de evolução mais rápida que a do genoma nuclear (Quinn, 1997). O DNAm<sub>t</sub> animal é uma molécula circular que contém genes para dois RNAs ribossomais (rRNA), 22 RNAs transportadores (tRNA) e 13 proteínas, além da Região Controladora (RC) (Houde e col., 1997). Acredita-se que a RC regula a replicação da fita H e a transcrição de todos os genes do DNAm<sub>t</sub> (Bensch e Härlid, 2000; Desjardins e Morais, 1990). Embora o DNAm<sub>t</sub> seja relativamente bem conservado, sua ordem gênica tem mostrado variação entre diferentes grupos de aves, inclusive com a presença de RC duplicada (Desjardins e Morais, 1990; Eberhard e col., 2001). A ordem dos genes ao redor da RC foi caracterizada em representantes da maioria dos gêneros de psitacídeos neotropicais (Tavares, 2005). Os representantes do gênero *Ara* possuem apenas uma RC, ou seja, esses táxons apresentam a ordem gênica típica de aves.

A relativamente alta variabilidade encontrada na RC ocorre devido a substituições de nucleotídeos, à presença de curtas deleções e inserções e a variação no número de repetições em tandem. A RC pode ser dividida em três domínios: Domínio I – rico em AC, é a região adjacente ao tRNA<sup>Glu</sup> na ordem gênica típica; possui seqüências associadas com o término da replicação da fita H (TAS) e freqüentemente inclui repetições de número variável (VNTRs); Domínio II – rico em CT, é o domínio mais conservado e o Domínio III – rico em AT e muito pobre em G, é a região próxima ao tRNA<sup>Phe</sup> na ordem gênica típica. É o domínio freqüentemente mais variável devido à sua alta taxa de substituições de nucleotídeos, inserções, deleções e unidades repetitivas. Contém seqüências conservadas de importância funcional (os promotores de transcrição das fitas leve e pesada), origem de replicação da fita H e curtas seqüências de blocos conservados (Baker e Marshal, 1997).

As seqüências da RC são muito utilizadas em estudos de estrutura populacional. Por exemplo, um estudo com seqüenciamento da RC do veado dos pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) revelou que as suas populações estavam estruturadas (Gonzalez e col., 1998). Outro exemplo é o caso da foca havaiana *Monachus schauinslei*, cujas cinco populações existentes não apresentam evidência de expansão populacional. O seqüenciamento da RC e a análise de minissatélites revelaram um baixíssimo nível de variabilidade dentro de cada população com uma alta diferenciação entre elas (Kretzmann e col., 1997). E outros trabalhos mais recentes têm utilizado a RC como marcador em estudos populacionais (Chabot e Allen, 2009; Muñoz-Fuentes e col., 2005; Tomasik e Joseph, 2005; Brown e col., 2004).

Três genes (COI, II e III) codificam subunidades da enzima citocromo c oxidase, que é importante no mecanismo respiratório da mitocôndria, pois faz parte do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons (Ballard e Whirlock, 2004). As sequências desses genes tem sido muito usadas em estudos de genética populacional, filogenia, evolução, sistemática e de conservação. Um exemplo é o caso do lagarto da espécie *Tympanocryptis pinguicolla*, cujo estudo incluindo o COI mostrou que não era interessante a translocação de indivíduos de um determinado local para outro por constituírem duas populações isoladas geneticamente (Melville e col., 2007). Há ainda, vários outros exemplos de estudos (Venarsky e col., 2009; Lapègue e col., 2006; Guryev e col., 2001; Holland e col. 2004).

## 5.2 - Microssatélites

Os microssatélites são compostos de sequências (de 2 a 9 pb) repetidas em tandem de número altamente variável. Em geral, os microssatélites que são selecionados para análises populacionais possuem de 100 a 250 pb para permitir sua fácil amplificação por PCR. Eles estão distribuídos no genoma de distintos organismos e são relativamente frequentes. Porém, em aves ocorrem em frequência menor em comparação com outros organismos (Hearne e col., 1992; Primmer e col., 1997; *International Chicken Genome Sequencing Consortium*, 2004).

Em geral, os microssatélites apresentam alto grau de variabilidade intra e interpopulacional, os *primers* desenvolvidos para uma espécie podem ser usados em espécies filogeneticamente próximas, permitem trabalhar com pequena quantidade de DNA por serem amplificados por PCR, os alelos de um indivíduo heterozigoto são geralmente de fácil visualização e são multialélicos numa população (Bruford e col., 1992). Os microssatélites têm sido utilizados, entre outros trabalhos, para estudos de estrutura de populações (Brown e col., 2004; Muñoz-Fuentes e col., 2005) e para estimar o grau de parentesco (Burland e col., 2001). Há alguns *primers* de microssatélites desenvolvidos para psitacídeos, como por exemplo: *Psittacus erithacus* (Taylor e Parkin, 2007); *Amazona guildingii* (Russello e col., 2001 e 2005) e *Ara ararauna* (Caparroz e col. 2003).

## 6 - Referências Bibliográficas

Abramson, J.; Speer, B. L.; Thomsen, J. B. (1995) **The Large Macaws: their Care, Breeding and Conservation**. 1<sup>st</sup> ed., Raintree Publications, Fort Bragg.

Antas, P. T. Z. (2009) **Pantanal – Guia de Aves**. 2<sup>a</sup> Ed., SESC, Rio de Janeiro.

Avise, J.C. (1994) **Molecular Markers, Natural History Evolution**. Chapman & Hall, New York.

Baker, A.J.; Marshal, H.D. (1997) Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mindel, D. P. (ed.) **Avian Molecular Systematics and Evolution**. Academic Press, San Diego. Pp: 51-82.

Ballard, J. W. O.; Whirlock, M. C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. **Mol. Ecol.** **13**: 729-744.

Bensch, S.; Härlid, A. (2000) Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Mo.. Biol. Evol.* **17**: 107-113.

BirdLife International (2010) Species factsheet: *Ara chloropterus*. Retirado de <http://www.birdlife.org> dia 15/06/2010.

BirdLife International (2010) Species factsheet: *Ara macao*. Retirado de <http://www.birdlife.org> dia 15/06/2010.

Brookfield, J.F.Y. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Mol. Ecol.** **5**: 453-455.

Brown, M.L; Ramey, R.R.; Tamburini, B.; Gavin, T.A. (2004) Population structure and mitochondrial DNA variation in sedentary neotropical birds isolated by forest fragmentation. **Conserv. Genet.** **5**: 743-757.

Bruford, M.W.; Hanotte, O.; Brookfield, J.F.Y.; Burke, T. (1992) Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoezel, A.R. (ed.) **Molecular Genetics Analysis of Population. A Practical Approach**. Oxford University Press, New York. Pp: 225-269.

Burland, T.M.; Barratt, E.M., Nichols, R.A.; Racey, P.A. (2001) Mating patterns, relatedness and the basis of natal philopatry in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*. **Mol. Ecol.** **10**: 1309-1321.

Caparroz, R.; Miyaki, C.Y.; Baker, A.J. (2003) Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). **Mol. Ecol. Notes** **10**: 1046-1048.

Chabot, C.L.; Allen, G. (2009) Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. **Mol. Ecol.** **18**: 545-552.

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.

Cooper, A.; Penny, D. (1997). Mass survival of birds across the Cretaceous – Tertiary boundary: molecular evidence. **Science** **275**: 1109-1113.

Christidis L, W. E. Boles (2008). **Systematics and Taxonomy of Australian Birds**. CSIRO Publishing, Canberra.

De Kloet, R.S.; De Kloet, S.R. (2005) The evolution of the spindlin gene in birds: sequence analysis of an intron of the spindlin W and Z gene reveals four major division of the Psittaciformes. **Mol. Phylogenet. Evol.** **36**: 706-721.

Desjardins P., Morais, R. (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. **J. Mol. Biol.** **212**: 599-634.

Eberhard, J. R.; Wright, T. F.; Bermingham, E. (2001) Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in parrot genus *Amazona*. **Mol. Biol. Evol.** **18**: 1330-1342.

Excoffier, L.P.; Smouse, S.; Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131**: 479-491.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinf. Online** **1**:47-50.

Faria, P. (2000) **Caracterização de Populações Naturais de Psitacídeos (Psittaciformes, Aves) Através de Marcadores Moleculares**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Forshaw, J.M. (1989) **The Parrots of the World**. 3 ed., Lansdowne Press, Willoughby.

Fu, Y. -X.; Li, W. -H. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics** **133**: 693-709.

Gebhardt, K. J. (2007) **Using Molted Feathers as a Source of DNA to Study Genetic Diversity and Population Structure of Macaws in the Amazon Rainforest of Peru**. Dissertação de Mestrado. College of Graduate Studies. University of Idaho, Moscow.

Gonzalez, S.; Maldonado, J.E; Leonard, J.A.; Vila. C.; Duarte, J.M.B.; Merino, M.; Brum-Zorrila, N.; Wayne, R.K. (1998) Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Mol. Ecol.** **7**: 47-56.

Guedes, N.M.R. (1993) **Biologia Reprodutiva da Arara Azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal-MS, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Florestais. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

Guryev, V.; Makarevitch, I.; Blinov, A.; Martin, J. (2001) Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I. **Mol. Phylogenet. Evol.** **19**:9-21.

Hartl, D.L.; Clark, A.G. (1997) **Principles of Population Genetics**. Sinauer Associates, Sunderland.

Hearn, C.M.; Ghosh, S.; Todd, J.A. (1992) Microsatellites for linkage analysis of genetics traits. **Ecology 4**: 6-11.

Holland, B. S.; Dawson, M. N.; Crow, G. L.; Hofmann, D. K. (2004) Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. **Mar. Biol. 145**: 1119-1128.

*International Chicken Genome Sequencing Consortium* (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature 432**: 695-716.

Juniper, T.; Parr, M. (1998) **Parrots: a Guide to the Parrots of the World**. Yale University Press, New Haven.

Kimura, M. (1980) Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol. 16**: 111-120.

Kimura, M., Crow, J.F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics 49**: 725-738.

Kreztman, M.B.; Gilmartin, W.G.; Meyer, A.; Zegers, G.P.; Fain, S.R.; Taylor, B.F.; Costa, D.P. (1997) Low genetic variability in the Hawaiian monk seal. **Conserv. Biol. 11**: 482-490.

Lapègue, S.; Salah, I. B.; Batista, F. M.; Heurtebise, S.; Neifar, L.; Boudry, P. (2006) Phylogeographic study of the dwarf oyster, *Ostreola stentina*, from Marocco, Portugal and Tunisia: evidence of a geographic disjunction with the closely related taxa, *Ostrea aupaoria* and *Ostreola equestris*. **Mar. Biol. 150**: 103-110.

Melville, J.; Goebel, S.; Starr, C.; Keogh, J. S.; Austin, J. J. (2007) Conservation genetics and species status of an endangered Australian dragon, *Tympanocryptis pinguicollis* (Reptilia: Agamidae). **Cons. Genet. 8**: 185-195.

Muñoz-Fuentes, V.; Green, A.J.; Negro, J.J.; Sorenson, M.D. (2005) Population structure and loss of genetic diversity in the endangered white-headed duck, *Oxyura leucocephala*. **Conserv. Genet. 6**: 999-1015.

Nei, M.; Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76**: 5269-5273.

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.

- Page, R.D.M.; Holmes, E. (1998) **Molecular Evolution: a Phylogenetic Approach**. Blackwell Science, Oxford.
- Posada, D.; Crandall, A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** **14**: 817-818.
- 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.
- Quinn, T. W. (1997) Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: Mindel, D. P. (ed.) **Avian Molecular Systematics and Evolution**. Academic Press, San Diego. Pp. 3-49.
- Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** **43**: 223-225
- Rousset, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resources** **8**: 103-106
- Russello, M. A.; Calcagnotto, D.; DeSalle, R.; Amato, G. (2001) Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. **Mol. Ecol. Notes** **1**: 13-15.
- Russello, M. A.; Lin, K.; Amato, G.; Caccone, A. (2005) Additional microsatellite loci for endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. **Conserv. Genet.** **6**: 643-645.
- Saitou N.; Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** **4**: 406-425.
- Schweizer, M., M. Güntert, O. Seehausen, S.T. Hertwig (2010) The evolutionary diversification of parrots supports a taxon pulse model with multiple trans-oceanic dispersal events and local radiations, **Mol. Phylogenet. Evol.** **54**: 984-994.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. (2000) **Arlequin, version 2.0: a Software for Population Genetics Data Analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sick, H. (1997) **Ornitologia Brasileira**. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- Smith, G. A. (1975) Systematics of parrots. **Ibis** **117**:18-68.
- Solé-Cava, A. M. (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Holos Editora, Ribeirão Preto. Pp: 172-192.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** **123**: 585-595.



Tavares, E. S. (2005) **Relações Filogenéticas, Biogeografia histórica e Evolução da organização de Genes Mitocondriais dos Psitacídeos Neotropicais (tribo Arini: Psittacidae: Psittaciformes)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.

Taylor, T.D.; Parkin, D. T. (2007) Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. **Mol. Ecol. Notes 7**: 163-167.

Tokita, M.; Kiyoshi, T.; Armstrong, K. N. (2007) Evolution of craniofacial novelty in parrots through developmental modularity and heterochrony. **Evol. Devel. 9**: 590–601.

Tomasik, E.; Joseph, A.C. (2005) Mitochondrial phylogeography and conservation genetics of wolverine (*Gulo gulo*) of northwestern north america. **J. Mammal. 86**: 386-396.

Venarsky, M. P.; Anderson, F. E.; Wilhelm, F. M. (2009) Population genetic study of the U.S. federally listed Illinois cave amphipod, *Gammarus acherondytes*. **Conserv. Genet.10**: 915-921.

Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. **Genetics 16**: 97-159.

Wright, T. F.; Schirtzinger, E. E.; Matsumoto, T.; Eberhard, J. R.; Graves, G. R.; Sanchez, J. J.; Capelli, S.; Müller, H.; Scharpegge, J.; Chambers, G. K.; Fleischer, R. C. (2008) A multilocus molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): support for a Gondwana origin during the cretaceous. **Mol. Biol. Evol. 25**: 2141-2156.

## Objetivos

O objetivo geral do presente estudo é caracterizar a estrutura genética populacional de duas espécies de araras (*Ara chloropterus* e *Ara macao*) no Brasil. Para alcançar esse objetivo:

- 1) Realizamos análises filogeográficas e de genética de populações das duas espécies;
- 2) Avaliamos a variabilidade genética de indivíduos silvestres das duas espécies;
- 3) Comparamos o grau de estruturação genética entre elas.

# Conclusões Finais

- Nas viagens de campo foi possível confirmar que as araras vermelhas são generalistas na sua alimentação e na escolha da espécie arbórea para nidificação. Dado importante para qualquer plano de conservação da espécie.
- Também em nossas viagens, podemos observar que o período de chuva e de reprodução das araras vermelhas parecem estar relacionados. Isso é importante para estabelecer melhor qual é a época reprodutiva dessas espécies nas regiões visitadas.
- Os dois marcadores moleculares (DNA mitocondrial e microssatélites) revelaram fraca estruturação genética em *Ara chloropterus*, indicando que esta espécie deve estar organizada em metapopulações.
- A região do Parque Estadual Morro do Diabo (SP), onde *A. chloropterus* é considerada ameaçada de extinção necessita de mais estudos (observações de campo e moleculares) para entender melhor a biologia e a genética dos indivíduos dessa localidade.
- Os dois marcadores moleculares (DNA mitocondrial e microssatélites) revelaram ausência de estruturação genética em *Ara macao*, indicando que esta espécie pode ser considerada uma única população.
- Nossos resultados sugerem que as duas espécies estudadas apresentam alta diversidade genética, possivelmente devido a um intenso fluxo gênico dentro de cada espécie. Porém, há indícios de declínio populacional em *Ara macao*.